

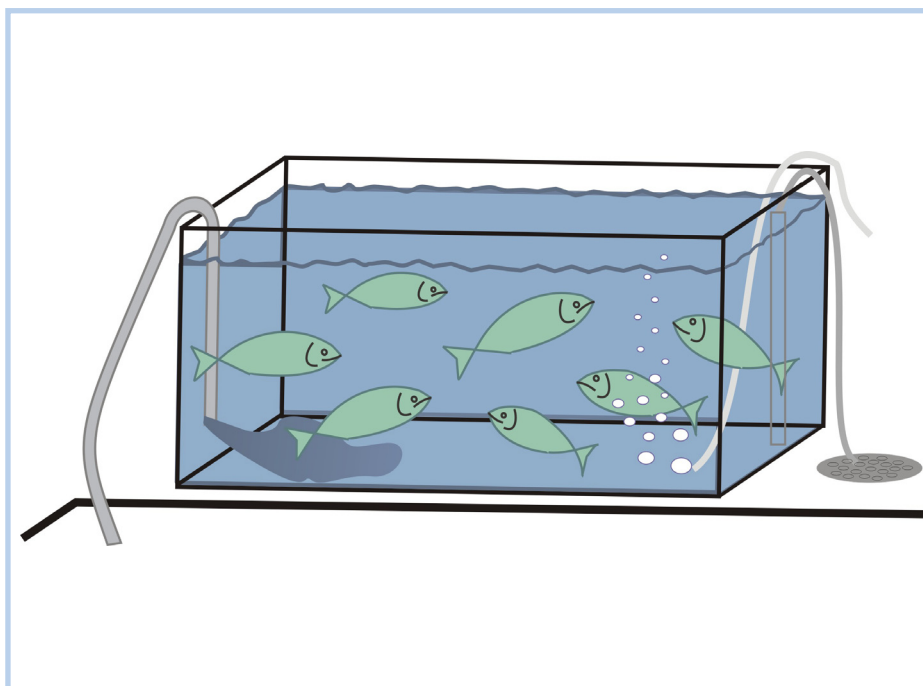
Östrogena ämnen i avloppsvatten, slam och lagrad urin

Margaretha Adolfsson-Erici

Maria Pettersson

Cajsa Wahlberg

Lillemor Asplund



VA-Forsk

VA-Forsk är kommunernas eget FoU-program om kommunal VA-teknik. Programmet finansieras i sin helhet av kommunerna, vilket är unikt på så sätt att statliga medel tidigare alltid använts för denna typ av verksamhet. FoU-avgiften är för närvarande 1,05 kronor per kommuninnevånare och år. Avgiften är obligatorisk. Nästan alla kommuner är med i programmet, vilket innebär att budgeten årligen omfattar drygt åtta miljoner kronor.

VA-Forsk initierades gemensamt av Svenska Kommunförbundet och Svenskt Vatten. Verksamheten påbörjades år 1990. Programmet lägger tonvikten på tillämpad forskning och utveckling inom det kommunala VA-området. Projekt bedrivs inom hela det VA-tekniska fältet under huvudrubrikerna:

Dricksvatten
Ledningsnät
Avloppsvattenrening
Ekonomi och organisation
Utbildning och information

VA-Forsk styrs av en kommitté, som utses av styrelsen för Svenskt Vatten AB. För närvarande har kommittén följande sammansättning:

Anders Lago, ordförande	Södertälje
Olof Bergstedt	Göteborgs VA-verk
Roger Bergström	Svenskt Vatten AB
Daniel Hellström	Stockholm Vatten AB
Stefan Marklund	Luleå
Mikael Medelberg	Roslagsvatten AB
Anders Moritz	Linköping
Peter Stahre	VA-verket Malmö
Jan Söderström	Sv Kommunförbundet
Göran Tägtström	Borlänge
Agneta Åkerberg	Falkenberg
Steinar Nybruket, adjungerad	NORVAR, Norge
Thomas Hellström, sekreterare	Svenskt Vatten AB

Författarna är ensamma ansvariga för rapportens innehåll, varför detta ej kan åberopas såsom representerande Svenskt Vattens ståndpunkt.

VA-Forsk
Svenskt Vatten AB
Box 47607
117 94 Stockholm
Tfn 08-506 002 00
Fax 08-506 002 10
svensktvatten@svensktvatten.se
www.svensktvatten.se

Svenskt Vatten AB är servicebolag till föreningen Svenskt Vatten.

Rapportens titel:	Östrogena ämnen i avloppsvatten, slam och lagrad urin
Title of the report:	Estrogenic substances in treated sewage water, sludge and source separated urine
Rapportens beteckning Nr i VA-Forsk-serien:	2005-03
Författare:	Margaretha Adolfsson-Erici, Maria Pettersson, ITM, Stockholms Universitet; Cajsa Wahlberg, Stockholm Vatten; Lillemor Asplund, ITM, Stockholms Universitet
VA-Forsk-projektnr:	99-119
Projektets namn:	Hur påverkar olika processer i reningsverket utsläpp av ämnen med hormonell effekt? Vad hamnar på åkermark vid spridning av uppsamlad urin?
Projektets finansiering:	VA-Forsk, Mistra, Stockholm Vatten
Rapportens omfattning Sidantal: Format:	29 A4
Sökord:	Fiskgalla, vitellogenin, EROD, östrogen, avloppsvatten, slam, urin
Keywords:	Fish bile, vitellogenin, EROD, estrogens, sewage water, sludge, urine
Sammandrag:	Fisk har exponerats för renat avloppsvatten från Henriksdals och Bromma reningsverk, både före och efter sandfilter. Fiskens galla har analyserats för östrogena substanser och vitellogenin (en biomarkör för östrogen påverkan) har analyserats i fiskplasman. Vatten, slam och lagrad urin har även ana- lyserats för samma substanser.
Abstract:	Fish has been exposed to treated sewage water from Henriksdal and Bromma sewage treatment plants, before and after sand filtration. The bile of the fish was analyzed for estrogenic substances, and vitellogenin (a biomarker for estrogenic exposure) was analyzed in the plasma. Water, sludge and separated urine was analyzed.
Målgrupper:	Branschfolk, myndigheter, forskare, kemi- och läkemedelsindustri
Omslagsbild:	Fiskar i akvarie. Bild: Maria Pettersson
Rapporten beställs från:	Finns att hämta hem som pdf-fil från Svenskt Vattens hemsida www.svensktvatten.se
Utgivningsår:	2005
Utgivare:	Svenskt Vatten AB © Svenskt Vatten AB

Förord

Under senare år har innehållet av hormonstörande ämnen i kommunalt avloppsvatten hamnat i fokus. Från flera länder har man rapporterat om fortplantningsskador på fisk utanför reningsverk.

Med anledning av detta, ville vi undersöka om renat avloppsvatten från två moderna svenska reningsverk innehåller hormonstörande ämnen. Ett av syftena har varit att undersöka vilka reningssteg som bryter ner östrogenerna och de östrogenlika substanserna. Av särskilt intresse var varit att studera huruvida sandfiltersteget reducerar halten av den här typen av ämnen.

Vi har exponerat regnbågslaxar för renat avloppsvatten före och efter sandfilter. Hormonpåverkan hos fiskarna undersöktes med en biologisk markör i blodet och upptaget av hormonstörande ämnen med kemiska analyser i gallan. Vatten, slam och utsorterad och lagrad urin har analyserats med avseende på hormonstörande ämnen.

Projektet är ett samarbete mellan ITM vid Stockholms universitet, Zoologiska institutionen vid Göteborgs universitet och Stockholm Vatten.

Vi vill rikta ett stort tack till Jari Parkkonen för hjälp med exponeringsförsöken, provtagningen av fisken och analyserna av vitellogenin, till Joachim Sturve för EROD-analyserna, båda vid Zoologiska institutionen, Göteborgs universitet, till Klas Öster, Rolf Wolfe och Glenn Kälvenstam vid Stockholm Vatten för teknisk hjälp vid exponeringarna och för hjälp med provtagning av vatten, slam och urin, till kollegorna vid ITMo för assistans vid provtagningarna samt till Lars Förllin vid Zoologiska institutionen, Göteborgs universitet, för värdefulla diskussioner.

Vi vill även tacka VA-Forsk, Stockholm Vatten samt MISTRA för finansiellt stöd.

Stockholm i oktober 2004

Margaretha Adolfsson-Erici
Maria Pettersson
Cajsa Wahlberg
Lillemor Asplund

Innehåll

Förord	3
Sammanfattning	7
Summary	8
1 Bakgrund och syfte	9
2 Material och metoder	11
2.1 Undersökta reningsverk	11
2.2 Exponering och provtagning av fisk	11
2.3 Provtagning av avloppsvatten och slam	12
2.4 Provtagning av utsorterad urin och BDT-vatten	12
2.5 Analys av vitellogenin i blod och EROD i lever	13
2.6 Analys av östrogena substanser i galla	13
2.7 Analys av östrogena substanser i avloppsvatten	13
2.8 Analys av östrogena substanser i slam	13
2.9 Analys av substanser i urin och BDT-vatten	14
2.10 Kvalitetssäkring	14
3 Resultat	14
3.1 Biomarkörer	14
3.1.1 Vitellogenin i blod	14
3.1.2 EROD i lever	15
3.2 Kemiska analyser	15
3.2.1 Östrogena substanser i galla	15
3.2.2 Östrogena substanser i avloppsvatten	18
3.2.3 Östrogena substanser i slam	20
3.2.4 Substanser i urin och BDT-vatten	20
4 Diskussion	22
5 Slutsatser	25
Referenser	26

Sammanfattning

En stor del av de kemiska ämnen som finns i omlopp i samhället når den akvatiska miljön via avloppsreningsverken. Några exempel är ingredienser i disk-, tvätt- och rengöringsmedel, industrikemikalier, läkemedel och hygienprodukter samt naturliga hormoner. Flera av dessa ämnen är biologiskt aktiva och kan påverka akvatiska organismer negativt genom till exempel fortplantningsstörningar.

Hormoner utsöndras av människor främst i form av vattenlösliga inaktiva konjugat, men kan återbildas till sin aktiva form redan innan de når reningsverken. Syntetiska hormoner är liksom andra läkemedelssubstanser gjorda för att ha en biologisk effekt i låga nivåer, samtidigt som de måste vara stabila. Detta har till följd att de relativt små mängder som når vattenmiljön kan ge effekter på organismer som lever där. Även vissa industrikemikalier som oktylfenol, nonylfenol och bisfenol A har uppvisat östrogen aktivitet.

Förekomst av ett specifikt protein, vitellogenin, i blod hos icke könsmogna fiskar är en väletablerad biomarkör för östrogen påverkan. Det utsöndras normalt av honfiskar i samband med bildandet av rom under inverkan av 17β -estradiol. Återfinns det hos hanfiskar och/eller icke könsmogna fiskar är det ett tecken på att fisken blivit utsatt för ämnen med östrogen effekt. Fiskgalla är användbar för att identifiera ämnen fisken varit utsatt för, eftersom gallan är utsöndringsväg för många substanser.

Med den här studien ville vi undersöka om avloppsvattnet från reningsverken Henriksdal (lågbelastat, lång uppehållstid) och Bromma (högbelastat, kort uppehållstid) innehåller substanser med östrogen effekt. Vi har exponerat fisk för renat avloppsvatten före och efter sandfilter. I blodplasman har vi analyserat vitellogenin och i gallan östrogena substanser. Östrogena substanser har även analyserats i utsorterad urin, BDT-vatten, avloppsvatten och slam.

Fisk som exponerats vid Bromma visade förhöjda halter av vitellogenin, vilket betyder att den utsatts för östrogena ämnen. I Henriksdal kunde ingen förhöjning av vitellogenin konstateras. De naturliga hormonerna estron och estradiol, det syntetiska hormonet etinylestradiol och de industriella kemikalierna bisfenol A och nonylfenol identifierades i gallan med GC/MS. Halterna var generellt högre i fisken som exponerats före sandfiltren. Analys av avloppsvatten visar samma tendens om än mindre tydligt.

Vi har kunna konstatera att båda reningsverken har en effektiv rening i ett internationellt perspektiv vad avser hormonstörande ämnen. Upphållstiden i det biologiska steget är en viktig faktor när det gäller att reducera mängden av dessa ämnen. Sandfiltret bidrar till ytterligare reduktion.

De östrogena ämnena kunde identifieras i utsorterad urin som lagrats ett år. Urinspridning på åkermark för gödningsändamål utgör trots detta troligen inte större risk än konventionell slamspridning vad gäller tillförsel av dessa ämnen.

Summary

A major part of the chemical substances that are used in the society reaches the aquatic environment through sewage treatment plants. They are ingredients in household chemicals, pharmaceuticals, natural hormones and industrial chemicals. Several of these chemicals are biologically active and are able to cause reproductive disturbances in aquatic organisms.

Hormones are excreted by humans mainly as water-soluble inactive conjugates, but are reactivated already on the way to the sewage treatment plant. Synthetic hormones are like other pharmaceutical substances designed to be stable and biologically active in low doses, which explains why relatively small amounts can disturb aquatic wild life. Some industrial chemicals like nonylphenol, octylphenol and bisphenol A have also shown to be estrogenic.

The occurrence of a specific protein, vitellogenin, in the blood from male or juvenile fish is an established biomarker for detection of estrogenic contamination in the aquatic environment. Vitellogenin is a precursor protein for the production of yolk in all oviparous vertebrates. The natural inducer is 17β -estradiol, however many environmental estrogens also induce vitellogenin synthesis in both male and females. Fish bile is a useful tool to study exposure and uptake of various substances, as the bile is a major excretion pathway.

In this study we wanted to examine if the treated sewage water from two modern sewage treatment plants: Henriksdal (low load, long residence) and Bromma (high load, short residence) contained estrogenic substances. We have exposed fish to treated sewage water before and after sand filtration. In the fish, we have analysed the blood plasma for vitellogenin and the bile for estrogenic substances. The estrogenic substances were also analysed in source-separated stored urine, grey water, sewage water and sludge

Fish exposed at Bromma showed elevated levels of vitellogenin, which demonstrates that the fish has been exposed to estrogenic substances. At Henriksdal no vitellogenin induction could be detected. The natural hormones estrone and estradiol, the synthetic hormone ethinylestradiol and the industrial chemicals nonylphenol and bisphenol A were detected in bile by GC/MS. The concentrations were generally higher in the fish exposed before the sand filters. A similar trend was seen in the sewage water.

We can establish that the two plants have an efficient removal of the investigated substances in an international perspective. The residence time in the biological treatment process is an important factor in reducing the estrogenic substances. The sand filter contributes to further reduction.

Estrogenic substances could also be detected in source-separated urine stored for one year. However, the impact of estrogenic substances in the urine for fertilizing purposes is probably comparable to conventional sludge fertilizing.

1 Bakgrund och syfte

En stor del av de kemiska ämnen som finns i omlopp i samhället når den akvatiska miljön via avloppsreningsverken. Några exempel är ingredienser i disk-, tvätt- och rengöringsmedel, industrikemikalier, läkemedel och hygienprodukter samt naturliga hormoner. Flera av dessa ämnen är biologiskt aktiva och kan påverka akvatiska organismer negativt genom till exempel fortplantningsstörningar.

Under senare år har flera typer av störningar observerats hos fisk. Exempelvis har man funnit skev könsfördelning och en stor andel hermafroditer hos vilda fiskpopulationer av mört och flundra utanför reningsverk i Storbritannien (Purdom *et al.* 1994; Kirby *et al.* 2004). Detta har initierat undersökningar i flera länder där hormonstörande ämnen i kommunalt avloppsvatten har hamnat i fokus (Harries *et al.* 1997; Jobling *et al.* 1998). Senare undersökningar har också visat på andra typer av störningar, till exempel minskad rombildning och sämre fertilitet hos rommen (Young *et al.* 2004).

Könshormoner är identiska hos fisk, fågel och däggdjur vilket förklarar varför hormoner utsöndrade av människa kan ge effekter hos vattenlevande organismer. Östrogener är inblandade i en mängd olika processer i organismen, som äggproduktion och könsdifferentiering. Störningar av dessa hormonsystem kan få allvarliga konsekvenser för arters fortbestånd på sikt.

Hormoner utsöndras av människor främst som vattenlösliga inaktiva glukuronsyra- eller sulfatkonjugat via urin och faeces. Konjugaten har ingen biologisk aktivitet men det har visat sig att de konjugerade hormonerna kan återbildas till sin aktiva form genom bakteriell nedbrytning redan innan de når reningsverken (Baronti *et al.* 2000). Syntetiska och naturliga hormoner har i flera länder, både i Europa, Nord- och Sydamerika, kunnat identifieras och kvantifieras i renat avloppsvatten (Desbrow *et al.* 1998; Ternes *et al.* 1999; Williams *et al.* 2003; Kolpin *et al.* 2002). Syntetiska hormoner (t.ex. etinylestradiol) som bland annat används i p-piller och i medel mot klimakteriebesvär, är liksom andra läkemedelssubstanser gjorda för att ha en biologisk

effekt i låga nivåer, samtidigt som de måste vara stabila. Detta har till följd att de relativt små mängder som når vattenmiljön kan ge effekter på organismer som lever där.

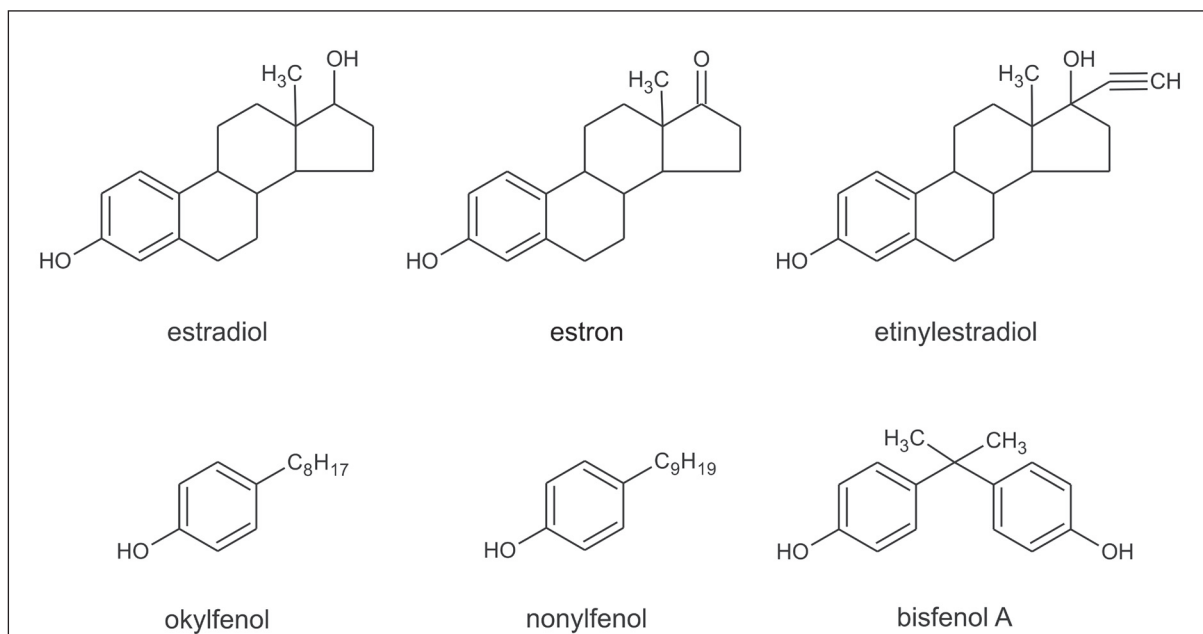
I Sverige såldes 455 kg (aktiv substans) östrogena ämnen 1999, varav merparten förmodas hamna i avloppsvattnet via utsöndring eller nerspolning av mediciner i toaletter. Den naturliga utsöndringen från människor har beräknats till omkring 2 ton/år (Socialstyrelsen 2001; Naturvårdsverket 1996).

En annan typ av ämnen som uppvisat östrogen aktivitet är industrikemikalierna oktylfenol och nonylfenol (White *et al.* 1994). De är nedbrytningsprodukter av alkylfenoletoxylater, nonjoniska tensider som tidigare använts bland annat i produkter för bilvård, avfettning och rengöring, i färger och lacker samt inom plast- och pappersindustrin. I Sverige är det framför allt nonylfenoletoxylater som har använts. Efter en frivillig överenskommelse mellan Kemikalieinspektionen och industrin om utfasning, har användningen av nonylfenoletoxylater minskat med över 90 % i Sverige mellan 1990 och 1999. Fortfarande används nonylfenoletoxylater bl.a. inom pappers-, textil- och metallindustrin (Kemikalieinspektionen 2001). Nonylfenoletoxylater kan också förekomma i direktimporterade disk- och rengöringsmedel, i så kallade p-skum och i bekämpningsmedel. Enligt Kemikalieinspektionens produktregister används 157 ton nonylfenoletoxylater per år i Sverige. Nonylfenol och oktylfenol återfinns i renat avloppsvatten, men främst i slam från reningsverken.

Bisfenol A är ett annat exempel på en industrikemikalie som uppvisat östrogen effekt (Lindholm *et al.* 2000). Bisfenol A används i epoxilimmer, färger och tätningsmedel av tvåkomponenttyp, s.k. epoxi, samt vid tillverkning av polykarbonat som i sin tur används i ett stort antal plastprodukter. Totalt används 43 ton per år enligt produktregistret. Den östrogena effekten upptäcktes i samband med biotester, när det visade sig att bisfenol A läckte från plasten vid autoklivering och gav falska positiva svar (Krishnan *et al.* 1993). Bisfenol A återfinns både i slam och renat avloppsvatten.

Dessa industrikemikalier har dock inte så hög östrogen aktivitet i lika låga doser som de naturliga eller syntetiska östrogenerna, men återfinns å andra sidan i betydligt högre halter i avloppsvatten (Ahel *et al.* 1994).

Förekomst av ett specifikt protein, vitellogenin, i blod hos icke könsmogna fiskar, har i ett flertal



Figur 1-1. Strukturformler för substanser med östrogenlik effekt: De naturliga östrogenerna estradiol och estron, det syntetiska östroget etinylestradiol samt kemikalierna oktylfenol, nonylfenol och bisfenol A.

undersökningar använts som biomarkör för östrogen påverkan (Sumpter & Jobling 1995). Vitellogenin är ett guleprotein som normalt utsöndras av honfiskar i samband med bildandet av rom under inverkan av 17 β -estradiol. Återfinns det hos hanfiskar och/eller icke könsmogna fiskar är det ett tecken på att fisken blivit utsatt för ämnen med östrogen effekt. Vitellogenin blir på så sätt en tidig och känslig indikator för östrogen påverkan. I tidigare studier till exempel från England (Purdom *et al.* 1994) och Sverige (Larsson *et al.* 1999), bedöms de uppmätta halterna av östrogener i det renade avloppsvattnet kunna förklara de förhöjda halterna av vitellogenin i fisk utanför reningsverken.

Mätning av aktiviteten av leverenzymet ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) i fisk är en väl-etablerad biomarkör som indikerar att fisken utsatts för ämnen som aktiverar ett av fiskens avgiftningssystem. Välkända ämnen som inducerar EROD är polycykliska aromatiska kolväten (PAH), plana PCB, dioxiner och substanser med liknande struktur. Mätning av EROD-aktiviteten har i många undersökningar använts för att upptäcka och kartlägga antropogena substanser i den akvatiska miljön (Förlin *et al.* 1995; Balk *et al.* 1996; Noaksson *et al.* 2001).

Att analysera gallvätska hos fisk är ett bra sätt att få en bild av vilka substanser som fisken utsatts för i sin vattenmiljö. Gallan är huvudsaklig utsöndringsväg för en rad substanser, inklusive östrogena ämnen, som fisken tagit upp ur det omgivande vattnet. Efter-

som ämnena koncentreras i gallvätskan, och förekommer i ca 100 000 ggr högre halter än i det omgivande vattnet, får man en känslig och säker metod att upptäcka och kartlägga omfattningen av exponeringen. Exempel på substanser som med framgång har analyserats i galla från fisk i olika undersökningar är polycykliska aromatiska kolväten, klorfenoler och steroidhormoner (Stephensen *et al.* 2000; Oikari *et al.* 1987; Adolfsson-Erici *et al.* 2002; Larsson *et al.* 1999).

Det finns i dag ett stort intresse för alternativa avloppslösningar för att lösa frågan om hur när-salter som kväve och fosfor bättre kan tillvaratas och ingå i kretsloppet. Flera projekt pågår i Sverige och andra delar i världen med att fraktionera avloppsvatten genom att sortera ut urin för spridning på åkermark. I samband med detta har urinets innehåll av läkemedelsubstanser och -metaboliter diskuterats.

I detta projekt ville vi med kemisk analys i kombination med biologiska effektparametrar karakterisera avloppsvatten och utsorterad urin främst med avseende på östrogena substanser. Ett av syftena har varit att undersöka vilka reningssteg som bryter ner östrogenerna och de östrogenlika substanserna. Av särskilt intresse var varit att studera huruvida sandfiltersteget reducerar halten av den här typen av ämnen i avloppsvattnet. Sandfilter som ett sista reningssteg avskiljer en stor mängd mycket små partiklar ur avloppsvattnet med sammanlagd stor yta som bör ta med sig partikelbundna ämnen,

samtidigt som det i viss mån fungerar som ett biologiskt aktivt filter.

2 Material och metoder

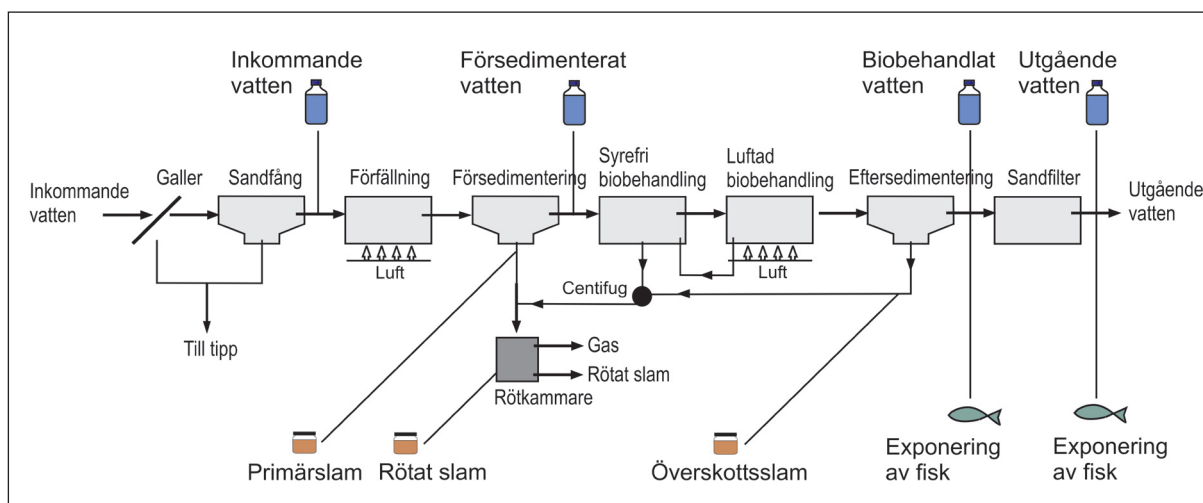
2.1 Undersökta reningsverk

Studien har utförts vid två kommunala reningsverk i Stockholm; Henriksdals och Bromma reningsverk. Båda är moderna reningsverk med likartade reningstekniker som innefattar rening med galler/sandfång, kemisk fällning med försedimentering, biologisk rening med fördenitrifikation och eftersedimentering samt sandfilter (figur 2-3). Primärslammet från försedimenteringen och det biologiska överskottsslammet behandlas genom rötning. Henriksdalsverket tog år 2000, när huvudförsöken utfördes, emot ca 260 000 m³ avloppsvatten dagligen (639 500 anslutna personer) och Brommaverket tog emot ca 130 000 m³/dag (282 000 anslutna personer). Till Henriksdal kommer ca 50 % av avloppsvattnet från hushåll och 5 % från mindre industrier. Brommaverket har jämförbara andelar hushålls (41 %) och industri-vatten (6 %). Henriksdal är att betrakta som ett lågbelastat reningsverk med en genomsnittlig total uppehållstid för avloppsvattnet på ca 28 timmar under år 2000, varav 19 timmar i bioreningen.

Bromma reningsverk, som normalt har kortare uppehållstid än Henriksdal (ca 11 timmar totalt i snitt under 2000), var vid tiden för exponeringsförsöken under ombyggnad vilket gjorde att belastningen på biostegen var högre än vanligt. Detta gjorde det möjligt att undersöka vad belastningen på biostegen har för betydelse för nedbrytning av östrogen och östrogenlika substanser i reningsverket.

2.2 Exponering och provtagning av fisk

Tre exponeringsförsök med fisk har utförts, två vid Henriksdals reningsverk och ett vid Bromma reningsverk. Vid det första exponeringsförsöket i Henriksdal bedömdes vattentemperaturen vara för hög för att ge representativa resultat, framför allt rörande enzymaktivitet och vitellogenin, varför försöket betraktas som ett förförsök. Ytterligare exponeringar av fisk utfördes därför vid Henriksdals reningsverk vid en årstid med kallare vatten. Samma år gjordes även exponeringsförsök vid Bromma reningsverk. Vid alla tre försöken exponerades icke köns mogna regnbågs-laxar i akvarier med genomflödessystem, för utgående renat avloppsvatten och för vatten taget före sandfiltret som är det sista reningssteget. I alla försöken exponerades två grupper om 20 st fiskar vid varje station. Förförsöket pågick i 21 dagar, den 16 juni till 2 juli 1999, medan de två huvudförsöken pågick i 28 dagar. Det första i Henriksdal mellan den 22 februari och den 21 mars 2000, och det andra i



Figur 2-1. Flödesschema för Bromma och Henriksdals reningsverk. Provtagningspunkter för vatten och slam är markerade med flaskor och burkar. Platserna för fiskexponeringsförsöken är markerade med fiskar.

Bromma mellan den 7 april och den 5 maj 2000. Parallellt med varje försök exponerades på samma sätt en grupp fiskar (20 st) för rent vatten som en kontroll. På den exponerade fisken provtogs blod, gallvätska och lever. Blod och lever togs som individuella prov medan gallan poolades könsvis till prov motsvarande 3-10 individer. Samma provtagningar genomfördes på kontrollfiskarna samt på 20 st fiskar den dag varje exponering startade ("före exponering").



Figur 2-2. Provtagning av fisk.

2.3 Provtagning av avloppsvatten och slam

Flödesproportionell provtagning av avloppsvatten gjordes kontinuerligt under exponeringsperioderna vid fyra punkter i reningsprocessen; ingående vatten, vatten efter försedimentering (före biologisk rening), biobehandlat vatten (före sandfilter) och utgående vatten.

Primärslam, biologiskt överskottsslam och rötat slam samlades in kontinuerligt under perioden. Alla prover samlades in i glaskärl för att undvika att proverna kontamineras av plasttillsatser. Glaskärlen var ytbehandlade invändigt (silaniserade) för att



Figur 2-3. Provtagning av avloppsvatten.

undvika förlust av substanser som binder till aktiva glasytor.

Ett antal delprover motsvarande tre dygn samlades in. Proverna förvarades frysta fram till analys. I fryshuset där vattenproverna förvarades, förväxlades proverna med en annan kunds, och en stor del av vattenproverna blev uthålla innan misstaget uppdagades. Ingående vatten saknas helt. Detta har till följd att någon massbalans inte har kunnat beräknas samt att ett sammanslaget prov representerande hela exponeringsperioden inte kunnat analyseras. Därför har ett antal delprover analyserats var för sig. För att kunna jämföra resultaten från slam- och vattenanalyserna med varandra har även slamanalyserna gjorts på ett antal delprov från samma tredygnsperioder som vattenproverna.

2.4 Provtagning av utsorterad urin och BDT-vatten

Inom ett projekt som syftade till att undersöka volymer och sammansättning av de olika avloppsfractionerna från det ekologiska kollektivhuset Gebers i Skarpnäck, Stockholm, togs prover från den

utsorterade urinen och från bad-, disk- och tvättvatten (BDT-vatten). Prover togs som veckosamlingsprover under två perioder: 13–19 oktober 2001 samt 20–26 oktober 2001. Urinblandningen hade en vattenhalt på ca 21 % (Andersson & Jenssen 2002).

Utsorterad urin hämtades också från Stockholm Vattens urintank vid Bornsjön. Där samlas urin från bl.a. ekobyn Understenshöjden och Stockholms shems radhusområde Palsternackan på Enskedefältet för senare spridning på åkermark. Urinet var lagrat i över ett år vid provtagningstillfället. Eftersom urinet skiftar sig när det lagras, togs prov från tre olika djup i tanken: vid ytan, på 1 m djup och vid botten. Totalt är tanken ca 2,5 m djup. Utspädningen är bedömd till 2,5–3 ggr med hjälp av kvävehalten som analyserades. Alla proverna frystes i väntan på analys.

2.5 Analys av vitellogenin i blod och EROD i lever

Vitellogenin, en biomarkör för östrogen påverkan, har mätts i blodplasman med ”enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA). Positiv identifiering av vitellogenin med ELISA konfirmerades med Western blotting (Parkkonen *et al.* 1999).

Ethoxyresorufin-O-deethylase aktiviteten (EROD), en biomarkör för exponering av xenobiotica, har mätts i lever med en direkt fluorimetrisk assay (Burke & Meyer 1974).

2.6 Analys av östrogena substanser i galla

Kemisk analys av östrogena substanser, både naturliga och syntetiska, har gjorts på fiskens gallvätskan. Gallvätskan hydrolyserades med enzymet β -glucuronidas för att spjälka konjugaten. Därefter tillsattes surrogatstandarderna d_2 -estradiol och d_{16} -bisfenol A, och de östrogena substanserna extraherades med organiskt lösningsmedel. Extrakten derivatiserades med ättiksyreanhydrid. Nonylfenol och bisfenol A analyserades på en gaskromatograf kopplad till en lågupplösande masspektrometer (GC/LRMS) medan östrogenerna analyserades på en gaskromatograf kopplad till en

högupplösande masspektrometer (GC/HRMS) för att nå den känslighet som de låga halterna krävde. I båda fallen gjordes analyserna med ”selected ion monitoring” (SIM) och ”electron impact”-jonisering (EI).

2.7 Analys av östrogena substanser i avloppsvatten

Från vattenproverna anrikades substanserna med en fastfasadsorbent (ENV+). Före anrikningen på ENV+ tillsattes surrogatstandarderna d_2 -estradiol och 4-n-nonylfenol, vattnet surgjordes och 2 % metanol tillsattes för att minska adsorption av substanserna till partiklar i vattnet. Substanserna eluerades från adsorbenten med organiskt lösningsmedel.

Råextrakten behandlades med fosfatbuffert (pH 8) för att minska mängden fria fettsyror. Därefter fraktionerades extrakten på gelpermeationskolonn som innebär storleksseparation med inslag av ett flertal andra retentionsmekanismer. Från gelpermeationskolonnen erhöles en ”fenol/hormon-fraktion”. Denna fraktion delades upp ytterligare med vätskekromatografi (HPLC) för att skilja de naturliga och syntetiska östrogenerna från nonylfenol och oktylfenol. Substanserna från båda fraktionerna derivatiserades med pentafluorobensoylklorid och analyserades på en gaskromatograf kopplad till en lågupplösande masspektrometer (GC/LRMS) med SIM och ”electron capture negative ionisation” (ECNI).

2.8 Analys av östrogena substanser i slam

Slam extraherades med organiska lösningsmedel enligt metod beskriven i Naturvårdsverkets rapport 3829. Som surrogatstandarder användes i det här fallet en isomer av triclosan som syntetiserats av Göran Marsh, Miljö kemi, Stockholms universitet och 4-n-nonylfenol. Råextrakten av slam behandlades liksom råextrakten av vatten med fosfatbuffert (pH 8) och fraktionerades på gelpermeationskolonn. ”Fenol/hormon-fraktionen” som erhöles från gelpermeationskolonnen fraktionerades inte vidare

utan derivatiserades direkt med pentafluorobensoylklorid och analyserades på GC/LRMS med SIM och ECNI.

2.9 Analys av substanser i urin och BDT-vatten

Substanserna anrikades med en fastfasadsorbent (ENV+) efter tillsats av surrogatstandarderna d₂-estradiol och 4-n-nonylfenol. Substanserna eluerades från adsorbenten med organiskt lösningsmedel. Extrakten delades upp i en fenol- och en syrafraktion. I syrafraktionen återfanns substanser som naproxen och ibuprofen, och i fenolfractionen östrogenerna samt triclosan m.fl. Efter derivatisering analyserades substanserna på GC/LRMS med SIM eller fullscan och EI eller ECNI.

2.10 Kvalitetssäkring

De använda metoderna validerades genom att spika prover med autentiska standarder för kontroll av utbyte i samtliga upprepningssteg. Blankar analyserades parallellt med proverna. Till proverna tillsattes surrogatstandarder för att justera för förluster i upprepningsstegen. Halterna beräknades genom att jämföra areor med autentiska standarder i olika koncentrationsintervall. I de fall autentiska standarder saknades gjordes tolkning av masspektra som jämfördes med litteraturuppgifter.

3 Resultat

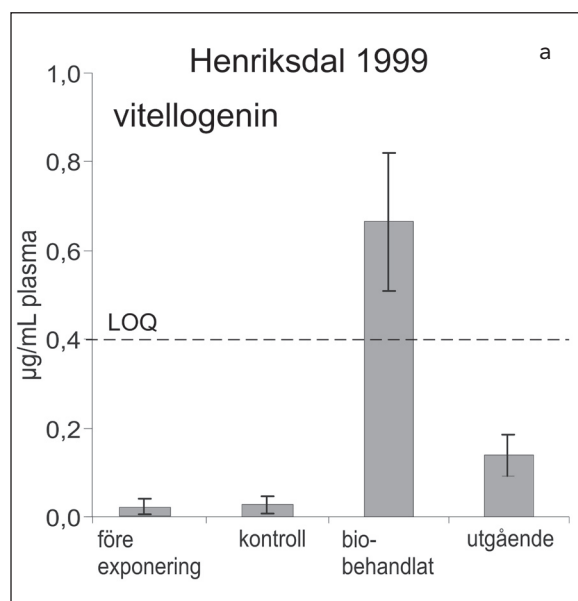
I projektet har de naturliga östrogenerna estron och estradiol, det syntetiska östrogenet etinylestradiol samt industrikemikalierna oktylfenol, nonylfenol och bisfenol A analyserats i utsorterad urin, BDT-vatten, avloppsvatten, slam och i galla från fisk som

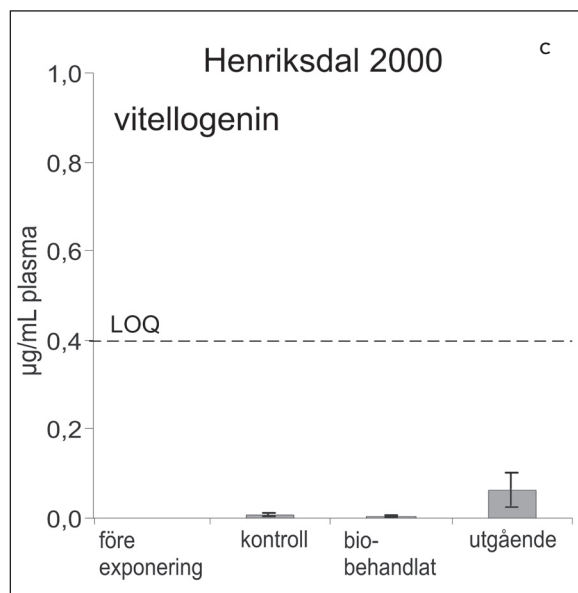
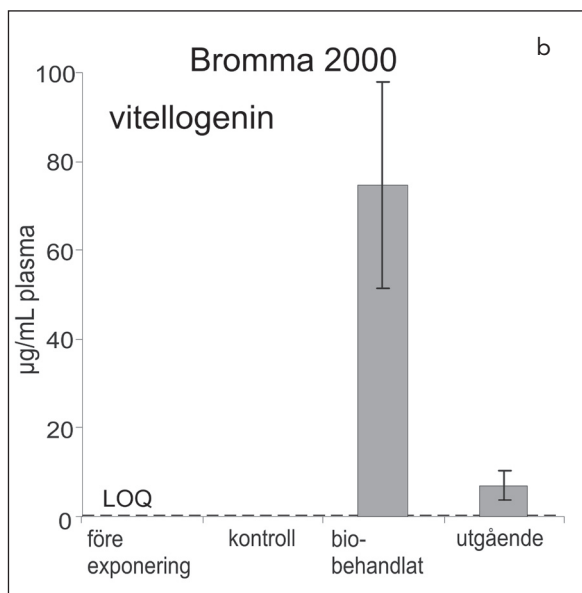
exponerats för avloppsvatten före och efter sandfilter. Ett antal andra substanser har samtidigt identifierats i urin, t.ex. de smärtstillande läkemedlen naproxen och ibuprofen (det verksamma ämnet i ipren) samt triclosan, det omdebatterade antibakteriella ämnet som används i bland annat tandkräm. Biomarkörerna vitellogenin och EROD har undersökts i fisken, som exponerats för avloppsvatten.

3.1 Biomarkörer

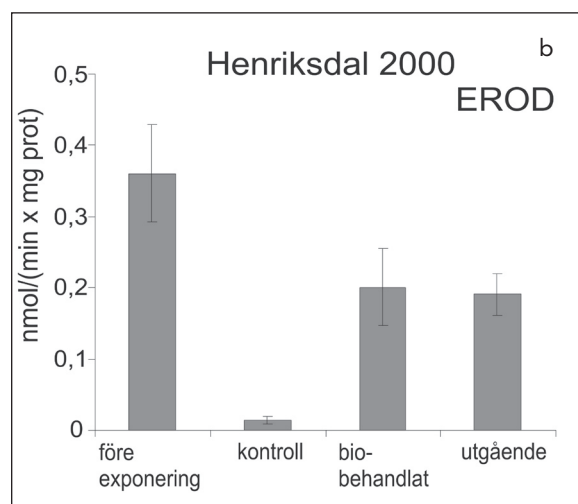
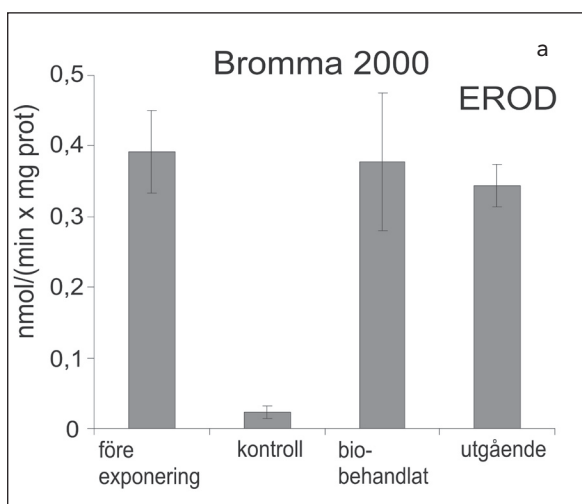
3.1.1 Vitellogenin i blod

Mätningarna av vitellogenin i blod från förförsöket vid Henriksdal visade att fisk exponerad för biobehandlat vatten hade varit utsatt för östrogena substanser i relativt låga halter. En något förhöjd halt av vitellogenin uppmättes i blod från fisk exponerad för utgående vatten, men den låg under gränsen för vad som definieras som östrogen påverkan (LOQ). Vid huvudförsöken som utfördes påföljande år kunde produktion av vitellogenin endast påvisas i fisk exponerad vid Bromma reningsverk. I fisk exponerad för biobehandlat vatten var produktionen av vitellogenin i Brommafiskarna ca 100 ggr högre än i Henriksdals reningsverk året innan, medan den var betydligt lägre i fisk exponerad för utgående vatten. Kontrollfisken och den fisk som provtogs på exponeringens startdag uppvisade ingen produktion av vitellogenin. (figur 3-1 a-c).





Figur 3-1 a-c. Vitellogenin i blodplasma från fisk. Halten anges i $\mu\text{g/mL}$ plasma. Staplarna visar medelvärden ($n = 8$), felstaplarna anger medelfelet. Kvantifieringsgräns (LOQ) = $0,4 \mu\text{g/mL}$.



Figur 3-2 a-b. EROD-aktiviteten i lever från fisk. Halten anges i $\text{nmol}/(\text{min} \times \text{mg protein})$. Staplarna visar medel värden ($n = 6$), felstaplarna anger standardavvikelsen med 95 % konfidensintervall.

3.1.2 EROD i lever

Resultaten visar att fisken hade utsatts för substanser som inducerar EROD redan före försökets början, men återhämtat sig efter 28 dagar i rent vatten (kontrollfiskar). Ingen återhämtning skedde i de exponerade fiskarna i Bromma, dock har en viss återhämtning skett i Henriksdal. (figur 3-2 a-b)

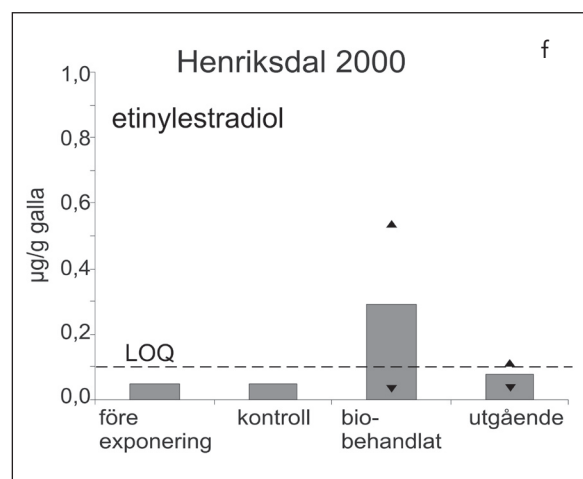
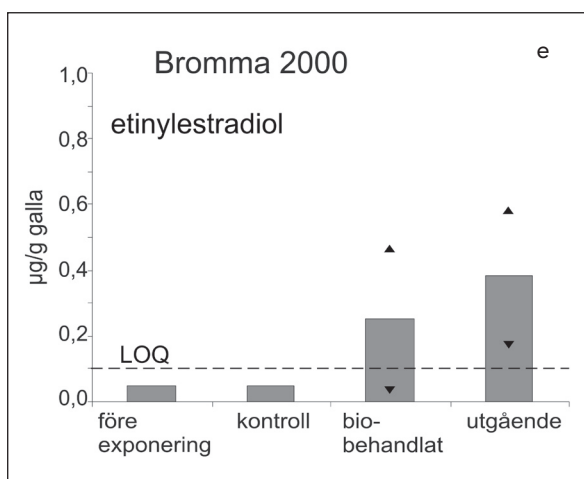
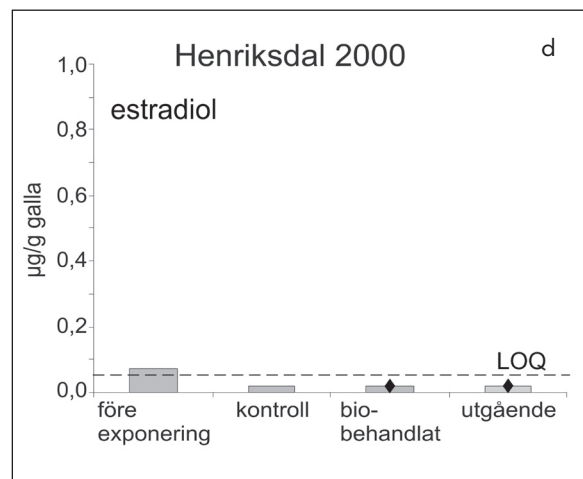
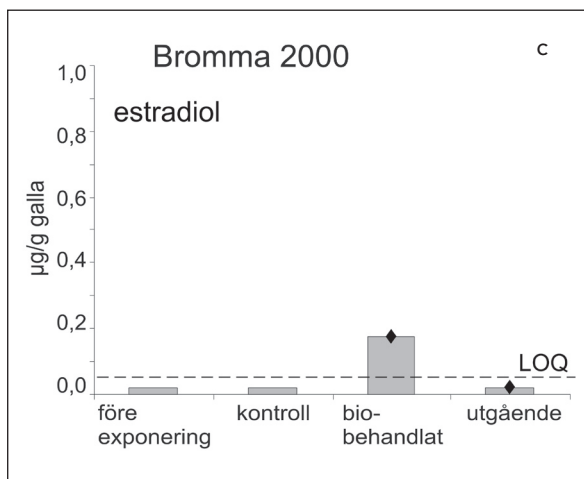
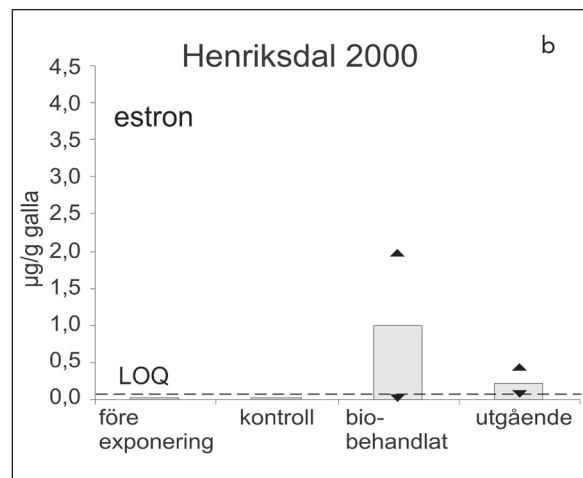
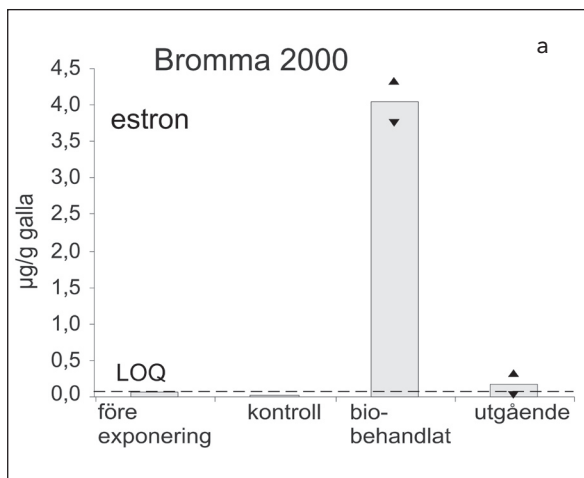
3.2 Kemiska analyser

3.2.1 Östrogena substanser i galla

Östrogena substanser identifierades i galla från all fisk som exponerats för avloppsvatten, generellt högre halter i fisk från försöken i biobehandlat vatten än i fisk som exponerats för utgående vatten. Hormonerna estron, estradiol och etinylestradiol analyserades i gallprover från huvudförsöken, och kunde då identifieras i fisk exponerad både i biobehandlat vatten

och i utgående vatten från båda verken (figur 3-3 a-f). De högsta halterna uppmättes i proverna tagna på fisk exponerad för biobehandlat vatten i Bromma. Högst koncentration hade estron (4,0 µg/g galla).

Betyddigt lägre halt av estron uppmättes i proverna från fisk exponerad för utgående vatten i Bromma (0,17 µg/g galla). I fisken som exponerats vid Henriksdals reningsverk var halterna av estron lägre i båda

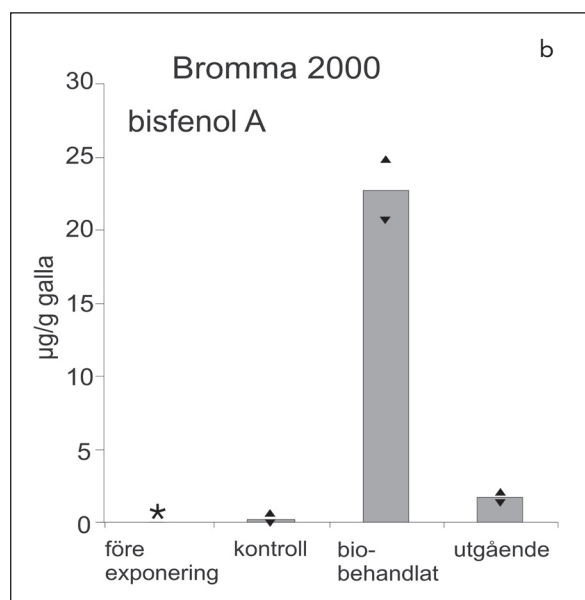
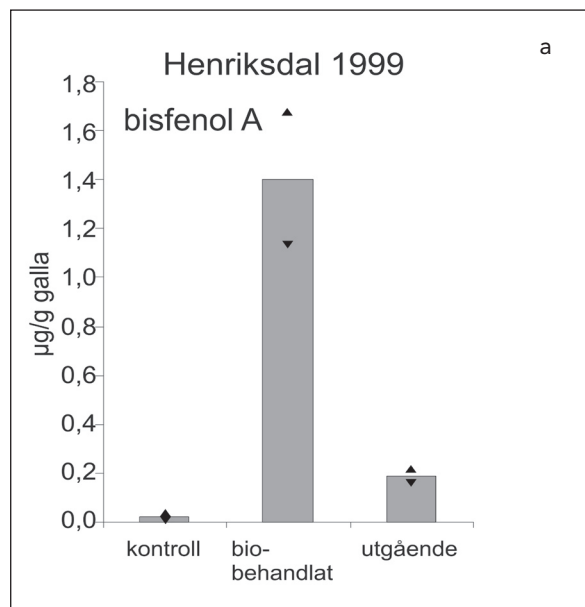


Figur 3-3 a-f. Östrogener i gallvätska från fisk. Halten anges i µg/g galla. Staplarna visar medelvärden för 2-3 poolade prov (n = 3-10), punkterna visar min- och max-värden. Textförklaringar: före exponering = fisk provtagen på försökets startdag, kontroll = fisk som hållts i akvarie med rent vatten under hela exponeringsperioden, biobehandlat = fisk exponerad för vatten taget efter biologisk rening, utgående = fisk exponerad för utgående vatten.

Kvantifieringsgränser (LOQ): estron och estradiol = 0,05 µg/g galla, etinylestradiol = 0,1 µg/g galla.

grupperna (0,99 µg/g galla respektive 0,23 µg/g galla). Kontrollfisk och oexponerad fisk innehöll bara låga halter av estron i båda försöken.

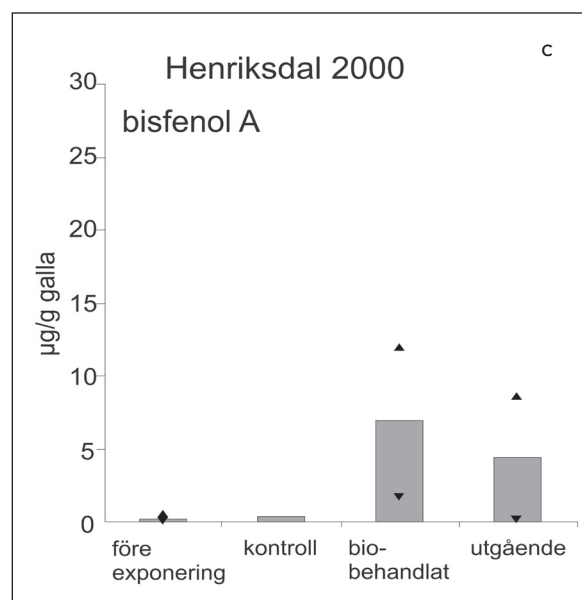
Koncentrationen av etinylestradiol i fisken exponerad för biobehandlat vatten var ungefär densamma vid båda reningsverken. Etinylestradiolhalten varierade mellan de två gallproverna från varje station, varför det är svårt att se någon skillnad mellan halten före och efter sandfiltret. Möjligen tyder resultaten på något lägre halter i utgående vatten vid Henriksdals reningsverk.



Koncentrationen av estradiol var under detektionsgränsen i gallproverna från alla grupper av exponerad fisk utom i de från fisk exponerad för biobehandlat vatten i Bromma.

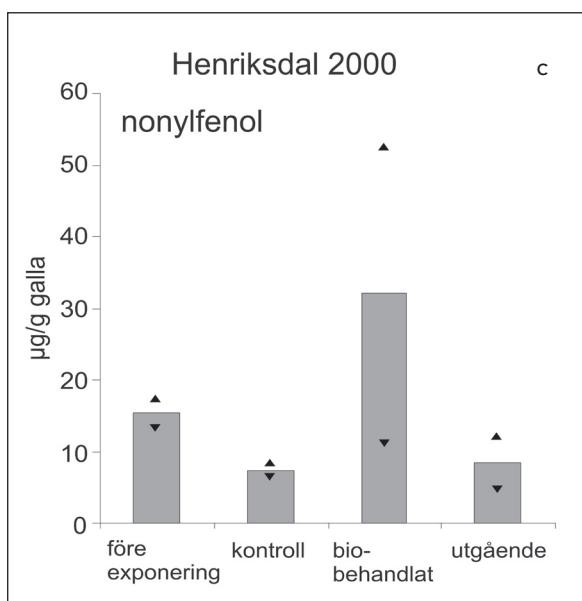
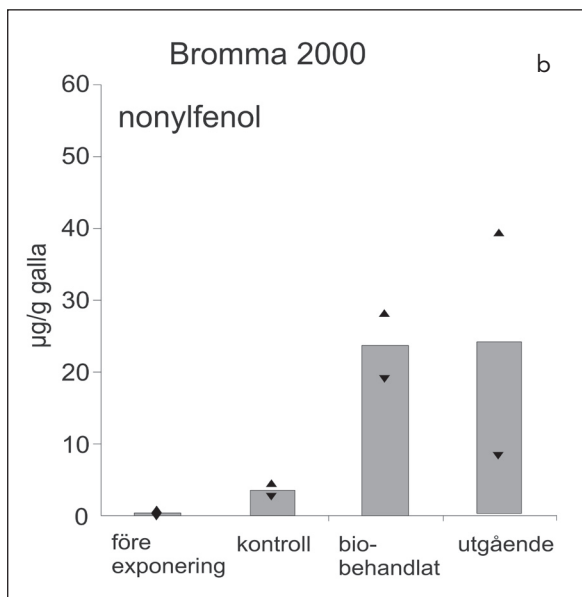
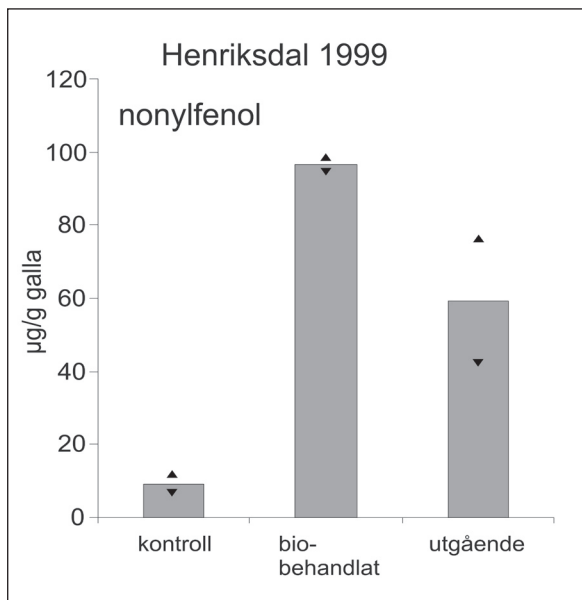
Bisfenol A identifierades i gallvätskan hos exponerad fisk från alla tre försöken (Figur 3-4 a-c). Halterna av bisfenol A i gallan var lägre i fisk exponerad vid förförsöket än i huvudförsöket. Vid förförsöket i Henriksdal och vid Brommaförsöket var halten av bisfenol A högre i gallvätskan från fisk exponerad för vatten före sandfilter. I huvudförsöket vid Henriksdal var spridningen för stor för att säkert kunna konstatera lägre halt efter sandfiltret. Koncentrationerna av bisfenol A i huvudförsöket var ca 50 ggr högre än för östrogenerna.

Även nonylfenol identifierades i gallvätskan hos exponerad fisk från alla tre försöken (se figur 3-5 a-c). Halten av nonylfenol var högre i fisken från förförsöket i Henriksdal än i den från huvudförsöket. I förförsöket vid Henriksdals reningsverk var halten av nonylfenol i fisken högre före sandfiltret än efter. Denna tendens fanns också i huvudförsöket vid Henriksdal, men denna skillnad var inte lika tydlig på grund av den stora spridningen mellan gallproverna. Inte heller vid Bromma reningsverk var det någon tydlig skillnad före och efter sandfilter. Oktylfenol analyserades inte i gallproverna.



Figur 3-4 a-c. Bisfenol A i gallvätska från fisk. Halten anges i µg/g galla. Staplarna visar medelvärden för 2-3 poolade prov (n = 3-10), punkterna visar min- och max-värden. Textförklaringar: före exponering = fisk provtagen på försökets startdag, kontroll = fisk som hållts i akvarie med rent vatten under hela exponeringsperioden, biobehandlat = fisk exponerad för vatten taget efter biologisk rening, utgående = fisk exponerad för utgående vatten.

*) Under detektionsgränsen. Kvantifieringsgräns (LOQ): bisfenol A = 0,1 µg/g galla.



Figur 3-5 a-c. Nonylfenol i gallvätska från fisk. Halten anges i µg/g galla. Staplarna visar medelvärden för 2–3 poolade prov (n = 3–10), punkterna visar min- och max-värden. Textförklaringar: före exponering = fisk provtagen på startdagen för försöket, kontroll = fisk som hållits i akvarie med rent vatten under hela exponeringsperioden, biobehandlat = fisk exponerad för vatten taget efter biologisk rening, utgående = fisk exponerad för utgående vatten.

Kvantifieringsgräns (LOQ): nonylfenol = 0,1 µg/g galla.

3.2.2 Östrogena substanser i avloppsvatten

Endast vattnen från huvudförsöken har analyserats. Tyvärr kunde inte inkommande vatten analyseras på grund av att proverna förolyckades som tidigare nämnts. Östrogena substanser återfanns i alla vattenprover från båda reningsverken (tabell 3-1). Inga resultat för estradiol redovisas då analysen stördes av interferenser från surrogatstandarden.

Högst koncentration av estron uppmättes i försedimenterat vatten från Henriksdals reningsverk. Även i vattenproven från Bromma reningsverk var koncentrationen av estron högst i försedimenterat vatten. Halten av estron i avloppsvattnet var lägre och ungefär lika i biobehandlat och utgående vatten vid båda reningsverken. Halten av etinylestradiol var vid båda reningsverken ungefär densamma i alla vattenprover.

Halten bisfenol A var högst i försedimenterat vatten från Bromma reningsverk, ungefär dubbla koncentrationen jämfört med försedimenterat vatten från Henriksdals reningsverk (tabell 3-1). Vid båda reningsverken var halterna betydligt lägre och ungefär lika i biobehandlat och utgående vatten.

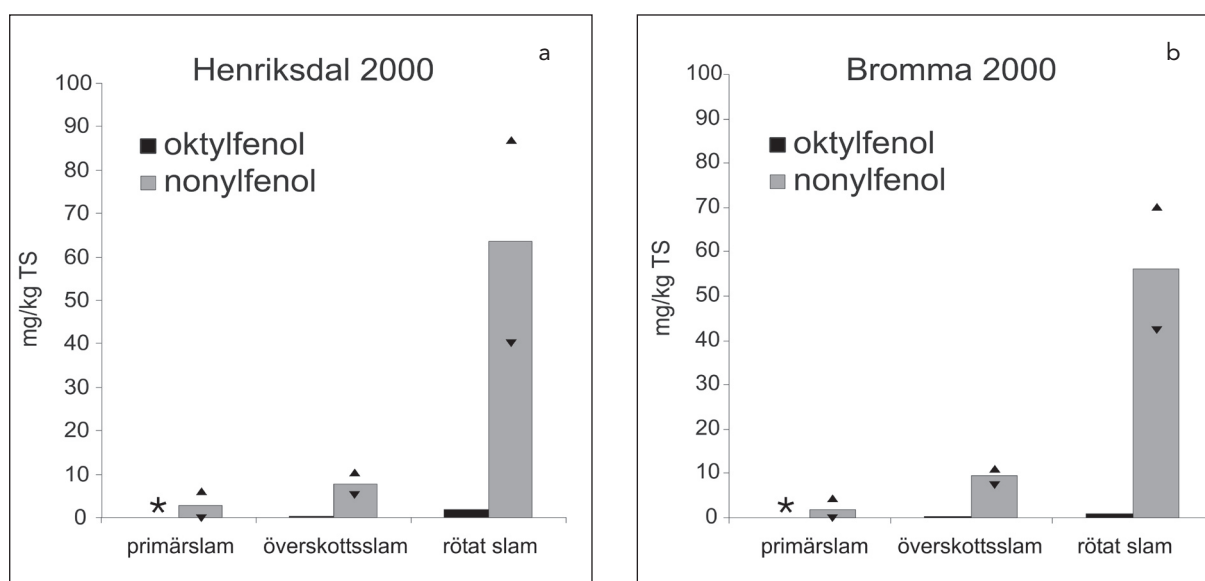
Koncentrationen av nonylfenol och oktylfenol i vattnet visar samma mönster vid båda reningsverken (tabell 3-1). Halten av nonylfenol är i alla vattenprover 5–10 gånger högre än halten av oktylfenol. Vid Henriksdals reningsverk är halterna av nonylfenol och oktylfenol ungefär desamma i försedimenterat, biobehandlat och utgående vatten medan de i Bromma är dubbelt så höga i det försedimenterade vattnet jämfört med biobehandlat och utgående vatten.

Tabell 3-1. Halter i avloppsvatten. Medelvärden av två delprov (3 dygn).

Reningsverk	Prov	estron ng/L	etinylestradiol ng/L	bisfenol A ng/L	nonylfenol ng/L	oktylfenol ng/L
Henriksdal	Inkommande	ea	ea	ea	ea	ea
	Försedimenterat	11	2,0	204	187	28
	Biobehandlat	1,1	2,1	33	221	43
	Utgående	2,2	2,6	≤ 15	160	19
Bromma	Inkommande	ea	ea	ea	ea	ea
	Försedimenterat	7,6	2,3	376	275	22
	Biobehandlat	3,0	2,5	≤ 15	44	0,8
	Utgående	3,8	2,2	≤ 15	108	7,1

ea = ej analyserat.

≤ Halt under eller på kvantifieringsgränsen .



Figur 3-6 a-b. Nonylfenol och oktylfenol i slam. Halten anges i mg/kg torrs substans (TS). Staplarna visar medelvärden av två delprov (3 dygn), punkterna visar min- och max-värden.

*) Under kvantifieringsgränsen.

Kvantifieringsgränser (LOQ): oktylfenol och nonylfenol = 0,1 mg/kg TS.

Tabell 3-2. Östrogener i slam. Medelvärden av två delprov (3 dygn).

Reningsverk	Prov	estradiol µg/kg TS*	estron µg/kg TS*	etinylestradiol µg/kg TS*	bisfenol A µg/kg TS*
Henriksdal	Primärslam	< 30	< 30	< 20	< 4
	Överskottsslam	< 30	< 30	< 20	< 4
	Röttslam	< 30	≤ 30	< 20	< 4
Bromma	Primärslam	< 30	< 30	< 20	< 4
	Överskottsslam	< 30	< 30	< 20	< 4
	Röttslam	< 30	≤ 30	< 20	< 4

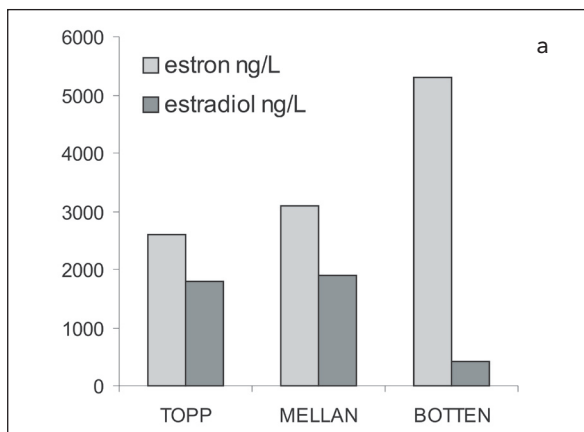
* TS = torrs substans.

≤ Halt under eller på kvantifieringsgränsen.

< Halt under kvantifieringsgränsen.

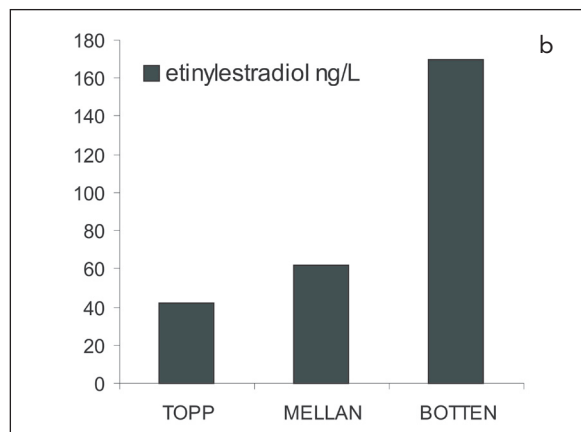
3.2.3 Östrogena substanser i slam

Liksom i vattnen visar koncentrationerna av nonylfenol och oktylfenol samma mönster, och halten nonylfenol är i alla slam ca 30 gånger högre än halten av oktylfenol (figur 3-6 a-b). Betyddigt högre halter av både oktylfenol och nonylfenol uppmättes i rötat slam, ca 5–10 ggr högre än i de andra slammen. Halterna av estradiol, estron, etinylestradiol och bisfenol A i slam var på eller under detektionsgränsen (tabell 3-2).



3.2.4 Substanser i urin och BDT-vatten

I lagrad urin från Bornsjötanken detekterades estron, estradiol och etinylestradiol i alla tre nivåer av tanken (figur 3-7 a-b). Halterna varierade mellan 0,4–5 µg/L för estron och estradiol. Halten av etinylestradiol var ca 10 ggr lägre. Av de östrogena substanserna kunde bara estron detekteras i utsorterad urin från Gebers, i betydligt lägre halt än i det lagrade urinet. I utsorterad urin från Gebers identifierades dessutom



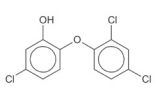
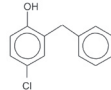
Figur 3-7 a-b. Östrogena i lagrad urin från Bornsjö. Topp = provtaget vid ytan, mellan = provtaget på 1 m djup, botten = provtaget på botten av tanken (2,5 m djup). Kvantifieringsgräns (LOQ): 5 ng/L urin.

Substans	Strukturformel	Prov	Halt
triclosan		A	+++
		B	++
koffein		A	+++
		B	+++
ibuprofen		A	++
		B	++
naproxen		A	+++
		B	++
N-butylbensensulfonamid		A	+++
		B	+++
2-hydroxy-xanton		A	+++
		B	++
estron		A	++
		B	++
kolesterol		A	++
		B	++

Figur 3-8. Identifierade substanser i utsorterad urin från Gebers. A och B motsvarar två veckosamlingsprov (++ ≈ 100 ng/L, +++ ≈ 1 µg/L).

substanser som baktericiden triclosan, de antiinflammatoriska substanserna ibuprofen och naproxen samt koffein, butylsulfonamid (förmodligen en metabolit av ett sulfapreparat) och hydroxyxanton, en naturligt förekommande biologiskt aktiv substans som kan förekomma i naturläkemedel (figur 3-8).

I BDT-vattnet kunde inga kända östrogena ämnen spåras. Däremot kunde ett antal ämnen som framförallt härrör från konserveringsmedel i konsumentprodukter detekteras, som t.ex. diklorbensoesyra, triclosan och bromfenoler samt den antiinflammatoriska läkemedelssubstansen ibuprofen (figur 3-9).

Substans	Strukturformel	Prov	Halt
triclosan		V2	++
		V3	+
ibuprofen		V2	++
		V3	-
bromfenol		V2	+
		V3	++
dibromfenol		V2	+
		V3	++
alkylerad bromfenol		V2	++
		V3	+++
klorofen		V2	-
		V3	+
diklorbensoesyra		V2	++
		V3	++++
tetra-klorhydrokinon		V2	+
		V3	++

Figur 3-9. Identifierade substanser i bad-, dusch- och tvättvatten (BDT-vatten) från Gebers. V2 och V3 motsvarar två veckosamlingsprov (+ ≈ 10 ng/L, ++ ≈ 100 ng/L, +++ ≈ 1 μ g/L, ++++ ≈ 10 μ g/L).

4 Diskussion

I denna undersökning har vi bland annat exponerat juvenil regnbågslox för avloppsvatten före och efter sandfilter under fyra veckor vid två reningsverk, och analyserat vitellogenin i blod och östrogena substanser i galla från fisken. Östrogen påverkan i fisk mätt som halten vitellogenin i blodet har använts i ett flertal andra undersökningar (t.ex. Thorpe *et al.* 2003). Innehållet av östrogena substanser i gallan är en spegling av den dos östrogena substanser som fisken har exponerats för (Larsson *et al.* 1999; Houtman *et al.* 2004).

Tidigare undersökningar har visat att de naturliga hormonerna estradiol, estron och det syntetiska hormonet etinylestradiol inducerar produktionen av vitellogenin, både i hannar och icke könsmogen fisk. Olika arter är olika känsliga för östrogenexponering och en av den känsligaste och mest undersökta arten är regnbågslox. Det har visat sig att etinylestradiol är ca 10–30 ggr mer potent än estradiol, som i sin tur är 2–3 ggr mer potent än estron, och den effekten verkar vara additiv. Etinylestradiol inducerar bildning av vitellogenin redan vid vattenhalter på 0,1 ng/L (Purdom *et al.* 1994). De industriella kemikalierna bisfenol A och alkylfenoler inducerar också vitellogenin, men vid en koncentration som är upp till 1 000 gånger högre än för estradiol (Sumpter & Jobling 1995). Det är dock svårt att jämföra olika studier med varandra, då dos/respons kurvan är exponentiell och påverkas av hur experimenten genomförs (van Bohemen *et al.* 1982; Pelissero *et al.* 1993; Purdom *et al.* 1994).

Den östrogena effekten av de industriella substanserna har i tidigare undersökningar ansetts bidra marginellt till den totala östrogena effekten av kommunala avloppsvatten trots att de förekommer i högre halter än de hormonella ämnena just för att den östrogena potensen är så pass mycket lägre.

Fisken som exponerats för avloppsvatten från Bromma reningsverk var påverkad av östrogena ämnen i betydligt högre grad än fisken som exponerats för avloppsvatten från Henriksdal. Det kan man sluta sig till eftersom blodet från fisken i Bromma innehöll högre halter vitellogenin samt att gallan

från fisken i Bromma innehöll högre halter östrogena substanser. Detta betyder förmodligen att Henriksdals reningsverk hade en effektivare avskiljning eller nedbrytning av östrogena substanser än Bromma, eftersom det inte finns anledning att förvänta sig att inkommande mängder av östrogena ämnen skulle vara högre i Bromma. Bromma använde bara hälften av sina biologiska bassänger vid undersöknings-tillfället på grund av en pågående ombyggnad, vilket gjorde uppehållstiden kortare än normalt. Det har i tidigare studier visats att uppehållstiden i biosteget har stor betydelse för reduktionen av östrogena substanser; lång uppehållstid ger bättre reduktion (Kirk *et al.* 2002). Att fisken som exponerats för utgående vatten, både i Bromma och Henriksdal, hade betydligt lägre halter vitellogenin, tyder på att sandfiltret reducerar mängden östrogena substanser.

Steroidhormoner, både naturliga och syntetiska, utsöndras från människa huvudsakligen som inaktiva glukuronid- och sulfatkonjugat. Dock har man i flera studier uppmätt hormoner i sin okonjugerade form i avloppsvatten från reningsverk. Mikroorganismer kan producera enzymer som har förmågan att omvandla steroidhormoner. Till exempel kan flera bakterier, t.ex. *Escherichia coli* som finns i faeces, bilda enzymet β -glucuronidas som har förmåga att hydrolysera glukuronidkonjugat till sin ursprungssubstans (Wakabayashi *et al.* 1961). Således kan detta enzym omvandla konjugerade östrogener till dess aktiva form i avloppsvatten och troligtvis sker denna omvandling redan i avloppsledningarna till reningsverket. Ternes *et al.* har påvisat dekonjugering av steroidhormoner i nedbrytningsstudier med aktivt slam (Ternes *et al.* 1999b). I försök där ”fathead minnows”-hannar (*Pimephales promelas*) exponerats för estradiolkonjugatet 17 β -estradiol-3-glucuronid uppmättes östrogen effekt (induktion av vitellogenin) hos fisken bara i närvaro av aktivt slam (Panter *et al.* 1998). I en tidigare studie, vid ett mindre reningsverk i Gråbo, där den exponerade fisken hade en kraftig vitellogenininduktion, uppmätte vi okonjugerade östrogener i det utgående vattnet, medan halten konjugerade östrogener låg under detektionsgränsen (Larsson *et al.* 1999).

Konjugerade hormoner är inte biotillgängliga för fisken, utan de hormoner som tas upp av fisken föreligger i sin fria, aktiva form. Fisken utsöndrar i sin tur dessa substanser åter igen som konjugat i gallan. Att fria östrogena substanser i vatten ackumuleras i fiskgalla har vi tidigare visat i en exponeringsstudie

där estron, estradiol, etinylestradiol och nonylfenol som doserats i ett akvarium hade ackumulerats i gallan hos fisken (Larsson *et al.* 1999).

Vid exponeringarna i både Bromma och Henriksdal kunde vi återigen identifiera estron, estradiol och etinylestradiol i gallan. Halterna var av samma storleksordning som i Gråbostudien, med högst halt av estron. Biokoncentrationsfaktorerna galla/vatten uttryckta som log BCF låg runt 5 i båda undersökningarna.

I denna studie var halterna av estron och etinylestradiol i renat avloppsvatten relativt låga, runt 4 ng/L respektive 2 ng/L. I Gråbostudien var halterna av estron 5,8 ng/L, estradiol 1,1 ng/L och etinylestradiol 4,5 ng/L i renat avloppsvatten (Larsson *et al.* 1999). Detta stämmer väl överens med andra undersökningar där halterna varierar från 1,4–9,3 ng/L för estron, 1,0–4,8 ng/L för estradiol och 1,0–9,0 för etinylestradiol (Belfroid *et al.* 1999; Desbrow *et al.* 1998; Kuch *et al.* 2001; Ternes *et al.* 1999a).

I reningsverken avlägsnas östrogener och östrogena ämnen från avloppsvattnet genom biologisk nedbrytning och adsorption till slam. I en nyligen publicerad rapport från danska Miljøstyrelsen (Kjølholt *et al.* 2004) finns en sammanfattning av dagens kunskap vad gäller nedbrytning och fördelning av östrogena ämnen i reningsverkens processer. Det kemiska fällningssteget tycks ha mycket liten reducerande effekt på både naturliga och syntetiska östrogener. Den huvudsakliga reduktionen sker i det biologiska steget och särskilt mycket minskar halterna i reningsverk byggda för kväverening, med lång uppehållstid och hög slamålder. Vader *et al.* (2000) har i laboratorieskala jämfört förmågan till nedbrytning av etinylestradiol hos ett anrikat nitrifierande aktivt slam med ett aktivt slam som hade mycket låg nitrifierande aktivitet. I det första fallet minskade halten av etinylestradiol från omkring 45 µg/L till 10 på två dygn. I det andra fallet erhöles ingen minskning. Både Kirk *et al.* (2002) och Svensson *et al.* (2003) visar också att val av sekundär behandling av avloppsvattnet har betydelse för nedbrytningen av östrogena substanser; aktivt slam är bättre än biobädd. Nedbrytningsgraden varierar också beroende på uppehållstiden i reningsverkets biologiska steg.

Vår undersökning tyder på att etinylestradiol är stabilare mot nedbrytning än de naturliga östrogenerna, vilket överensstämmer med andra undersökningar. Hypotesen stärks av att kvoten mellan

etinylestradiol och de naturliga hormonerna i avloppsvattnet i flera undersökningar är högre än de teoretiskt utsöndrade beräknade av von Rathner och Sonneborn (1979), vilket indikerar en snabbare nedbrytning av de naturliga hormonerna.

Även skillnader i nedbrytning av de naturliga hormonerna i avloppsvatten har konstaterats i flera undersökningar liksom i denna. Man har uppmätt högre halter av estron än estradiol i utgående avloppsvatten (Desbrow *et al.* 1998; Kuch *et al.* 2001). Detta beror troligen på att estron är stabilare än estradiol i reningsprocessen och att det sker en oxidativ omvandling från estradiol till estron. Detta har visats i experiment med aktivt slam (Ternes *et al.* 1999b). I en spansk undersökning (Carballa *et al.* 2004) minskade inte halten estron under reningsprocessen, vilket förklarades med ett nytillskott från nedbruten estradiol. Estradiolhalten däremot minskade från 3 ng/L till under detektionsgränsen. Den totala uppehållstiden i det spanska reningsverket, med ca 100 000 personekvivalenter, var 24 timmar och verket hade förfällning, aktivt slamsteg samt eftersedimentering.

Förutom uppehållstiden är adsorption och desorption till partiklar viktiga faktorer för den biologiska nedbrytningen av östrogena substanser i reningsverken. Kjølholt *et al.* (2004) redovisar att okonjugerade östrogener snabbt adsorberas till partiklar i avloppsvattnet och att omkring 50 % av estron, estradiol och etinylestradiol bör hamna i slamfasen i de danska reningsverk där slamdensiteten är 4 g/L i biobassängerna. Eftersom nedbrytningen sker i vattenfasen och är beroende av desorptionshastigheten från partiklarna är också denna en parameter som kan ha stor betydelse för nedbrytningshastigheten enligt rapportförfattarna.

I Stockholm Vattens reningsverk är slamdensiteten 2–3 g/L och följaktligen bör en något mindre andel av östrogenerna hamna i slammet, utgående från de danska beräkningarna. Någon fullständig materialbalans av de analyserade ämnena har inte kunnat göras eftersom proverna av inkommande avloppsvatten gick förlorade som beskrivits tidigare. Men om man räknar på halterna i utgående avloppsvatten och de mindre-än-värden som finns från slamanalyserna samt total mängd utgående avloppsvatten och producerat slam år 2000 blir resultatet att av den mängd etinylestradiol som lämnade reningsverken fanns < 42 % i slammet från båda verken. För estron blev motsvarande siffror < 68 % i Henriksdal och < 50 %

i Bromma. Den sammanlagda mängd etinylestradiol och estron som lämnade de båda reningsverken, med slam och renat avloppsvatten, var < 600 g respektive < 1000 g. För estradiol finns tyvärr inga analysvärden på avloppsvatten, men den totala mängden i slammet från de båda reningsverken kan maximalt ha uppgått till 440 g.

I sandfiltren i Henriksdal och Bromma filtreras en stor del av det kvarvarande suspenderade materialet bort i det eftersedimenterade avloppsvattnet. Försök vid Henriksdals reningsverk har visat att sandfiltren kan reducera den kvarvarande halten suspenderat material med upp till 95 %, men reduktionen beror mycket av hur hög halten är i vattnet innan det filtreras. Efter filtren är halten suspenderat material relativt stabil på omkring 2 mg/L. Sandfiltrens kornstorlek ligger mellan 1,2 och 1,8 mm och det är inte klarlagt hur stora partiklar de kan filtrera bort. Halten suspenderade ämnen mäts efter filtrering med MGA-filter som har en porstorlek på 1,6 µm. En del av de här aktuella substanserna kan vara associerade till mindre partiklar och kolloidalt material som till en del går rakt igenom sandfiltren. Svensson *et al.* (2003) redovisar ett försök där partiklar större än 20 µm inte befanns vara associerade med någon östrogen effekt.

Att avskiljningen fungerade bättre i Henriksdal än i Bromma, och att sandfiltret reducerar även dessa ämnen, syns tydligast på halterna av bisfenol A. Koncentrationen av bisfenol A i fiskgallan var betydligt högre i Bromma än i Henriksdal och den var tydligt lägre efter sandfiltret än före.

Nonylfenol reduceras delvis i sandfiltret. Detta syns tydligast i gallhalterna från exponeringen vid Henriksdal 1999. Avloppsvattenanalyser från 1999 saknas, men koncentrationerna i utgående avloppsvatten från Henriksdal och Bromma 2000 låg runt 100–160 ng/L. I utgående avloppsvatten från Gråboverket, som bland annat inte har sandfilter, var halten nonylfenol 800 ng/L.

I Bromma reningsverk var halterna av både nonylfenol och oktylfenol högre i avloppsvatten efter sandfilter jämfört med före. Detta kan förklaras med att en stor del av det försedimenterade avloppsvattnet under provtagningstiden på grund av ombyggnaden shuntades förbi bioreningen och gick direkt till sandfiltren. Nonylfenol och oktylfenol utgör nedbrytningsprodukter av nonyl- respektive oktylfenoletoxylater som ingår i kemtekniska produkter. Etoxylaterna är blandningar av molekyler med olika kedjelängder,

och i reningsprocessen kortas etoxykedjorna successivt ner till molekyler med en till två etoxyenheter samt till motsvarande etoxysyror (Ahel *et al.* 1994). I och med att etoxykedjorna blir kortare, blir molekylen mer fettlös och mer benägen att fastna på partiklar. I avloppsvattnet som nådde Brommas sandfilter kan man anta att alkylfenoletoxylaterna inte hade hunnit omvandlas till alkylfenoler i lika stor utsträckning som i Henriksdal. Därmed var de till större andel lösta i vattnet och kunde inte filtreras bort i sandfiltren. I sandfiltren finns en viss biologisk aktivitet som kan omvandla de kvarvarande etoxylaterna till alkylfenol. Halten nonylfenol i rötat slam i denna undersökning (runt 60 mg/kg TS) är högre än i de ordinarie analyser som görs varje månad på rötat slam från Stockholm Vattens reningsverk, som redovisar relativt stabila halter på mellan 20 och 30 mg/kg TS under senare år. Oktylfenolhalterna ligger generellt ca 10 ggr lägre i slam och vatten. Halterna av nonylfenol och oktylfenol är högre i rötat slam än i slam före rötning. Detta beror på att nedbrytningen av alkylfenoletoxylater fortsätter i rötammaren, så att de sista etoxygrupperna försvinner, varvid nonylfenol och oktylfenol återstår.

En annan anledning till att halterna av stabila ämnen i rötat slam ofta är högre än innan rötning är att det sker en betydande nedbrytning av organiskt material i rötprocessen, som gör att svårnedbrytbara föreningar anrikas.

Utan att analysera inkommande alkylfenoletoxylater av alla kedjelängder, är det svårt att göra materialbalanser. Giger *et al.* (1991), som haft möjlighet att analysera nonylfenoletoxylater med längre kedjelängder, har beräknat att i Schweiziska reningsverk med mekanisk och biologisk rening, men utan fosfatfällning, fördelar sig de nonylfenolekvivalenter som kommer in i reningsverket med 20 % till slammet, 40 % till utgående avloppsvatten och resten mineraliseras. I denna studies reningsverk, som dessutom har fosfatfällning och sandfilter, är det rimligt att anta att en betydligt större andel fördelas till slamfasen. Resultaten bekräftar dessa antaganden. Av den totala mängden nonylfenol som återstår i slam och utgående avloppsvattnet efter reningsprocessen återfinns mindre än 2 % i det renade avloppsvattnet. Resten har hamnat i slammet. Detta gäller både Bromma och Henriksdal.

I fisken som införskaffades från fiskfarmen uppmättes EROD-induktion redan innan försöken startades, förmodligen till följd av en påverkan av

PAH i östersjövattnet som fisken uppfötts i. I kontrollfiskarna, som fått gå i rent vatten i fyra veckor, minskade EROD-induktionen till nivåer som motsvarar opåverkad fisk. De fiskar som exponerats i Henriksdal hade återhämtat sig till viss del, något som inte hade skett i Bromma. Detta är ånyo en indikation på att Henriksdal har en effektivare nedbrytning och/eller avskiljning även vad gäller den typ av relativt persistenta ämnen som inducerar EROD-aktivitet. Resultaten tyder också på att avloppsvattnets innehåll av dioxinliknande ämnen inte är högre än Östersjöns, inte ens det från det högbelastade Brommaverket.

Analyserna av utsorterad urin konfirmerar vad tidigare undersökningar visat, nämligen att inaktiva östrogenkonjugat dekonjugeras till aktiva substanser. I den färskva urinen föreligger hormonerna i huvudsak som konjugat, men i den lagrade urinen fanns en relativt hög andel fria östrogener. Detta beror på att mikroorganismer bryter sönder de utsöndrade vattenlösliga konjugaten på liknande sätt som i avloppsvattnet

Urin sprids på åkermark utifrån vilken kvävehalt den har. Bonden vill ha ca 90 kg kväve per hektar och är beroende på gröda (Lennart Quarnström, Stockholm Vatten, personligt meddelande). I den lagrade urinen i våra försök var kvävehalten 2 600 mg/L vilket betyder att ca 35 m³ urin användes per hektar. Med denna urin hamnade i storleksordningen 100 mg estron, 50 mg estradiol och 3 mg etinylestradiol på varje hektar åker.

Vid konventionell slamgödsling är det framför allt fosforinnehållet bonden vill åt. Slam läggs dessutom ut bara vart sjunde år. Därför är det svårt att jämföra de båda gödningsmetoderna. Dessutom finns inget annat än mindre-än-värden från slamanalyserna. Men om man trots detta uppskattar den maximala mängd östrogener som kan nå en hektar åkermark vid slamspridning av en engångsgiva på 5 ton TS/ha blir det för estron, estradiol och etinylestradiol ≤ 164 , < 115 respektive < 66 mg. För estron och estradiol skulle de ackumulerade halterna vid urinspridning på samma åker i sju år bli högre än från slamspridningen om ingen nedbrytning skulle ske. För etinylestradiol, som är den mest persistenta av de tre, går det inte att avgöra vilken metod som skulle bidra till störst spridning. Eftersom jord utgör ett bra nedbrytande medium och både estron och estradiol bryts ned relativt lätt bör dock urinspridning som gödningsmetod inte medför större risk än slamspridning

vad gäller dessa substanser. Mer forskning behövs dock för att få ett bättre underlag och för att följa nedbrytningen i jorden.

5 Slutsatser

Fisken från Bromma reningsverk, med hög belastning på biosteget, visade förhöjda halter av vitellogenin i blodet både i exponeringsförsöken före sandfilter och i utgående renat avloppsvatten. Det betyder att fisken utsatts för östrogena ämnen. I Henriksdals reningsverk, med låg belastning och längre uppehållstid, låg vitellogeninhalterna under kvantifieringsgränsen. Jämfört med många andra undersökningarna var den östrogena effekten av renat avloppsvatten från båda verken relativt låg

Med kemisk analys påvisades att östrogena ämnen hade ackumulerats i fiskarnas galla. Dessa ämnen var de naturliga hormonerna estron och estradiol, det syntetiska hormonet etinylestradiol samt de industriella kemikalierna bisfenol A och nonylfenol. Halterna var generellt högre i fisken som exponerats före sandfiltren än efter. Analys av avloppsvatten taget före och efter sandfilter visar samma tendens om än mindre tydligt. Sandfilter tycks alltså vara ett viktigt extra reningssteg för den här typen av substanser både på grund av att de avskiljer partiklar och därtill adsorberade substanser, och för att en viss biologisk aktivitet i filtren bidrar till en fortsatt nedbrytningsprocess.

I urin utsöndras östrogener som konjugat som så småningom sönderdelas till fria aktiva hormoner. Efter lagring av utsorterad urin i urintank under ett år, finns de östrogena ämnena kvar. Spridning på åkermark av utsorterad urin utgör troligen inte större risk än konventionell slamspridning vad gäller tillförsel av de östrogena ämnena estron, estradiol och etinylestradiol.

Referenser

Adolfsson-Erici M., Pettersson M., Parkkonen J. & Sturve J. (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, 46, s. 1 485–1 489.

Ahel M., Giger W. & Koch M. (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment. I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Wat. Res.*, 28, s. 1 143–1 152.

Andersson Å. & Jensen A. (2002). *Flöden och sammansättning på BDT-vatten, urin fekalier och fast organiskt avfall i Gebers*. Examensarbete. Institutionsmeddelande 2002:05, SLU.

Balk L, Larsson Å. & Förlin L. (1996). Baseline studies of biomarkers in the feral female perch (*Perca fluviatilis*) as tools in biological monitoring of anthropogenic substances. *Marine Environ. Research*, 42(1–4), s. 203–208.

Baronti C., Curini R., D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A. & Samperi R. (2000). Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving water. *Environ. Sci. Technol.*, 34 (24), s. 5 059–5 066.

Belfroid A.C., Van der Horst A., Vethaak A.D., Schäfer A.J., Rijs G.B.J., Wegener J. & Cofino W.P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci. Tot. Environ.*, 225, s. 101–108.

Burke M.D. & Mayer, R.T. (1974). Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* 2, s. 583–588.

Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llopart M., Carcia-Jares C., Rodriguez I, Gomez M. & Ternes T. (2004). Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research* 38, s. 2 918–2 926.

Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P. & Waldock M. (1998). Identification Estrogenic chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environ. Sci. Technol.*, 32 (11), s. 1 549–1 558.

Förlin L., Anderson T., Balk L. & Larsson Å. (1995) Biochemical and physiological effects in fish exposed to bleached kraft mill effluents. *Ecotox Environ. Safety*, 30(2), s. 164–170.

Giger W. & Ahel M. (1991). *Behaviour of Nonylphenol Polyethoxylates and their metabolites in mechanical-biological sewage treatment*. Proceedings from Seminar on Nonylphenol-ethoxylates and nonylphenol, Grand Hotel Saltsjöbaden, s. 87–103.

Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tylor T. & Zaman N. (1997). Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 (3), s. 534–542.

Houtman C.J., van Oostveen A.M., Brouwer A., Lamoree M.H. & Legler J. (2004) Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. *Environ. Sci. Technol.*, 38 (23), s. 6415–6423.

Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G. & Sumpter J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.*, 32 (17), s. 2498–2506.

Kemikalieinspektionen (2001). *Lägesbeskrivning för avveckling av bly, bromerade flamskyddsmedel, kvicksilver, nonylfenoletoxilater, klorparaffiner*. Rapport från ett regeringsuppdrag. PM 1/01.

Kemikalieinspektionens produktregister

Kirby M.F., Allen Y.T., Dyer R.A., Feist S.W., Katsiadaki I., Matthiessen P., Scott A.P., Smith A., Stentiford G.D., Thain J.E., Thomas K.V., Tolhurst L. & Waldock M.J. (2004). Surveys of plasma vitellogenin and intersex in male flounder (*platichthys flesus*) as measures of endocrine disruption by estrogenic contamination in United Kingdom estuaries: temporal trends, 1996 to 2001. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23, s. 748–758.

Kirk L.A., Tyler C.R., Lye C.M. & Sumpter J.P. (2002). Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, s. 972–979.

Kjølholt J., Stuer-Lauridsen F. & Dueholm Blicher T. (2004). *Degradation of Estrogens in Sewage Treatment Processes*. Miljöprojekt No 899 2004, Miljøstyrelsen, Danmark.

Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.*, 35 (15), s. 3201–3206.

Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L. & Feldman D. (1993). Bisphenol-A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132 (6), s. 2279–2286.

Kuch H.M. & Ballschmiter K. (2001). Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.*, 35 (15), s. 3201–3206.

Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.-E. & Förlin L. (1999). Ethinylloestradiol – an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicol.*, 45, s. 91–97.

Lindholm C., Pedersen K.L. & Pedersen S.N. (2000). Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol.*, 48, s. 87–94.

Naturvårdsverket (1990). *Provtagnings- och analysmetoder för slam*. Rapport 3829.

Naturvårdsverket (1996). *Läkemedel och miljö*. Rapport 4660.

Noaksson E., Tjarnlund U., Bosveld A.T.C. & Balk L. (2001). Evidence for Endocrine Disruption in Perch (*Perca fluviatilis*) and Roach (*Rutilus rutilus*) in a Remote Swedish Lake in the Vicinity of a Public Refuse Dump. *Tox. Appl. Pharm.*, 174(2), s. 160–176.

Oikari A. & Kunnamo-Ojala T. (1987). Tracing of Xenobiotic contamination in water with the aid of fish bile metabolites: a field study with caged rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Aquatic Toxicol.*, 9, s. 327–341.

Panter G.H., Thompson R.S. & Sumpter J.P. (1998). Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicol.*, 42, s. 243–253.

Parkkonen J., Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.-E. & Förlin L. (1999). *Contraceptive pill residues in sewage effluent are estrogenic to fish*. 6th International symposium on the reproductive physiology of fish, Bergen, Norway, 7/4/99, s. 362–364.

Pelissero C., Flouriot G., Foucher J.L., Bennetau B., Donogues J., Le Gac F. & Sumpter J. (1993). Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 44, s. 263–272.

Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R. & Sumpter J.P. (1994). Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.*, 8, s. 275–285.

Quarnström L. (2004). Stockholm Vatten, personligt meddelande.

Socialstyrelsen (2001). *Läkemedel i miljön – En hälsorisk?* Rapport.

Stephensen E., Svavarsson J., Sturve J., Ericson G., Adolfsson-Erici M. & Förlin L. (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicol.*, 48, s. 431–442.

Sumpter J.P. & Jobling S. (1995). Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environ. Health Perspect.*, 103, s. 173–178.

Svenson A., Allard A.S. & Ek M. (2003). Removal of estrogenicity in Swedish municipal treatment plants. *Water Research*, 37, s. 4433–4443.

Ternes T.A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R.-D. & Servos M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Tot. Environ.*, 225, s. 81–90.

Ternes T.A., Kreckel P. & Mueller J. (1999). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Tot. Environ.*, 225, s. 91–99.

Thorpe K.L., Cummings R.I., Hutchinson T.H., Scholze M., Brighty G., Sumpter J.P. & Tyler C.R. (2003). Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ. Sci. Technol.*, 37, s. 1142–1149.

Vader J.S., van Ginkel C.G., Sperling F.M.G.M, de Jong J., de Boer W., de Graaf J.S., van der Most M. & Stokman P.G.W. (2000). Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge. *Chemosphere* 41, s. 1239–1243.

van Bohemen C.G., Lambert J.G., Goos H.J. & van Oordt P.G. (1982). Estrone and estradiol participation during exogenous vitellogenesis in the female rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol*, 46. 81–92.

von Rathner, M. & Sonneborn, M. (1979). Biologische wirksame Oestrogene in Trink- und Abwasser. *Forum Staedte. Hygiene* 30, s. 45–49.

Wakabayashi M. & Fishman W.H. (1961). The comparative ability of β -glucuronidaseglucuronidase preparations (Liver, *Escherichia coli*, *Helix pomatia*, and *Patella vulgata*) to hydrolyze certain steroid glucosiduronic acids. *J. Bio. Chem.*, 236, s. 996–1001.

White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P. & Parker M.G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135 (1), s. 175–182.

Williams R.J., Johnson A.C., Smith J.J.L. & Kanda R. (2003). Steroid estrogen profiles along river stretches arising from sewage treatments works discharges. *Environ. Sci. Technol.*, 37, s. 1744–1750.

Young W.F., Whitehouse P., Johnson I. & Sorokin N. (2004). *Proposed Predicted No-Effect-Concentrations (PNECs) for natural and synthetic steroid oestrogens in surface waters*. R&D Technical Report P2-T04/1, Environment Agency, UK.



Box 47607 117 94 Stockholm

Tfn 08 506 002 00

Fax 08 506 002 10

E-post svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se