



rapport

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Östrogena och androgena
effekter i lakvatten och
kommunalt avloppsvatten i
Fornby reningsverk, Siljansnäs,
Leksands kommun

Anders Svenson Ann-Sofie Allard

B 1483

Stockholm, september 2002



Organisation/Organization IVL Svenska Miljöinstitutet AB IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd.	RAPPORTSAMMANFATTNING Report Summary
Adress/address Box 21060 100 31 Stockholm	Projekttitel/Project title
Telefonnr/Telephone 08-598 563 00	Anslagsgivare för projektet/ Project sponsor
Rapportförfattare/author Anders Svenson Ann-Sofie Allard	
Rapportens titel och undertitel/Title and subtitle of the report Östrogena och androgena effekter i lakvatten och kommunalt avloppsvatten i Fornby reningsverk, Siljansnäs, Leksands kommun/Estrogenicity and androgenicity in landfill leachate and domestic wastewater in Fornby sewage treatment works, Siljansnäs, Leksand.	
Sammanfattning/Summary <p>Inkommande och utgående vattenströmmar vid reningsverket i Siljansnäs, Leksands kommun undersöktes avseende effekter i screentest för östrogena och androgena effekter. Såväl lakvatten från Lindbodarna som det kommunala avloppsvattnet hade östrogena effekter. Efter behandling i reningsverket minskade effekten men det utgående avloppsvattnet innehöll fortfarande en ansenlig östrogen effekt. Lakvattnet hade en svag men ändå mätbar androgen effekt. Kommunalt avloppsvatten före behandling var androgener men enbart efter inblandning med lakvatten minskade den androgena effekten. Minskningen kan bero på hämmande ämnen i lakvattnet. Efter behandlingen minskade den androgena effekten avsevärt.</p> <p>Untreated and treated wastewaters and a landfill leachate at the sewage treatment works at Siljansnäs were tested for estrogenicity and androgenicity in a yeast-based receptor screen test. The leachate and the untreated domestic wastewater were estrogenic. Upon wastewater treatment the estrogenicity was reduced but still a considerable level was found in the effluent. A weak androgenic response was found in the landfill leachate. The domestic wastewater contained androgenic substances corresponding to 680 ng dihydrotestosteron equivalents/L. Upon mixing the two water flows, the resulting androgenicity was reduced, indicating a presence of inhibiting substances. The treated combined effluent was less androgenic and at least 95 % of the activity was removed in the treatment process.</p>	
Nyckelord samt ev. anknytning till geografiskt område eller näringsgren /Keywords Hormonstörning, östrogen, androgen, Leksand, avloppsvatten, lakvatten, avfallshantering/Hormone disruption, estrogens, androgens, Leksand municipality, wastewater, landfill leachate, waste management.	
Bibliografiska uppgifter/Bibliographic data IVL Rapport/report B 1483	
Beställningsadress för rapporten/Ordering address IVL, Publikationsservice, Box 21060, S-100 31 Stockholm; fax: 08-598 563 90, e-mail: publicationservice@ivl.se	

Innehållsförteckning

Faktaruta	2
1 Inledning.....	3
2 Material och metoder.....	3
3 Resultat och diskussion	4
3.1 Östrogena effekter.....	4
3.2 Androgena effekter	7
4 Slutsatser.....	9
5 Referenser.....	9

Faktaruta	
Östrogen, östrogen effekt, östrogenitet	Påverkan eller ämne som verkar på den honliga könscykeln. I denna undersökning avses ämnen som likt östradiol påverkar den mänskliga östrogenreceptorn (α)
Androgen, androgen effekt, androgenitet	Påverkan eller ämne som verkar på den hanliga könscykeln. I denna undersökning avses ämnen som likt dihydrotestosteron påverkar den mänskliga androgenreceptorn
Steroid	En grupp lipider (fettsubstanter) som har stor biologisk och medicinsk betydelse. Ett stort antal syntetiska steroider har framställts bl.a. kortison och könshormoner i p-piller
Screeningstest	Snabb, översiktlig test som tillämpas för att på ett tidigt stadium kunna ”sälla fram” de substanser eller testvatten som uppvisar potentiellt miljöfarliga egenskaper
in vitro	Anger att experiment eller iakttagelser är gjorda utanför en levande kropp t.ex. i provrör eller annan experimentell utrustning (i glas)
in vivo	Anger att experiment eller iakttagelser är gjorda på levande organismer
Rekombinant jästcell	Jästcell som innehåller del av främmande genetiskt material.
Transfektera	En process där det genetiska materialet i en cell ändrats genom att främmande genetiskt material inkorporerats
Gen	Del av arvsmassan som bestämmer en viss ärftlig egenskap
Receptor	Bindningsställe för t ex ett hormon som initierar en process på cellulär nivå

1 Inledning

Tidigare undersökningar har visat att i vissa utsläppsmiljöer påverkas hormonstyrda fysiologiska processer hos fisk och andra akvatiska organismer. Hormonstörande effekter har hittills huvudsakligen avsett östrogen d.v.s. ämnen som påverkar den honliga könscykeln. Utsläpp av kvinnliga könshormoner vid kommunal rening har visats påverka bl.a. fisk i recipienter till reningsverk i Storbritannien. En 1998-1999 av IVL genomförd kartläggning i Sverige har visat att ämnen med östrogena effekter förekommer i kommunala avloppsvatten (Svenson m.fl. 2000, 2002).

I kommunalt avloppsvatten domineras effekterna av naturligt östrogen och vissa steroider som används i p-pillor. Även vissa andra syntetiska och naturliga ämnen i ren form har vid exponering visats störa den honliga könscykeln och könsutvecklingen hos fisk. Hittills är endast ämnens östrogenhärmande effekter undersökta. Motsvarande effekter på den hanliga könscykeln eller motverkande effekter i den honliga könscykeln är ännu mycket litet kända. Preliminära test vid IVL har dock redan visat att androgena effekter förekommer i kommunalt avloppsvatten.

Det finns ett ökande intresse att undersöka kemiska ämnen och sammansatta prover t.ex. avloppsvatten avseende olika hormonella effekter. För östrogena effekter finns idag flera metoder för såväl screentest in vitro som test in vivo. Screenmetoder har främst tillämpats i test av stimulerande (agonistiska) effekter (östrogenhärmande) men kan också anpassas till test av hämmande effekter (antagonistiska).

Som en del i ett projekt att karakterisera effekter av lakvatten i miljön har en undersökning av hormonstörande effekter genomförts i de vattenflöden som leds in till och ut från reningsverket i Fornby, Siljansnäs, i Leksands kommun. Androgener och östrogen har uppmätts via de effekter de åstadkommer i screentest baserade på rekombinanta jästcellstammar som transfekterats med gener för mänsklig androgen- respektive östrogenreceptor.

2 Material och metoder

Vattenprov insamlades från lakvatten och kommunalt avloppsvatten var för sig, samt efter blandningspunkten i rörsystemet. Lakvattnet leds från deponin i Lindbodarna till reningsverket i Siljansnäs och utgjorde ca 10 % av den inkommande vattenströmmen till reningsverket. Även prov av utgående, behandlat avloppsvatten uttogs. Proven uttogs 2002-05-29 och fraktades till laboratoriet i diskade glasflaskor som värmebehandlats minst 2 tim vid 400 °C. Flaskorna förvarades 5 dygn vid +5 °C före upparbetningen av vattenproven.

Vattenproven extraherades med fastfaskolonner enligt en publicerad beskrivning (Körner m.fl. 1999). 1 L vattenprov fick passera kolonner med 200 mg hydroxylerad polystyren-

divinylbensen-kopolymer (ENV+, Sorbent AB, Västra Frölunda). Partiklar i vattnet avskiljades med filtrering genom en 20 µm porfilterplatta ansluten till kolonnen. Komponenter som absorberats till kolonnen eluerades efter en tvättprocedur med aceton. Dimetylsulfoxid (100 µl) tillfördes och eluatet delades i fyra portioner, varefter aceton indunstades i en kvävgasström. Extraktet förvarades vid -20°C fram till testdagen.

Test av östrogena och androgena effekter utfördes med modifierade jästcellstammar, som innehåller gener för östrogenreceptor respektive androgenreceptor, enligt beskrivningar i Routledge & Sumpter (1996) och Sohoni & Sumpter (1998). Provextrakt testades i 96-håls mikrotiterplattor. På varje platta applicerades en negativ kontroll med tillväxtmedium, en serie med 12 koncentrationer av 17β-östradiol eller dihydrotestosteron (positiva kontroller), och extrakt av vattenprover (12 spädningar, spädfaktor 2,0). Plattorna inkuberades vid 32 resp. 28 °C i 3 dygn och avlästes därefter i en automatisk plattläsare vid 540 nm (Spectracount, Packard). Resultaten av test av den positiva kontrollen beräknades som EC₅₀ i ng L⁻¹ och för vattenproven beräknades först EC₅₀ uttryckt som spädfaktor och därefter genom omräkning med positiva kontrollens EC-värde i östradiol- respektive dihydrotestosteronekvivalenter (E2-ekv. eller DHT-ekv.) och uttrycks i sorten ng L⁻¹ vattenprov.

Vattenprov testades i triplikat (tre separata plattor) och resultaten anges som log-normalfördelade medelvärden för EC₅₀ med gränser för en standardavvikelse.

3 Resultat och diskussion

I Fornby reningsverk i Siljansnäs behandlas avloppsvatten i tre steg: försedimentering och (ett kombinerat steg med), kemisk fällning och biologisk behandling. Den kemiska fällningen utförs som simultanfällning med järn-(II)-sulfat. Biologisk behandling sker i en aktivslam-anläggning med två dammar med en total volym av 260 m³. Vattenflödet genom reningsverket var 1348 m³/dygn den 29/5 2002 (provtagningdagen) och medelflödet under maj 1552 m³/dygn. Uppehållstiden i det biologiska behandlingssteget blir då 4,6 tim den 29/5 och 4,0 tim som medelvärde för maj månad. Genomsnittlig slamålder är 7,3 dygn. Till verket är 2500 personekvivalenter anslutna och den industriella belastningen bedöms försombar. Slammet från reningsverket deponeras på anläggningen vid Lindbodarna. Från maj 2001 till maj 2002 deponerades 376 ton (430 m³).

3.1 Östrogena effekter

Diagram över resultat av östrogentest visas i Fig. 1 (endast ett av replikaten visade). Som framgår av diagrammet bildas en rödfärgad produkt i den hormonstyrda process i vilken genen för enzymet 0-galaktosidas utnyttjas som markör. Enzymet produceras av denna markör som i sin tur styrs av östrogenreceptorn i den modifierade jästcellen. Positiv kontroll och vattenprov innehållande kommunalt avloppsvatten visade full induktion av receptorn, medan lakvattnet hade en betydligt lägre östrogen effekt. Alla extrakt av vatten-

prov av kommunalt avloppsvatten visade en toxisk, tillväxthämmande effekt vid högre koncentrationer. Extraktet av lakvatten gav också en hämning av induktionen vid högre koncentrationer, men i detta fall tillväxte cellerna normalt. En svag induktion i receptortestet tydde på förekomst av östrogen i lakvattnet. Röt slam som förts till deponin vid Lindbodarna kan innehålla östrogen som därefter lakas ut. Det är dock inte klarlagt hur hög östrogen effekt ett sådant tillskott kan ge. Lakvattnet kan sannolikt innehålla komponenter som specifikt hämmar funktionen av östrogenreceptorn.

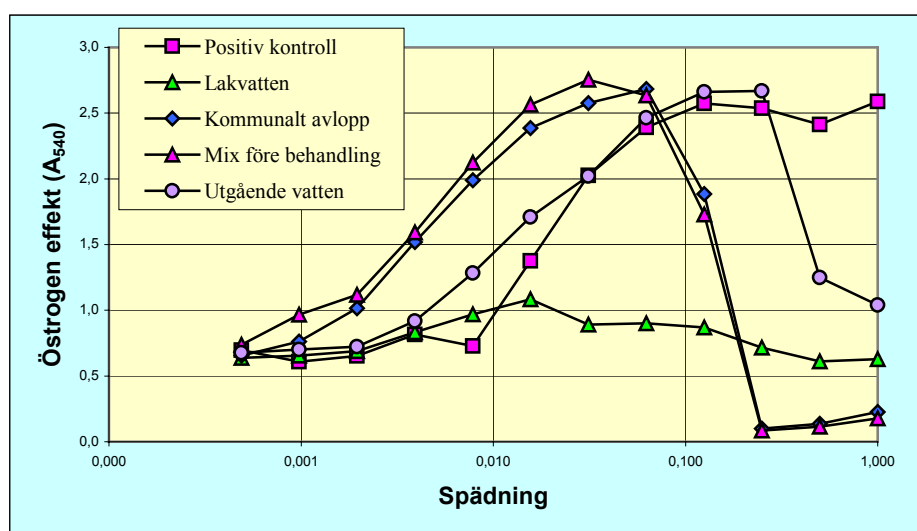


Fig. 1 Östrogen effekt i extrakt av prov från vattenströmmar i Leksands reningsverk vid olika koncentrationer (ett replikat av tre visis).

Resultaten beräknades kvantitativt och erhållna värden redovisas i Tabell 1 och Fig. 2. Kommunalt avloppsvatten visade en relativt hög östrogen effekt före behandling såväl före som efter inblandningen av lakvatten. Enstaka tidigare undersökta reningsverk har haft effekter upp till 30 ng E2-ekv L⁻¹ (Svenson m.fl. 2002). Även effekten i utgående avloppsvatten, 13,3 ng E2-ekv L⁻¹, var hög i jämförelse med tidigare undersökningar (0-12,7 ng E2-ekv L⁻¹). Den höga nivån i behandlat avloppsvatten kan åtminstone delvis förklaras av en relativt kort uppehållstid i det biologiska behandlingssteget (4,6 tim).

Retentionen eller omvandlingen av östrogen var 59 %, vilket möjligen kan betraktas som ett lågt värde, men minskningen angiven i ekvivalenter per L, 18,9 ng E2-ekv L⁻¹, tyder på en effektiv omvandling (eller sorption). Kvantifieringen av effekten i lakvatten är förhållandevis osäker beroende på störande hämmande effekter i extraktet.

Tabell 1. Androgena och östrogena effekter i lakvatten och kommunalt avloppsvatten i Leksands reningsverk.

Vattenprov	Provdatum	Östrogen effekt (ng E2-ekv L ⁻¹) ^a	Androgen effekt (ng DHT-ekv L ⁻¹) ^b
Lakvatten	2002-05-29	2,0 (1,2-3,5)	2,6 (2,0-3,3)
Kommunalt avloppsvatten	2002-05-29	29,8 (23,0-38,6)	680 (670-700)
Blandat kommunalt avloppsvatten och lakvatten före behandling	2002-05-29	32,2 (26,7-38,7)	110 (70-190)
Utgående vatten från reningsverket	2002-05-29	13,3 (10,9-16,2)	5,3 (3,4-8,4)

^a Östrogentest, YES, ng östradiolekvivalenter L⁻¹, medelvärde och gränser för en standardavvikelse, n=3.

^b Androgentest, YAS, ng dihydrotestosteronekvivalenter L⁻¹, medelvärde och gränser för en standardavvikelse, n=3.

Prov av lakvatten från Lindbodarna har analyserats i en tidigare undersökning (Öman 2001). Vid provtagning i juni 2000 kunde inga mätbara halter av sedan tidigare kända östrogener påvisas (4-nonylfenol < 0,2 µg/L; oktylfenol < 0,2 µg/L; nonylfenolmonoetoxilat < 10 µg/L; nonylfenoldietoxilat < 10 µg/L). Om provtagningen och analyserna år 2000 är representativa för halter under årets provtagning och test i receptortestet är nivåerna så låga att ingen av dessa substanser kan ha bidragit till östrogeniteten.

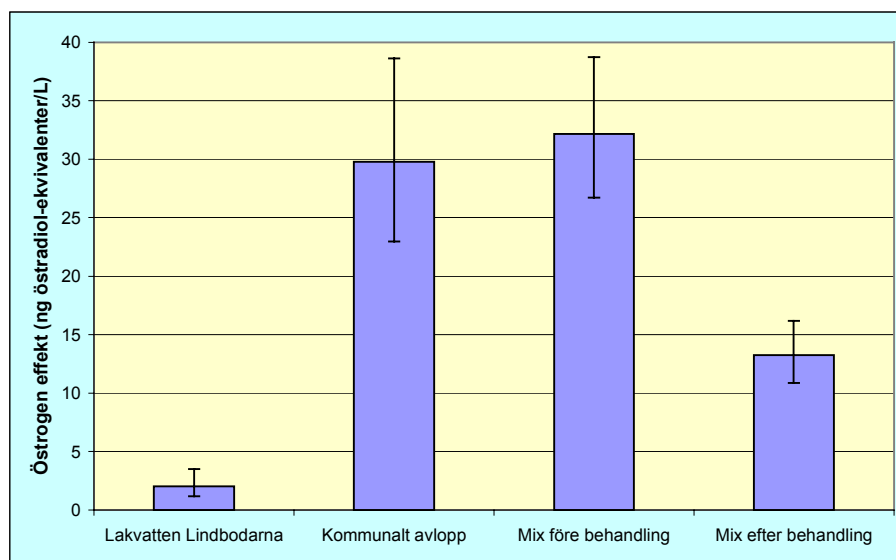


Fig 2 Östrogen effekt i extrakt av prov från inkommande och utgående vattenströmmar i Leksands reningsverk

3.2 Androgena effekter

Androgena effekter uppmätta i extrakt av vattenprov visas i Fig. 3 och i Tabell 1. Kommunalt avloppsvatten före behandling innehöll ansevärt höga halter ämnen med androgena effekter. Ämnen med toxiska, tillväxthämmande egenskaper förekom också. Lakvattnet var jämförelsevis svagt, men ändå mätbart, androget och innehöll också tillväxthämmande komponenter. Även androgener kan ha tillförts deponin med tippat slam från reningsverket. Efter sammanflödet av de båda vattenströmmarna minskade den androgena effekten avsevärt. Minskningen torde bero på tillförsel av tillväxthämmande ämnen via lakvattnet. Hämmningen kan verka direkt på celltillväxten eller mer specifikt vid androgenreceptorn. Efter behandling i reningsverket minskade androgeniteten ytterligare, sannolikt beroende på mikrobiell omvandling. Även inslaget av toxiska komponenter avtog.

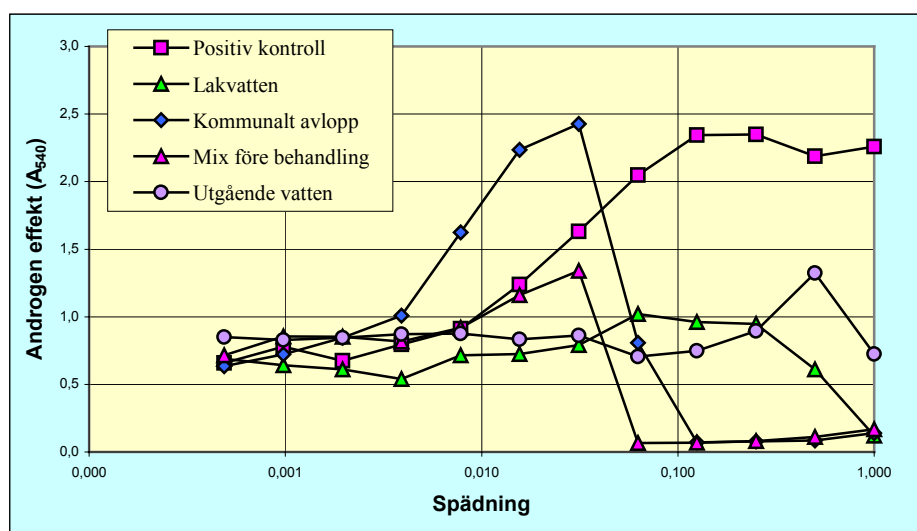


Fig. 3 Androgen effekt i extrakt av prov från vattenströmmar i Leksands reningsverk vid olika koncentrationer (ett replikat av tre visas).

Hög androgen effekt i obehandlat kommunalt avloppsvatten och effektiv reduktion vid behandling är känt från tidigare undersökningar vid andra reningsverk (opubl.). Den androgena effekten i Leksands obehandlade kommunala avloppsvatten var dock väsentligt högre än i tidigare undersökningar. Fig. 4 visar nivåer av androgen effekt i de undersökta vattenproven.

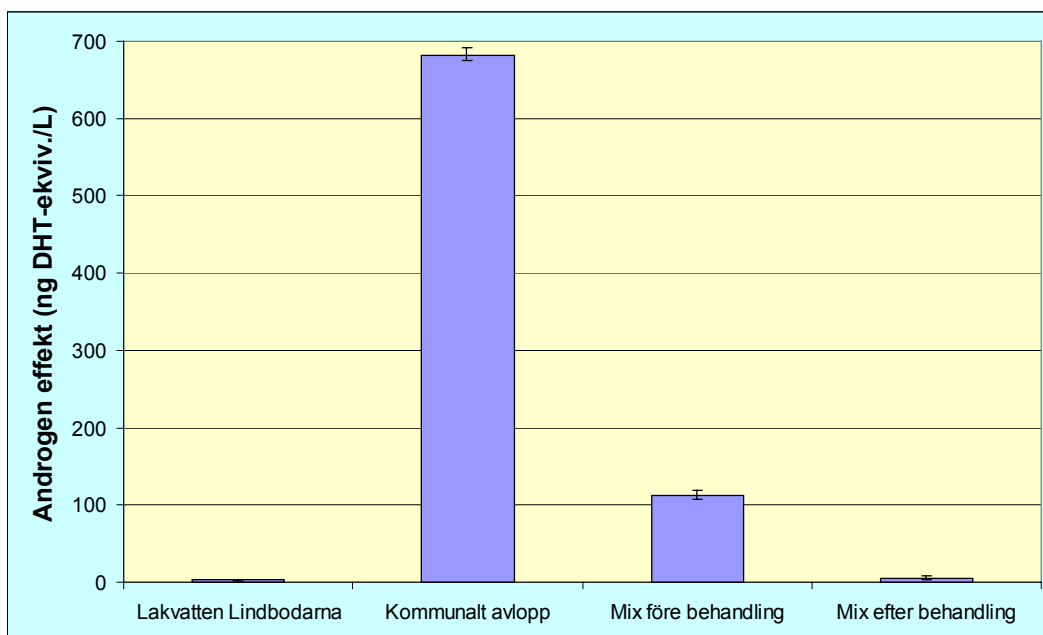


Fig 4 Androgen effekt i extrakt av prov från inkommande och utgående vattenströmmar i Leksands reningsverk.

Den androgena effekten i behandlat, utgående avloppsvatten var högre än den nivå som uppmättes i lakvattnet, särskilt med hänsyn till inspädningen (10 %) i det kommunala vattnet. Reduktionen i androgen effekt vid behandlingen i reningsverket uppgick enligt data i Tabell 1 till minst 95 %. Enbart inblandning av lakvatten (10 %) i det kommunala avloppsvattnet ledde till en minskning av effekten. Sannolikt innehöll lakvattnet också ämnen som hämmar i testet, antingen specifikt som antiandrogener vid receptorn eller direkt på cellernas tillväxt. Iakttagelsen bör föranleda en viss försiktighet vid tolkningen av uppmätta nivåer av hormonell påverkan även i lakvattenproven, eftersom de hämmande ämnena sannolikt förekommer även i detta prov.

Vissa ämnen t.ex. atrazin och några metaboliter av DDT är kända för antagonistiska effekter vid androgenreceptorn (Daxenberger 2002). Inget av dessa ämnen får längre användas i landet. Indikationerna till en antiandrogen effekt ur blandningsförhållandena mellan delströmmarna in till reningsverket måste bero på andra ämnen i lakvattnet.

4 Slutsatser

- Kommunalt avloppsvatten före behandling var såväl östrogen som androgen.
- Även lakvattnet från Lindbodarna uppvisade låga men signifikanta östrogena och androgena effekter.
- Blandning av vattenströmmarna gav ingen större verkan på nivån av östrogen effekt men den androgena effekten minskade avsevärt efter inblandningen. Tillförsel av hämmande ämnen, antingen celltillväxthämmande eller specifikt antiandrogena, kan vara förklaringen.
- Avloppsvattenreningen minskade den östrogen effekten med 59 %.
- Androgena effekter minskade betydligt mera, minst 95 %.
- Utgående avloppsvatten från reningsverket var östrogen, i nivå med de högsta uppmätta i andra reningsverk.
- Samma avloppsvatten innehöll låga, men mätbara nivåer av androgena effekter.

5 Referenser

- Daxenberger, A., 2002. Pollutants with androgen-disrupting potency. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 124-130.
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Kempter, C., Metzger, J. Hagenmaier, H., 1999. Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents. *Sci. Total Environ.*, 225, 33-48.
- Routledge, E., Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 241-248.
- Sohoni, P., Sumpter, J. 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.* 158, 327-339.
- Svenson, A., Allard, A-S., Viktor, T., Örn, S., Parkkonen, J., Förlin, L., Norrgren, L., 2000, Östrogena effekter av kommunala och industriella avloppsvatten i Sverige. IVL rapport B 1352.
- Svenson, A., Allard, A-S., Viktor, T., Örn, S., Parkkonen, J., Olsson, P-E., Förlin, L., Norrgren, L., 2002, Estrogenicity of domestic and industrial effluents in Sweden. *Aquat. Ecosyst. Manage. Health*, accepterad för publicering.
- Öman, C., 2001, Kemisk karakterisering av lakvatten från Lindbodarnas avfallsupplag i Leksand. Delrapport 2. IVL-rapport B 1395.