



# rapport

IVL Svenska Miljöinstitutet AB

Hormonstörande effekter av  
skogsindustriella avloppsvatten i  
*in vitro*-test. Undersökningar av  
förekomst, ursprung och något  
om förhållandet till effekter *in vivo*

Anders Svenson, Ann-Sofie Allard och Malin Gunnarsson

B 1484

Stockholm, september 2002



<b>Organisation/Organization</b> IVL Svenska Miljöinstitutet AB IVL Swedish Environmental Research Institute Ltd.	<b>RAPPORTSAMMANFATTNING</b> <b>Report Summary</b>
<b>Adress/address</b> Box 21060 100 31 Stockholm	<b>Projekttitel/Project title</b>
<b>Telefonnr/Telephone</b> 08-598 563 00	<b>Anslagsgivare för projektet/ Project sponsor</b>
<b>Rapportförfattare/author</b> Anders Svenson Ann-Sofie Allard Malin Gunnarsson	
<b>Rapportens titel och undertitel/Title and subtitle of the report</b> Hormonstörande effekter av skogsindustriella avloppsvatten i <i>in vitro</i> -test. Undersökningar av förekomst, ursprung och något om förhållandet till effekter <i>in vivo</i> /Hormone disruption in Swedish pulp- and paper mill effluents tested <i>in vitro</i> . On the occurrence, origin and the relation to effects <i>in vivo</i>	
<b>Sammanfattning/Summary</b> <p><i>In vitro</i>-test baserade på rekombinanta jäststammar med gener för mänsklig androgenreceptor och östrogenreceptor <math>\alpha</math> har använts till att undersöka avloppsvatten från massa- och pappersbruk. Androgena effekter påvisades, men nivåerna var så låga att numeriska värden ej gick att beräkna vid normalutförande av test. Även toxiska effekter som hämmade jästcelltillväxt förekom. Försök att spåra substanser med androgen effekt visade att en heterogen samling ämnen med relativt låg lipofilitet förekom i separerade androgena fraktioner. Androgeniteten var alltför låg och sammansättningen av ämnen alltför komplex för att dessa skulle kunna identifieras. Undersökningar av dessa ämnens ursprung visade att råvattnet vid industriprocesserna sannolikt inte var källan. Test av androgenitet i prov av processvatten från tillverkning med rötskadad granved och humöst sjövattnet visade att ursprunget kunde vara ur ved. Test med dessa <i>in vitro</i>-metoder utfördes på gallprov från juvenil regnbåge som exponerats 3 veckor i burar placerade utanför avloppsvattenutsläpp. Ämnen med såväl östrogen som androgen aktivitet ansamlades i galla hos fiskar som exponerats för skogsindustriavloppsvatten.</p> <p><i>In vitro</i> tests based on recombinant yeast strains containing genes for the human androgen receptor and estrogen receptor <math>\alpha</math> were applied to testing of Swedish pulp- and paper mill effluents. Androgenicity was found in some effluents, but the levels were below the levels of quantification with the employed performance of testing. Fractionation of wastewaters again demonstrated androgenicity, but the effect was distributed in several fractions indicating a complex mixture of components with comparatively low lipophilicity. It was not possible to identify any of these components. The origin of the components was not likely the raw water used in the processes. However androgenic effects were found in a process water in production from rotting spruce wood and humic forest lake water indicating an origin in wood. Bile samples were taken from juvenile rainbow trout exposed to pulp and paper mill effluents for 3 weeks and tested for androgenicity and estrogenicity. It was found that both androgenic and estrogenic substances were accumulated in bile of these fishes.</p>	
<b>Nyckelord samt ev. anknytning till geografiskt område eller näringsgren /Keywords</b> Hormonstörning, androgen, östrogen, skogsindustriella avloppsvatten, <i>in vitro</i> , screentest, galla/Hormone disruption, androgen, estrogen, pulp and paper mill, effluent, screen test	
<b>Bibliografiska uppgifter/Bibliographic data</b> IVL Rapport/report B 1484	
<b>Beställningsadress för rapporten/Ordering address</b> IVL, Publikationsservice, Box 21060, S-100 31 Stockholm fax: 08-598 563 90, e-mail: <a href="mailto:publicationservice@ivl.se">publicationservice@ivl.se</a>	

**Innehållsförteckning**

Sammanfattning .....	2
1. Bakgrund .....	4
2. Metodik, material etc.....	6
3. Resultat och diskussion .....	7
3.1 Utveckling av testmetodik .....	7
3.2 Androgenitet av rena ämnen, m. m. i <i>in vitro</i> -test .....	9
3.3 Test av skogsindustriella avloppsvatten.....	9
3.3.1 Skogsindustri A.....	10
3.3.2 Skogsindustri B, C, D och E.....	11
3.3.3 Skogsindustri F .....	13
3.4 Högupplösande fraktionering.....	16
3.5 Androgenitet i humöst sjövattnet och råvattnet vid massatillverkningen .....	19
3.6 Androgenitet i processvattnet vid massatillverkning från rötskadad granved .....	20
3.7 Östrogenitet och androgenitet i galla av juvenil regnbåge som exponerats för skogsindustriavloppsvatten .....	21
4. Slutsatser och kommentarer.....	24
5. Tillkännagivanden .....	24
6. Referenser.....	25
Bilaga 1. Sammanfattning av produktions- och processdata för deltagande fabriker år 2000	
Bilaga 2. Data för de fullstora reningsanläggningarna vid de olika bruken under prov- tagningsperioden	

## Sammanfattning

Skogsindustriella avloppsvatten har undersökts avseende eventuella androgena och östrogena effekter i ett receptortest *in vitro*. Det är sedan tidigare känt att överskott hanar i populationer av tånglake i ett område i närheten av en massafabrik satts i samband med utsläpp av ämnen i avloppsvatten. Tidigare har också ombildning av fenor till hanliga parningsorgan hos honor av en amerikansk fiskart iakttagits nedströms en massaindustri i Florida. Androgena steroider har påvisats i sådana avloppsvatten.

I detta projekt har olika aspekter på hormonstörande inverkan av avloppsvatten från skogsindustrin och ämnen av vedursprung undersökts. Testmetoder med genmodifierade jästcellstammar som innehåller genen för människans androgenreceptor eller östrogenreceptor, dvs målen för hanliga respektive honliga könshormoner, samt en markör-gen, har utnyttjats. Vattenprov har insamlats från massa- och pappersindustrier med olika produktionsinriktning och reningsteknik för avloppsvatten. Extrakt bereddes av vattenproven. Androgentest på extrakt utfördes med dihydrotestosteron som positiv kontroll. En inledande (grov-) fraktionering utfördes även med några av vattenproven för att separera komponenter i vattenproven före test. Parallellt undersöktes några steroider och andra ämnen som förekommer i ved. I prov från två anläggningar erhöles svaga men reproducerbara test svar som visade på androgena effekter i *in vitro*-test. Indikationerna kunde bekräftas i test av separerade fraktioner. Testen påverkades av hämmande inverkan av (andra) ämnen som också förekom i vattenproven. Resultaten tyder på att androgena effekter åstadkoms av en heterogen samling ämnen (avseende lipofilitet) med måttligt lipofila egenskaper (ej särskilt svårösliga i vatten). I ved förekommande steroider som  $\beta$ -sitosterol och betulin ingår sannolikt inte bland dessa ämnen. Test av dessa ämnen i ren form vid halter upp till 200 mg/l gav ej utslag i test. Androgena ämnen kan vara mer allmänt förekommande i skogsindustriavloppsvatten än vad denna undersökning visat (2 av 6 anläggningar), då starkt hämmande inverkan kan dölja en androgen effekt i det test som använts.

Försök att spåra ursprunget till androgeniteten i avloppsvattnen visade att råvattnet till processerna sannolikt inte var källan. Istället visade test av extrakt av humöst sjövattnet och extrakt av processvattnet från kokning av lågkvalitetsved av gran att ursprunget kunde vara vedråvaran.

I en del av undersökningen har en tidigare studie av östrogeniteten i avloppsvatten kompletterats med test av upplagring av hormonpåverkande ämnen i galla. En ny metod för test av gallprov har inledningsvis utprovats och tillämpats på juvenil regnbåge som exponerats i avloppsvatten såväl utspätt som i de koncentrationer som råder nära utsläppspunkten för avloppsvattnet. I tre undersökta anläggningar erhöles förhöjda nivåer av östrogenitet i *in vitro*-test i galla vid exponering i burar, i två av dessa som under-

söktes med outspätt avloppsvatten erhöles också signifikant förhöjda nivåer. Tidigare undersökningar har visat att samma vatten ej åstadkom någon förhöjning av vitellogeninhalter, en ofta använd markör för östrogen effekt. Förhöjda nivåer i galla, fastän lägre än de som samtidigt ger vitellogeninbildning skulle kunna medföra andra oönskade störningar i hormonbalansen t. ex. vid längre tids exponering. Orienterande androgentest med extrakt av galla av fisk som exponerats för avloppsvatten från ett massabruk visade också en förhöjd androgenitet vid exponering.

## 1. Bakgrund

Utsläpp av ämnen som påverkar hormonregleringen av fysiologiska förlopp i vattenlevande organismer har under senare tid fått ökad uppmärksamhet. Vissa störningar i reproduktion och könsutveckling, såväl hanlig som honlig, hos fiskar har mer eller mindre klart satts i samband med sådana utsläpp.

Alla naturligt förekommande androgener är steroider med 19 kolatomer (Olsson m.fl. 1998). Hos däggdjur är det testosteron, som bildas från kolesterol i testiklarna men också från androstendion som produceras i binjurebarken, samt 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron som är de viktigaste androgenerna. Hos benfiskar förekommer också 11-ketotestosteron.

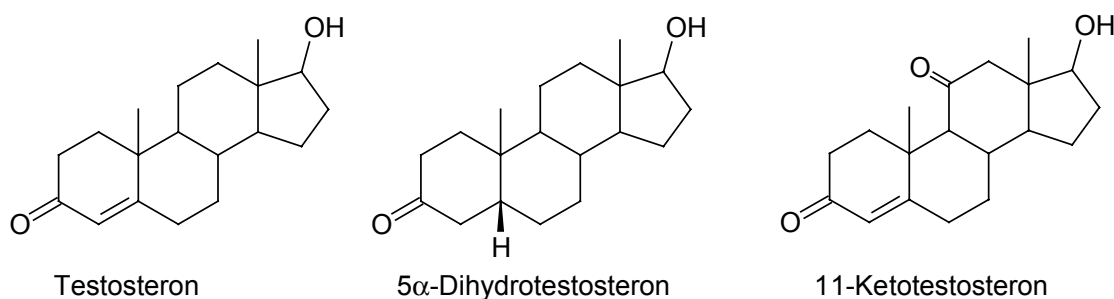


Fig. 1 Formler för tre viktiga androgener.

Medan testosteron produceras av såväl hanar som honor av fisk och till och med dominerar hos honor av flera arter, är halter av 11-ketotestosteron högre hos hanar. Detta hormon stimulerar sekundära könskaraktärer hos hanar av fisk och hos vissa arter även bildningen av mjölke och det hanliga lekbeteendet.

Under lekperioden tillväxer njurarna hos spigghanar och producerar ett "lim" som används för att bygga en yngelkammare i vilken rommen läggs av honorna. Denna förstoring av njurarna är en sekundär könskaraktär. Vid kastrering av hanar uteblir förstoringen men kan åter stimuleras vid tillförsel av androgener. Effektiviteten av olika androgener när det gäller att stimulera njurarna har studerats genom att injicera substanserna i kastrerade spigghanar (Borg m.fl. 1993). Av testade substanser var 11-ketotestosteron, 11-ketoandrostendion och 11 $\beta$ -hydroxyandrostendion de mest aktiva.

Endokrina störningar i form av maskulinisering av fisk har påvisats efter exponering för avloppsvatten från massatillverkning i USA. Ett antal studier har visat att honor kan utveckla hanliga sekundära könskaraktärer (Howell m.fl. 1980, Bortone m.fl. 1989, Cody och Bortone 1997). Hanliga sekundära könskaraktärer har påvisats hos vuxna honfiskar av en vild fiskart, mosquitofish, i ett vattendrag i Florida med utsläpp från en massa-industri (Howell m.fl. 1980). Vuxna honor var fenotypiskt maskuliniserade, t. ex. upp-

visade vissa väl utvecklade gonopodier dvs. analfenor omvandlade till parningsorgan som normalt förekommer hos hanar av denna fisk.

För att testa hypotesen att maskuliniseringen av naturliga populationer av fiskarten hade påverkats av androgena substanser i avloppsvattnet, exponerades nykläckta fiskar för förorenat vatten i laboratorieförsök (Drysdale och Bortone 1989). Efter ett antal veckor mättes analfenornas längd och en jämförelse med kontrollfiskar gjordes. Honor som fått växa upp i industriavloppsvattnet hade signifikant längre analfenor än honorna från kontrollgruppen. Däremot påverkades inte hanarnas fenutveckling.

Denton m.fl. (1985) exponerade honor av samma fiskart för fytosteroler som inkuberats tillsammans med en metaboliserande bakteriell stam. Honornas analfenor förändrades och fick ett utseende som hos hanar. När fiskarna exponerades för de rena fytosterolerna syntes inga förändringar på analfenorna. Detta visar att substanserna i sig inte var aktiva utan att det är omvandlingsprodukter från dessa som är androgena. Identifiering av vilka substanser som stod för de androgena effekterna har inte gjorts. Många fytosteroler kan dock lätt omvandlas t. ex. med oxidation till biologiskt aktiva metaboliter (Neilson och Hynning 1998).

En skev fördelning av antalet honor och hanar i fiskpopulationer utanför massaindustrier har också påvisats. En undersökning utanför en svensk massaindustri visade att det fanns en större andel hanar än honor av tånglakeyngel (Larsson m.fl. 2000). Hos fisk från två andra lokaler (referenslokaler) kunde inte en liknande snedfördelning påvisas.

Hormonella störningar hos mollusker har också rapporterats (Morcillo och Porte 1999). Musslor placerades i en hamn förorenad med främst tributyltenn under fem veckor. En snabb ackumulering av tributyltenn kunde observeras i musslorna. Mätningar av steroidhalter visade en kraftig ökning av testosteron och en minskning av östradiol. Detta tyder på att tributyltenn kan verka maskuliniserande på musslor.

Vid sidan av androgena hormoner har under ett antal år hormoner i den honliga könszykeln undersökts avseende förekomst i utsläppsmiljöer och påverkan på organismer i recipienter. Avvikande könskvoter till förmån för honor och ägganlag i hanlig könskörtlar är exempel på anomalier som knutits till utsläpp av naturliga eller fabricerade ämnen med östrogenverkan. I en av IVL ledd kartläggning av utsläpp från industrier och kommunala reningsverk kunde dock ingen östrogenitet vare sig mätt i *in vitro*-test med östrogenreceptorer eller *in vivo* som ökad produktion av näringsproteinet vitellogenin i ej könsmogen fisk säkerställas i avloppsvatten från sex undersökta skogsindustrier (Svenson m.fl. 2000).

Föreliggande projekt, som utgör en del av ett projekt om hormonella effekter i miljön, syftar till att undersöka eventuellt förekommande androgener i skogsindustriella avloppsvatten. Prov av avloppsvatten från olika massa- och pappersframställning har insamlats och testats avseende androgenhärmande effekter i ett screentestförfarande dels

direkt i extrakt av prov, dels efter inledande fraktionering av extrakt. Undersökningar av ursprunget till påvisade *in vitro*-effekter redovisas samt en studie av upplagring av hormoner i galla hos fisk som exponerats i skogsindustriellt avloppsvatten. Denna studie omfattar även östrogena effekter i *in vitro*-test.

## 2. Metodik, material etc.

För test av ämnen i ren form har följande substanser har erhållits av Risto Santti, Universitetet i Åbo:  $\beta$ -sitosterol, pinosylvin-O-metyler, betulin och ett extrakt innehållande lignaner.

Vattenprov insamlades från sex massa- och pappersbruk. Datum för provtagning och insamlingsmetodik har sammanställts i Tabell 1. Fabrikernas namn har givits bokstavs-beteckningar från A till F. En sammanställning över produktionsinriktning och renings-teknik ges i Bilaga 1 och 2.

Tabell 1 Skogsindustriavlopp för test av androgena effekter

Fabrik (kod)	Produktion/Vattenprov typ	Period	Anm
A	Papper, utgående	00-10-23 - 00-11-12	3 veckors flödesprop.
B	Liner, utgående	(00-11-14 leveransdatum)	Prov ingående i annat analysprogram
C	Kartong, sulfatmassa, utgående	00-10-31 – 00-11-20	3 veckors flödesprop.
D	Sulfatmassa, CTMP, utgående	00-11-04 – 00-11-24	3 veckors flödesprop.
E	Papper, utgående	00-11-04 - 00-11-25	3 veckors flödesprop.
F	Sulfatmassa, barrved, inkommande	00-09-19	stickprov
F	Sulfatmassa, barrved, utgående	00-09-19	stickprov
F	Sulfatmassa, lövved, inkommande	00-10-19	stickprov
F	Sulfatmassa, lövved, utgående	00-10-19	stickprov

Extraktion av vattenprov utfördes med fastfasmetodik i kolonner innehållande divinylbensen-polystyrenpolymer (0,2 g ENV+, Sorbent AB, Västra Frölunda) enligt en publicerad beskrivning (Körner m.fl. 1999). Prov (0,5-1 L) surgjordes till pH 3 och fick passera kolonnmaterialiet via en anordning med filter (20  $\mu$ m porositet) för avskiljning av större partiklar. Efter tvätt eluerades kolonnen med sitt innehåll av sorberade



komponenter ur provet med aceton. Eluatet försågs med 50 µL DMSO och acetonet indunstades. Prov förvarades därefter vid -18°C före test.

Vissa prov separerades i fraktioner före test enligt metodik som beskrivits tidigare (Svenson m.fl. 1996). Härvid användes fastfasteknik med 10 g Megabondelut-kolonner (Sorbent AB, Västra Frölunda). Prov av vatten (1-2 L) surgjort till pH 3 fick passera kolonnen och ämnen i prov sorberades till kolonnmaterialiet. Efter tvätt med 1 mM HCl eluerades kolonnen med 50 mL portioner av metanol-1 mM HCl-blandningar med ökande andel metanol (25, 50, 75, 85, 90, 95 och 100% metanol). I vissa fall avslutades elueringen med 100 % aceton.

Metodik har inarbetats för test av androgena effekter i prov av rena ämnen och komplexa miljöprover. En rekombinant jäststam innehållande genomet för mänsklig androgenreceptor och en markör-gen med enzymet β-galaktosidas har använts. Testmetodiken följer i huvudsak en publicerad beskrivning (Sohoni och Sumpter 1998). På 96-håls mikrotiterplattor doserades spädserier av prov och kontroller i rader av 12 hål. Som positiv kontroll användes dihydrotestosteron (DHT) i koncentrationsområdet 23 - 15000 ng/L. Spädfaktorn var 1,8 mellan varje testad koncentration. Medium innehållande jästceller men utan tillsatser av prov eller androgena ämnen utgjorde negativ kontroll (blank). Prov av extrakt av avloppsvatten testades också i (minst) 12 koncentrationer med en spädfaktor av 2,0 mellan varje testad koncentration. Betingelser för inkubering följde en tidigare beskrivning (Sohoni och Sumpter 1998). Androgen effekt i test avläses som en färgförändring (från gult till rött). Plattor avlästes vid våglängden 570 nm i en automatisk plattläsare och resultat av absorbansmätningar beräknades med icke-linjär regression. På detta sätt beräknades EC<sub>50</sub> för prov (uttryckt i antal gånger spädning). Detta värde jämfördes därefter med uppmätta EC<sub>50</sub>-värden för dihydrotestosteron (uttryckta i ng/L) och en effekt motsvarande en koncentration av detta ämne beräknades. Effekter i vattenprov kunde därefter anges i DHT-ekvivalenter (ng DHT/L).

Test av östrogenitet har utförts på liknande sätt med en jäststam som innehåller genen för människans östrogenreceptor (Routledge & Sumpter 1998, Svenson m.fl. 2000). 17β-Östradiol användes som positiv kontroll.

### 3. Resultat och diskussion

#### 3.1 Utveckling av testmetodik

Screenmetoden för test av androgena effekter *in vitro* prövades på dels en känd androgen, som dessutom användes som positiv kontroll, dels på några substanser med ursprung i ved. Fig. 2 visar ett exempel på doskurva för dihydrotestosteron samt nivå och spridning av en ej inducerad, negativ (reagens-) kontroll.

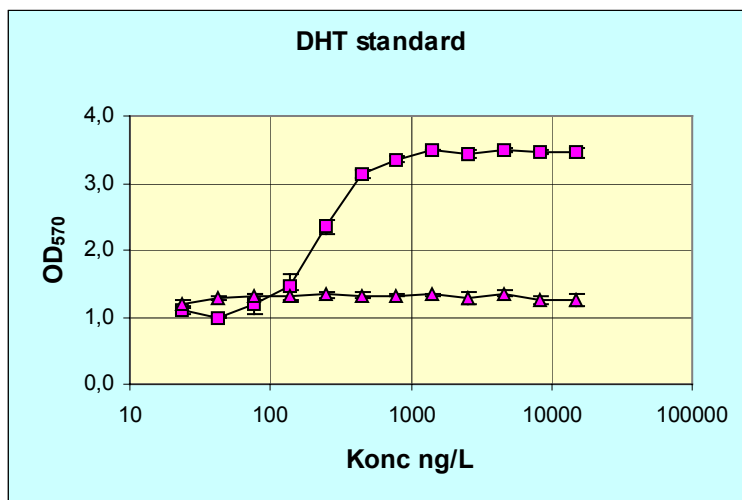


Fig. 2 Doskurva för dihydrotestosteron (DHT) och reagenskontroll. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg i test).

Bakgrundsnivån i utförda tester, mätt som absorbans i testmedium utan tillsatser av androgena ämnen eller okända prov, kunde variera mellan 0,5-1,2 mellan olika testtillfällen. Vid ett och samma tillfälle var variationen (standardavvikelsen) betydligt lägre,  $\pm 0,030$ . Förändringar (dosberoende) som är större än ca 3 ggr denna nivå, 0,10, bör därmed kunna anses som orsakade av androgen induktion.

Fullt inducerade celler gav mediet en framträdande röd färg som kunde mätas fotometriskt. Denna nivå låg på ca 3,5 absorbansenheter vid 570 nm (Se Fig. 2). Ur doskurvans branta del beräknades ett  $EC_{50}$ -värde, d.v.s. den koncentration av ett ämne där hälften av full induktion uppnåtts.

Tabell 2 Androgen effekt,  $EC_{50}$ , av dihydrotestosteron i jästcelltest med androgenreceptor

Antal test	106
$EC_{50}$ , medelvärde, ng/L (log-normal)	260
95% Konfidensintervall	230-300

I Tabell 2 ges resultat av 106 tester av dihydrotestosteron. Ett medelvärde och 95% konfidensintervall för detta ämne blev 260 ng/L (95% konfidensintervall 230-300 ng/L). Tidigare arbeten anger inte numeriska värden för test av naturliga androgener (Sohoni och Sumpter 1998). Enbart doskurvor redovisas. Med parallella test av den positiva kontrollen, dihydrotestosteron, och överföring av respons i test till motsvarande mängd eller halt av denna substans kan androgenitet i okända prov anges med detta test. Resultat av test av androgenitet i *in vitro*-test är inte direkt överföringsbara i androgena effekter på högre organismer. Sådana samband måste sannolikt upprättas för varje ämne eller provtyp.

### 3.2 Androgenitet av rena ämnen, m. m. i *in vitro*-test

Androgena effekter av rena substanser är endast litet kända och ofta kombinerade med eller ersatta av antiöstrogena effekter (Sohoni och Sumpter 1998). I samband med undersökningar av skogsindustrins utsläpp av ämnen med eventuella hormonstörande effekter var det motiverat att undersöka några sådana ämnen i ren form. Androgentest utfördes med dihydrotestosteron som positiv kontroll av substanser lösta i etanol. Lösningssmedlet indunstades före tillsatsen av jästceller.

Tabell 3 Androgenitet i *in vitro*-test av substanser med ursprung i ved i jästcellstest med androgenreceptor

Ämne	Högsta undersökta halt, mg/L	Androgen effekt
β-Sitosterol	200	ej påvisbar effekt
Betulin	200	ej påvisbar effekt
Pinosylvin-O-metyleter	125	ej påvisbar effekt
	200	hämmar vid halter över 125 mg/L
Extrakt innehållande lignaner	200	ej påvisbar
Vanillin	50	ej påvisbar effekt
Guajakol	50	ej påvisbar effekt

Resultaten har sammanfattats i Tabell 3. β-Sitosterol och betulin saknade androgen effekt vid test i koncentrationer upp till 200 mg/L, dvs koncentrationer som vida överstiger de som normalt påträffas i skogsindustriavloppsvatten. Ej heller hade det lignaninnehållande extraktet någon mätbar androgen effekt. Pinosylvin-O-metyleter saknade effekt eller kunde möjligen ha en svagt androgen effekt i kombination med en tillväxthämmande inverkan vid koncentrationer över 125 mg/L. Vanillin och guajakol inducerade ej receptorer i androgentestet. Eventuella androgena effekter i skogsindustriavloppsvatten, uppmätta med androgenreceptor, torde således sökas bland andra ämnen i utsläppen än de ovan undersökta. Under inkuberingen med modifierade jästceller förväntas testsubstanser ej metaboliseras. Eventuell androgenitet hos omvandlingsprodukter till de ämnen som testats har således inte undersökts.

### 3.3 Test av skogsindustriella avloppsvatten

Tidigare har vissa defekter på könsutveckling och reproduktion hos fisk satts i samband med utsläpp av ämnen med androgena effekter (se ovan). Det har därför varit motiverat att undersöka representativa prover av avloppsvatten från skogsindustrier. Screentest med jästceller innehållande androgenreceptorer har genomförts dels direkt på extrakt av vattenprov, dels efter en inledande grovfraktionering med syfte att separera och avskilja eventuella hämmande substanser. Test av extrakt upprepades för att undersöka reproducerbarheten i erhållna resultat.

Prover som ingick i undersökningen framgår av Tabell 1. Fabrikernas produktion och avloppsvattenbehandling framgår av Bilaga 1 och 2.

### 3.3.1 Skogsindustri A

Resultaten av screentest visade för Industri A en dosberoende androgen effekt i *in vitro*-test (Fig. 3) Nivån var jämförelsevis låg och t. ex. erhöles ej fullt utslag ens vid de högsta undersökta doserna. Ingen eller mycket låg hämmande inverkan förekom i detta vattenprov. Som framgår nedan extraheras även ämnen ur avloppsvatten som verkar hämmande på celltillväxten i androgentestet. Hämningen och den androgena effekten i ett prov är två motverkande faktorer som påverkar utseendet av doskurvorna. Den androgena effekten i prov från Industri A kunde reproduceras i upprepade test.

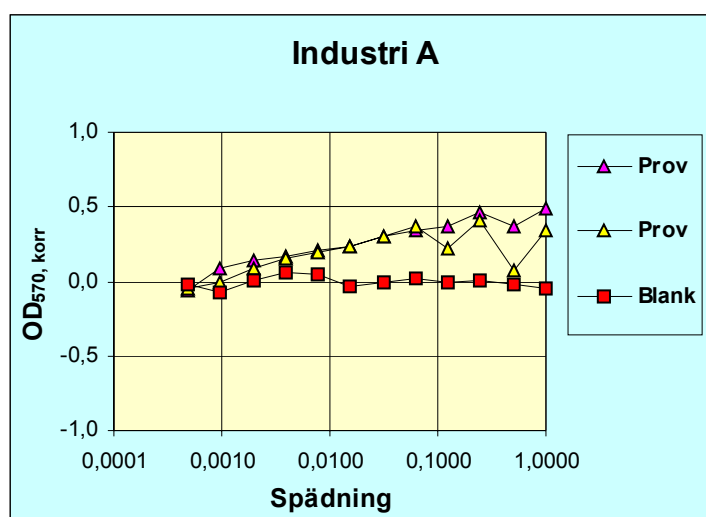


Fig. 3 Androgentest av extrakt av avloppsvatten från Industri A (dubbelprov). Spädserie av prov inkuberade med modifierade jästceller. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

Fraktionering av vattenprov med åtföljande test utfördes för att ytterligare underbygga iakttagelserna i tidigare test. Vattenprov fraktionerades med kolonnteknik och eluerade fraktioner undersöktes med androgentest. Som kontroll testades medium med samma sammansättning som eluatet. Variationen i testade kontrollprov blev  $\pm 0,035$  absorbansenheter ( $n = 7$ ), vilket överensstämde med variationen i negativa kontroller (se ovan). För att betraktas som signifikant skild från variationen i bakgrundsabsorption bör testvärden även här överstiga åtminstone 3 ggr denna nivå (0,1 absorbansenheter). Som ytterligare stöd vid tolkningen används fraktionsmönstren, dvs. effektens variation med metanolhalten i elueringsmediet.

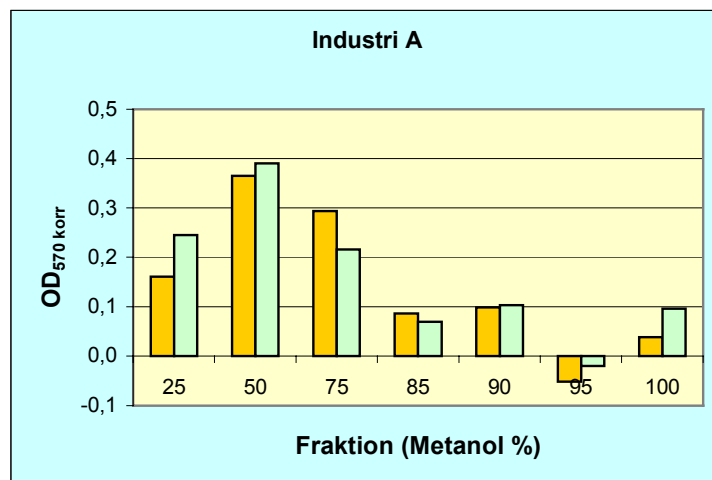


Fig. 4 Androgen effekt i fraktioner av avloppsvatten från Industri A. Fraktioner med alltmer ökande lipofilitet (svårlosligare i vatten). Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

Som framgår av Fig. 4 erhölls en androgen effekt fördelad i tre fraktioner i prov från Industri A. Dessa resultat visade 1) att flera aktiva ämnen troligen förekommer och 2) att dessa inte är starkt lipofila.

### 3.3.2 Skogsindustri B, C, D och E.

Någon androgen effekt kunde inte påvisas med *in vitro*-test i extrakt av vattenprover från Industri B, C, D och E, se Fig 5-8.

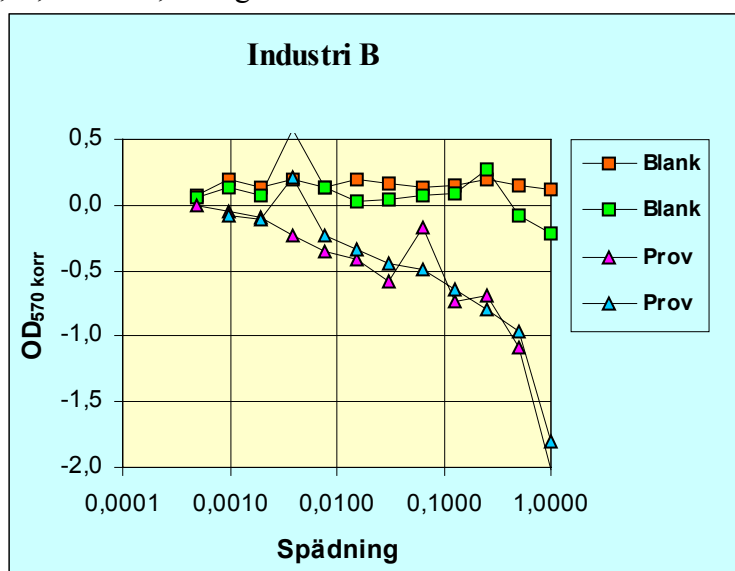


Fig. 5 Androgentest av extrakt av avloppsvatten från Industri B (dubbelprov). Spädserie av prov inkuberade med modifierade jästceller. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

Undersökningen visade dock att hämmande ämnen förekom i vattenprov från Industri B. Hämmande ämnen kan vara toxiska, tillväxthämmande ämnen eller specifikt hämmande ämnen av androgen effekt. Dessa tycks vara inhomogena, dvs. flera olika ämnen, kanske grupper av närbesläktade ämnen, förekom.

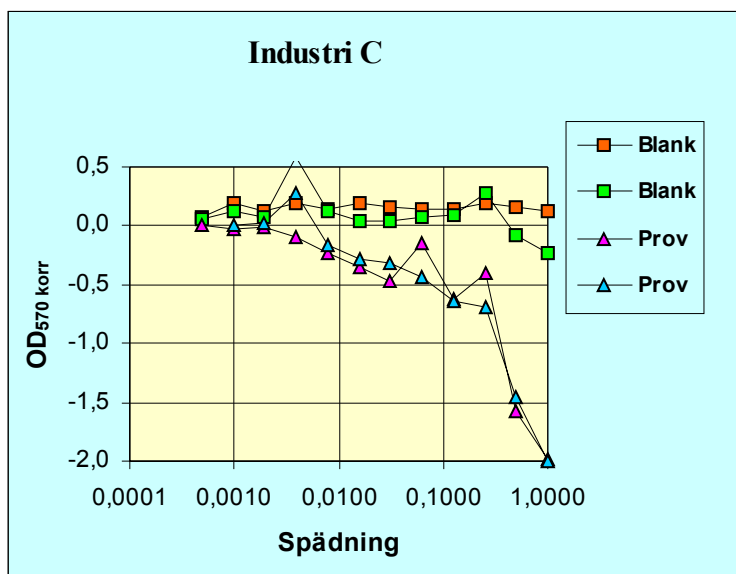


Fig. 6 Androgentest av extrakt av avloppsvatten från Industri C (dubbelprov). Spädserie av prov inkuberade med modifierade jästceller. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

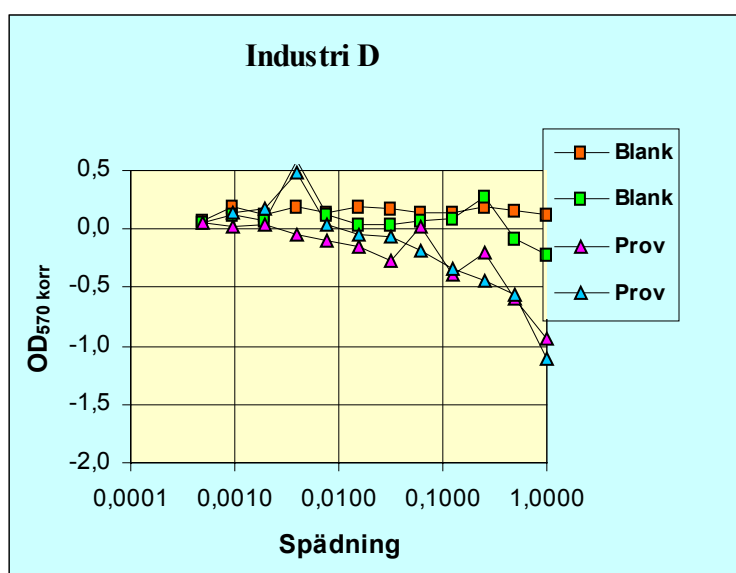


Fig. 7 Androgentest av extrakt av avloppsvatten från Industri D (dubbelprov). Spädserie av prov inkuberade med modifierade jästceller. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

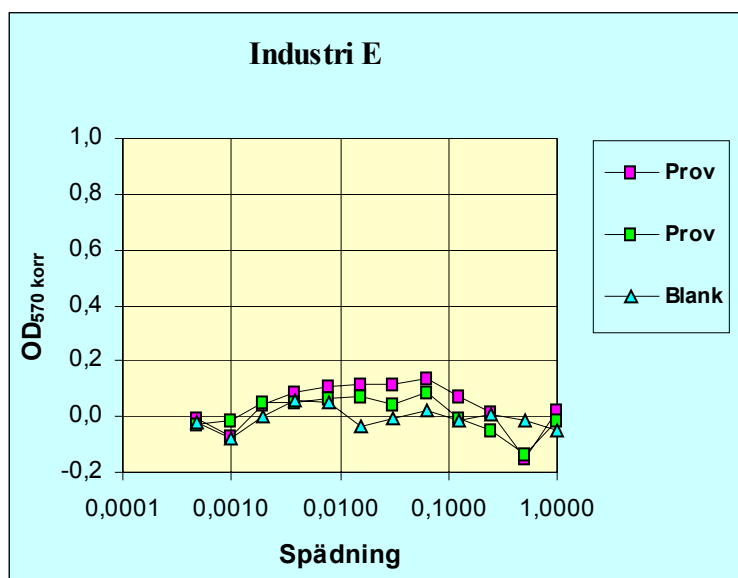


Fig. 8 Androgentest av extrakt av avloppsvatten från Industri E (dubbelprov). Spädsérie av prov inkuberade med modifierade jästceller. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

Vid de högsta undersökta doserna erhöles dock en störning i testet i form av en hämning (av celltillväxten eller av den androgena effekten). Denna skulle kunna dölja en (mycket svag) androgen effekt. Industri E saknade även denna hämmande effekt.

### 3.3.3 Skogsindustri F

Industri F lämnade prov av inkommande och utgående avloppsvatten vid produktion av såväl löv- som barrvedsmassa. Extrakt av avloppsvatten från massaproduktion av lövved visade ingen androgen effekt men test påverkades även här av hämning av celltillväxt vid högre doser, Fig 9.

Vid jämförelse av inkommande och utgående avloppsvatten framgår det (Fig. 9) att ämnen som hämmar i androgentestet minskade efter behandlingen av avloppsvattnet.

Avloppsvatten från massaproduktion av barrved indikerade en svag androgen effekt i testet (Fig. 10). Effekten framgick ej i obehandlat prov troligen beroende av en kraftigt hämmande inverkan (på celltillväxten) i test av det obehandlade provet.

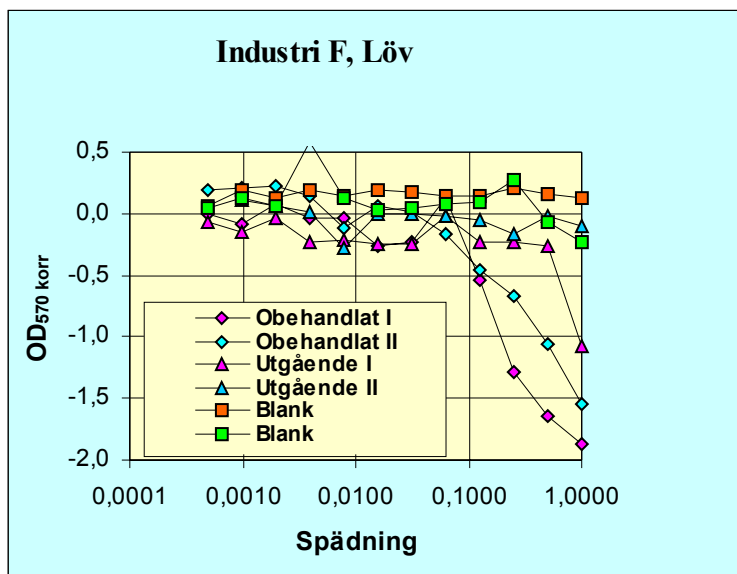


Fig. 9 Androgentest av extrakt av avloppsvatten från massatillverkning av lövved vid Industri F (dubbelprov) före såväl som efter behandling. Spädserie av prov inkuberade med modifierade jästceller. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

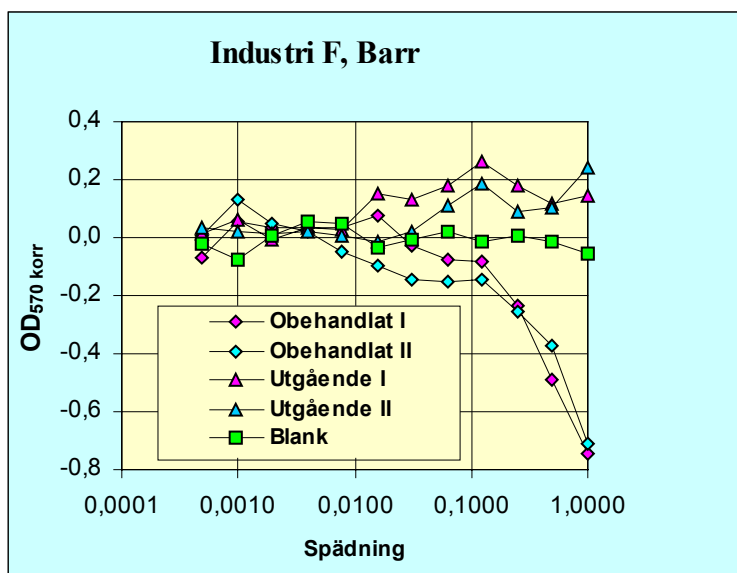


Fig. 10 Androgentest av extrakt av avloppsvatten från massatillverkning av barrved vid Industri F (dubbelprov) före såväl som efter behandling. Spädserie av prov inkuberade med modifierade jästceller. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.



Den svaga indikationen på en androgen effekt i extrakt av avloppsvatten från massaproduktion av barrved undersöktes vidare efter fraktionering av vattenprov. Ämnen i provet separerades i fraktioner med varierande lipofilitet och resultatet visas i Fig. 11 och 12.

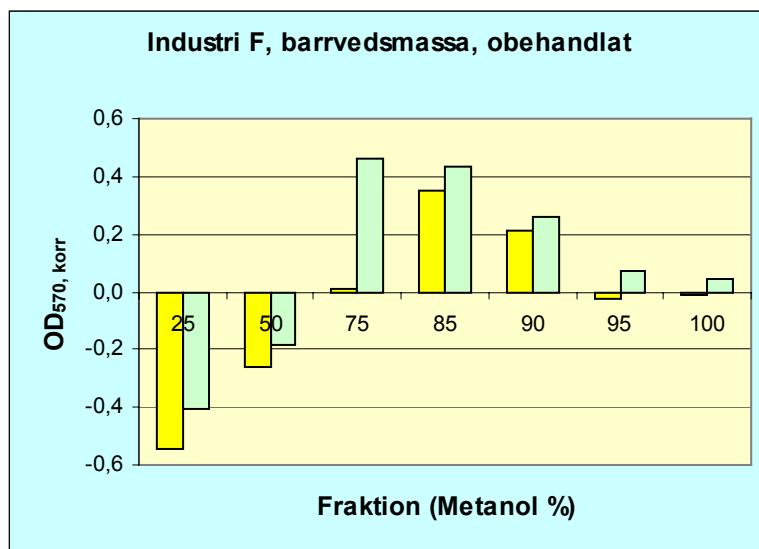


Fig. 11 Androgen effekt i fraktioner av obehandlat avloppsvatten från massatillverkning av barrved vid Industri F. Fraktioner med alltmer ökande lipofilitet (svårlosligare i vatten). Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

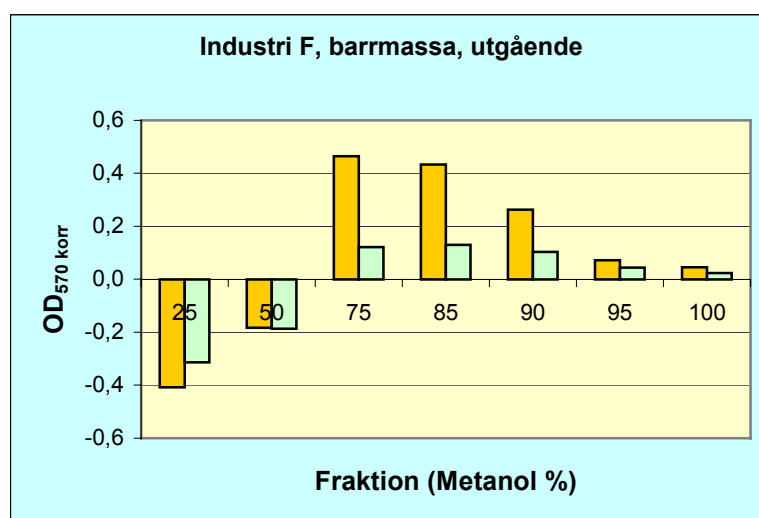


Fig. 12 Androgen effekt i fraktioner av behandlat avloppsvatten från massatillverkning av barrved vid Industri F. Fraktioner med alltmer ökande lipofilitet (svårlosligare i vatten). Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

Denna undersökning visade att obehandlat prov innehöll ämnen med androgen effekt som i tidigare test doldes av ämnen med hämmande inverkan. Efter separation av hämmande ämnen, främst i fraktionerna som eluerats med 25 och 50 % metanol, framträdde fraktioner med androgena effekter, nämligen de som eluerats med 85 och 90% metanol (troligen också den som eluerats med 75% metanol).

Den androgena effekten framträdde även efter behandlingen av avloppsvattnet (Fig. 12). Även i detta avloppsvatten separerades hämmande ämnen från ämnen med androgen effekt. Dessa senare var något mer lipofila än de ämnen som hämmade i androgentestet, men måste ändå anses som måttligt lipofila (måttligt svårslösliga i vatten).

### **3.4 Högupplösande fraktionering**

Prov av androgena fraktioner från separation av avloppsvatten från Industri A kromatograferades på HPLC för att karakterisera egenskaper hos aktiva komponenter och eventuellt preparera material för kemisk identifiering. Syftet var också att eventuellt kunna separera tillväxthämmande komponenter från aktiva androgener i avloppsvattnet. Separationen utfördes med en semipreparativ C<sub>18</sub> kolonn med en gradient av metanol i 5 mM natriumfosfat-natriumklorid, pH 3 enligt metodik som tidigare beskrivits (Svenson m.fl. 1996).

Resultaten av separation med HPLC av fraktioner som eluerats med 25, 50 och 75 % metanol ges i Fig. 13.

Resultaten gav en relativt otydlig bild av androgena komponenter i aktiva fraktioner. Kromatogrammen visade att komponenterna består av en komplex blandning med varierande lipofilitet, men huvudsakligen relativt vattenlösliga (litet lipofila). Androgena effekter i proven fördelades i ett flertal fraktioner, varigenom uppmätta nivåer i var och en blev i motsvarande grad lägre. Prov som eluerats med 25 % metanol i SPE eluerades på HPLC huvudsakligen mellan #11-30 utan markerade distinkta toppar. Fraktion 5-8 antydde också androgent innehåll, särskilt om låg uppmätt absorbans i fraktion 9-10 kan tolkas som en tillväxthämning, om denna också påverkar absorbansen i fraktionerna 5-8.

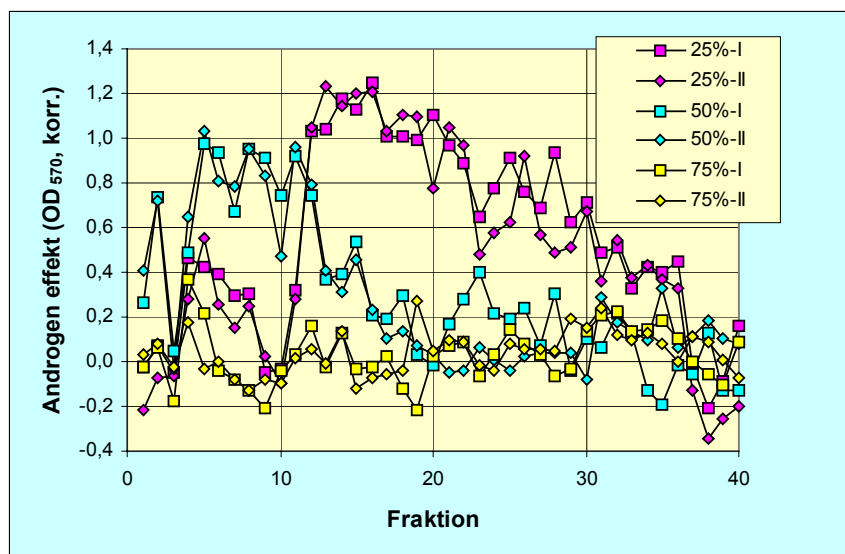


Fig. 13 HPLC-kromatogram över prov av fraktioner som eluerats med 25, 50 resp. 75 % metanol i tidigare SPE-fraktionering av behandlat avloppsvatten från Industri A (se Fig. 4), duplikat. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov. Olika gradienter användes vid separationen (Svenson et al. 1996).

Prov som eluerats med 50 % metanol innehöll vid HPLC-fraktionering androgena komponenter som eluerades i #5-12. Även #2 hade en signifikant nivå av absorbans vid 570 nm, medan #3 antydde tillväxthämning. Prov som eluerats med 75 % metanol saknade signifikant induktion av androgenreceptorn utom möjligen i #4-5 där en liten topp antyds. Sannolikt var den androgena effekten från början så låg att den ej gick att spåra efter uppdelningen i flera nya fraktioner vid HPLC. Även prov som eluerats med 85 % metanol kromatograferades med liknande resultat (diagram ej redovisat).

Induktion av androgenreceptorn å ena sidan och hämrad celltillväxt å andra sidan har sannolikt varit avgörande för kromatografimönstren i Fig. 13.

Androgena fraktioner av prov som ursprungligen eluerats med 25 och 50 % metanol uppsamlades var för sig och kromatograferades ytterligare en gång med HPLC för att ytterligare öka separationen och renheten i enskilda fraktioner. Härvid användes en snävare gradient vid eleringen. Resultaten ges i Fig 14 och 15.

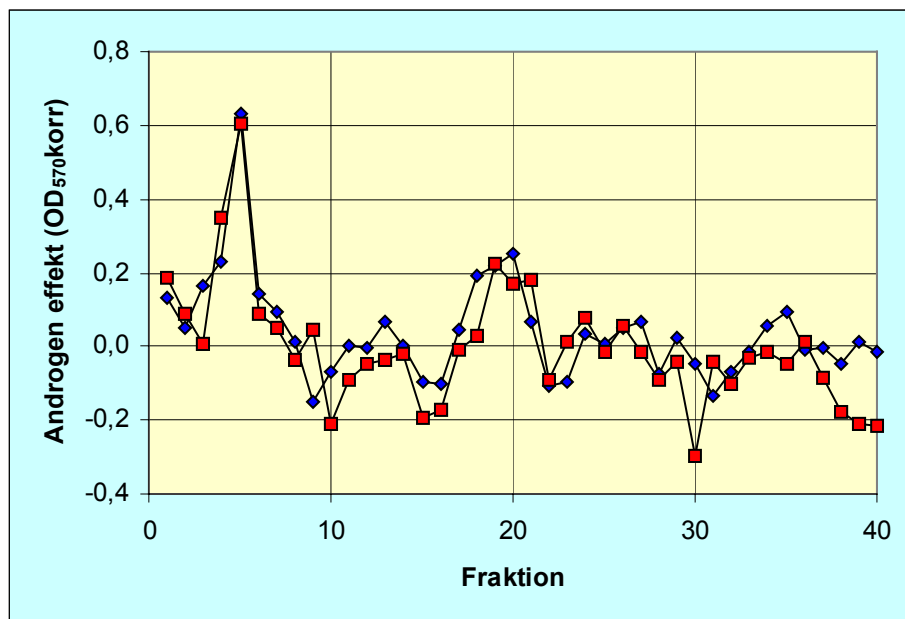


Fig. 14 HPLC-kromatogram över upprepad fraktionering av fraktioner som eluerats med 25 % metanol i tidigare SPE-fraktionering av behandlat avloppsvatten från Industri A (se Fig. 4 och Fig. 13 #12-16), duplikat. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

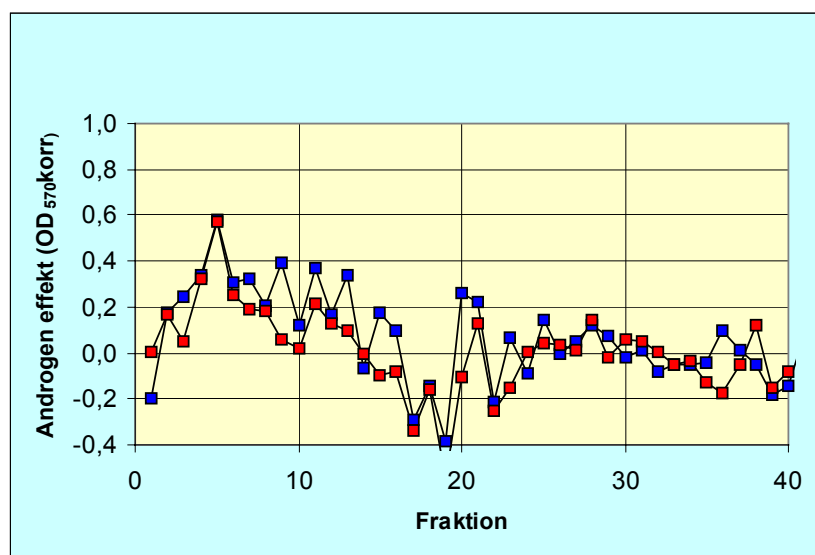


Fig. 15 HPLC-kromatogram över upprepad fraktionering av fraktioner som eluerats med 50 % metanol i tidigare SPE-fraktionering av behandlat avloppsvatten från Industri A (se Fig. 4, och Fig. 13 #4-15), duplikat. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

Fig. 14 visar en tydlig topp kring fraktion 5. Övriga avvikelser, förutom en indikation till hämning i två delar av kromatogrammet, var ej samstämmiga mellan replikaten och kan bortses från. En mindre distinkt topp förekom kring fraktion 5 även i Fig. 15, liksom en hämning (av celltillväxten) kring fraktion 16.

Sammanfattas kan att androgena komponenter förekommer i extrakt av avloppsvatten (från Industri A), att deras sammansättning är komplex samt att dessa ämnen är övervägande hydrofila. Viktigaste komponenten torde sökas i fraktion 5 i kromatogrammen i Fig. 14 och 15. Den androgena effekten var även från början låg i skogsindustriavloppsvattnen.

### 3.5 Androgenitet i humöst sjövatten och råvatten vid massatillverkningen

Prov av humöst sjövatten samt råvatten vid massatillverkningen insamlades och undersöktes avseende androgena effekter. Humöst sjövatten provtogs i tre små skogssjöar utan annan känd belastning än omgivande skogsmark. Prov av råvatten till Industri A och F togs i de strömmande vattendrag som industrierna utnyttjar för sitt behov av processvatten. Tio liter vattenprov surgjordes och extraherades enligt ovan med kolonnteknik. Som sorbenter användes kolonner innehållande ENV+ eller C<sub>18</sub>-substituerad stödfas. Androgena effekter i *in vitro*-test mättes med genmodifierade jästceller enligt ovan.

Sjöarnas läge och innehåll av humösa ämnen framgår av Tabell 4. Sjövattnen var måttligt färgade (Sågargölen, Medgölen) eller starkt färgade (Muggebogölen) enligt Naturvårdsverkets bedömningskriterier för sjöar och vattendrag (Naturvårdsverket, Rapport 4913).

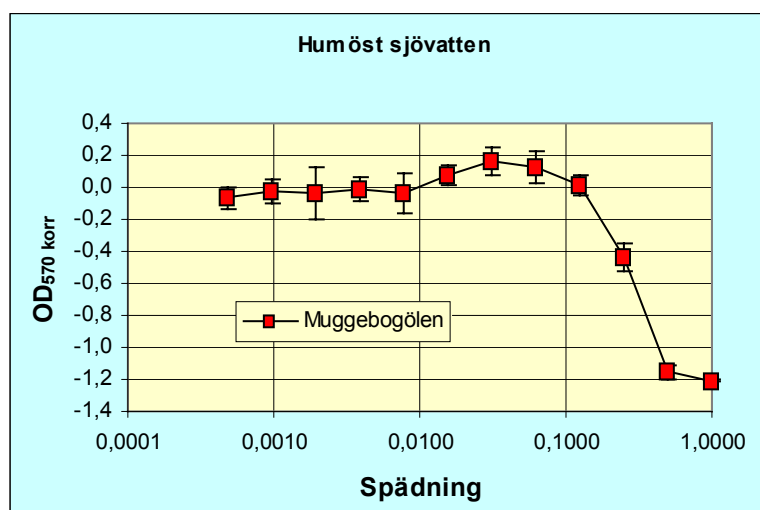


Fig. 16 Androgen test av extrakt av humöst sjövatten (triplikat). Spädserie av prov av extrakt inkuberade med modifierade jästceller. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

I extrakt av ca 10 L vatten från den mest humösa sjön erhöles en svag androgen effekt. Som framgår av Fig. 16 erhöles vid spädning av prov mellan 0,01 och 0,1 en signifikant ökning i ljusabsorptionen. Resultat av androgentest framgår också av Tabell 4. Än svagare respons erhöles i extrakt av vatten vid en senare provtagning och i en sjö med mindre humöst vatten. Effekterna skulle kunna framträda tydligare om prov fraktionerades enligt ovan.

Tabell 4 Androgenitet i extrakt av humöst sjövatten och råvatten till fabriker.

Lokal	Datum för provtagning	Färgtal (mg Pt/L)	Androgenitet
Sågargölen, Kinda, Östergötland	2001-11-01	27	0
Muggebogölen, Kinda, Östergötland	2001-11-01	120	++
	2002-02-24	110	+
Medgölen, Kinda, Östergötland	2002-02-24	45	+
Råvatten, Industri A	2001-09	ej anal.	0
Råvatten, Industri F	2001-10-03	ej anal.	0

Råvattnen saknade indikationer på androgena effekter i receptortestet.

### 3.6 Androgenitet i processvatten vid massatillverkning från rötskadad granved

Misstanken att erhålla effekter i skogsindustriellt avloppsvatten skulle ha sitt ursprung i vedråvaran prövades ytterligare genom test av processvatten från tillverkning från rötskadad granved. Prov av sådant vatten erhöles från en fabrik som använder sådan råvara. Vattenprovet utgjordes av ett starkt svavelsyrarhaltigt processvatten. Det var brunsvart till färgen och extraherades efter justering av pH till ca 3.0 enligt proceduren ovan. Huvuddelen av brunfärgade komponenter avskiljdes härvid.

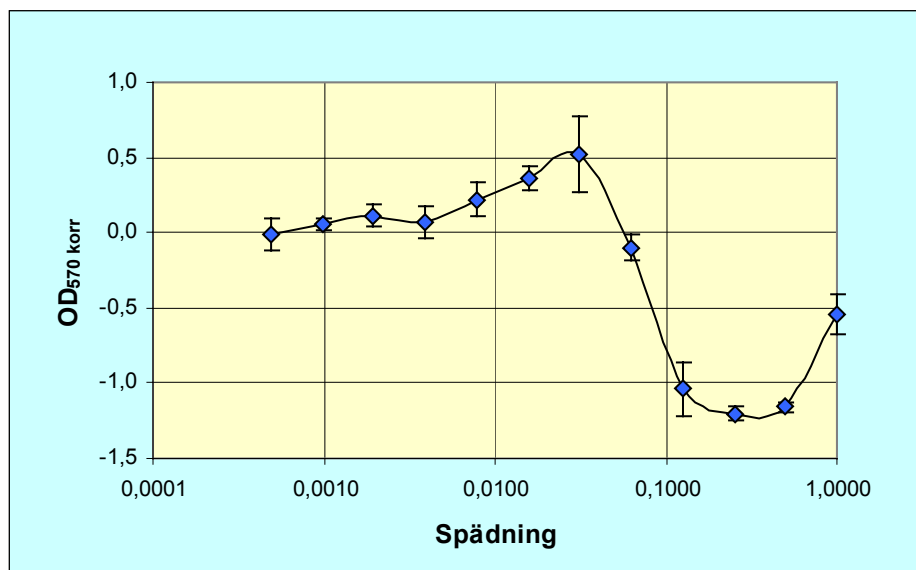


Fig. 17 Androgentest av extrakt av processvatten från tillverkning av massa från rötskadad granved (triplikat). Spädserie av prov av extrakt inkuberade med modifierade jästceller. Androgen effekt avläst fotometriskt vid 570 nm (röd färg) och anges efter korrektion för bakgrund i blankprov.

Resultat av test av provets androgenitet framgår av Fig. 17 som visar receptorinduktio- nen av en spädserie av extraktet (i triplikat) i form av optisk täthet vid 570 nm. I de 2-3 högsta koncentrationerna påverkades ljusabsorptionen av provets egen bruna färg. Samtidigt och i några lägre koncentrationer förekom en starkt tillväxthämmande inverkan vilken ledde till låg eller utebliven tillväxt hos jästcellerna. Vid ytterligare utspädning, i inspädningar från ca 0,001 till 0,03 (se Fig. 17) iakttofs en för blotta ögat skönjbar bildning av den rödfärgade produkten av enzymreaktionen. Som framgår av figuren kunde detta avläsas som en signifikant ökning av ljusabsorptionen. Vid fortsatt utspädning av extraktet närmade sig uppmätta absorbansvärden bakgrundens, dvs. kontrollens nivå som påverkas av jästcellernas ljusspridning och enzymsubstratets egen absorption vid 570 nm. Processvattnet innehåller uppenbarligen komponenter som stimulerar androgenreceptorn. Responsen var dosberoende upp till de koncentrationer som verkade tillväxthämmande på jästcellerna. Fraktionering av prov skulle enligt ovan eventuellt kunna framkalla tydligare androgena effekter av processvattnet. Testet indi- kerar att androgen i skogsindustriavloppsvatten kan ha vedursprung.

### 3.7 Östrogenitet och androgenitet i galla av juvenil regnbåge som exponerats för skogsindustriavloppsvatten

I samband med exponeringsförsök med fisk för avloppsvatten och test av östrogenitet insamlades prov av galla för test av hormonella effekter. Östrogena effekter i fisk undersöktes med analys av vitellogenin i plasma. Resultaten finns redovisade på annan

plats tillsammans med undersökningar av andra avloppsvatten (Svenson m.fl. 2000, 2002). Juvenil regnbåge placerades antingen i burar nära utsläppspunkten eller i akvarier som genomströmmades av utspätt avloppsvatten i båda fallen under 3 veckor. Parallellt med andra provtagningar uppsamlades gallprov (fiskar från samma lokal poolade) som genast frystes och förvarades vid -18 °C i väntan på analys. Test av östrogena effekter i galla har därefter utvecklats baserat på extraktion av gallprover, efter avblockering av eventuella steroidkonjugat och test av såväl östrogenitet som androgenitet i *in vitro*-test med genmodifierade jäststammar (Gunnarsson 2001).

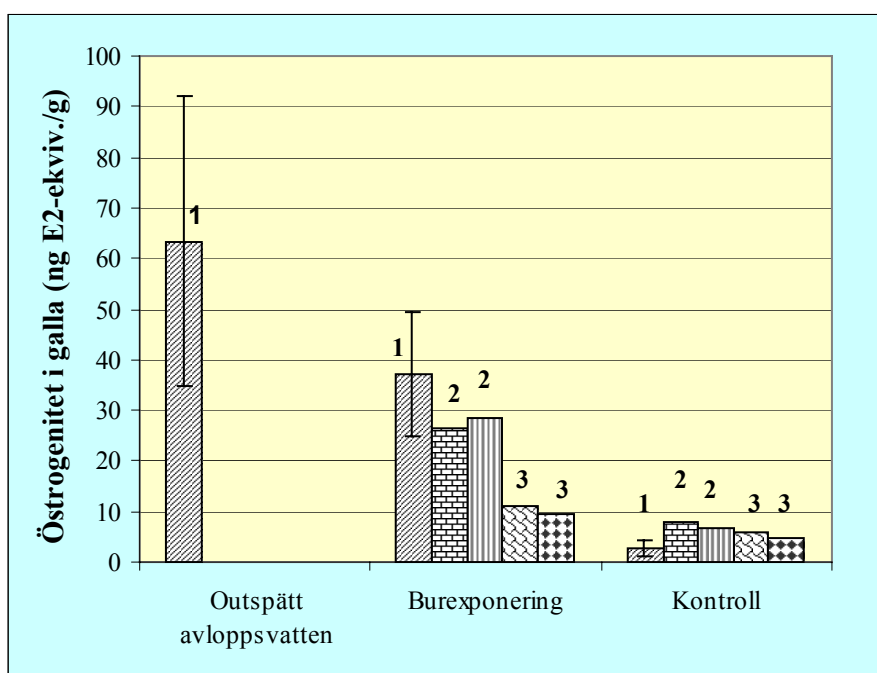


Fig. 18 Östrogenitet i galla av juvenil regnbåge exponerad 3 veckor i avloppsvatten från massa-industri. Staplarna representerar 1) Sulfatmassabruk 1,  $M \pm sd$ ,  $n = 4$ , 2) TMP-massabruk 2, duplikat och 3) Industri C, duplikat. Anläggningarna kodade enligt ovan samt enligt Svenson m.fl. 2000.

Kontrollfiskarnas nivåer av östrogenitet i galla låg i samtliga fall under 10 ng östradiol-ekvivalenter/g galla (Fig. 18). Exponering för avloppsvatten ledde till en ökning av östrogeniteten till 10-40 ng/g. I en av anläggningarna undersöktes även fiskar som exponerats för utspätt avloppsvatten. Här erhöles också den högsta östrogeniteten, signifikant skild från kontrollens även den. I jämförelse med fisk som exponerats för kommunalt avloppsvatten är dessa nivåer låga (Gunnarsson 2001). Vid exponering i skogsindustriavloppsvatten erhöles en höjning med upp till en faktor 4 eller 6 hos fiskar som ännu inte uppnått könsmodnad och som därför förväntas ha en konstant låg nivå av könshormoner. Högre nivåer av hormoner och cykliska variationer av hormonnivåer inträder i och med könsmodnaden. Huruvida dessa högre nivåer hos icke könsmodna individer ger önskade effekter på fiskarna saknas ännu belägg för. Ytterligare en fråga



som inte är besvarad är om den ökade östrogeniteten beror av ackumulering av ämnen ur avloppsvattnet eller en stimulering av fiskens bildning av egna östrogener.

Preliminära resultat av orienterande tester av androgenitet i galla visas i Fig. 18. Resultaten måste ännu anses som indikativa då någon motsvarande testutveckling liknande den för östrogenitet (Gunnarsson 2001) ännu inte gjorts. Resultat i duplikat föreligger från endast en anläggning med exponering för utspätt avloppsvatten och exponering i burar i närheten av utsläppspunkten i recipienten.

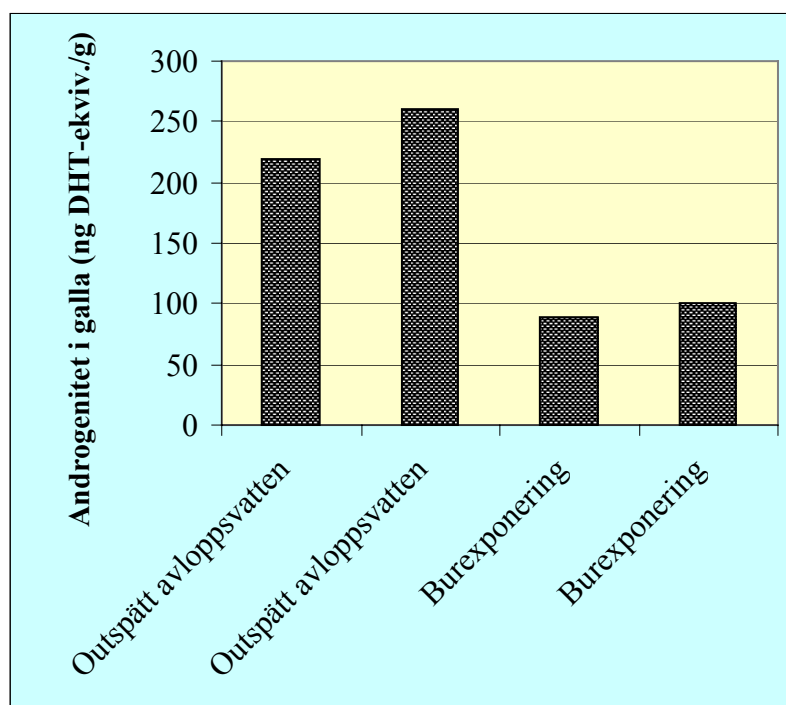


Fig. 19 Androgenitet i galla av juvenil regnbåge exponerad 3 veckor i avloppsvatten från en massaindusti (TMP-massabruk 2 enligt Svenson m.fl. 2000).

Prov från kontrolllokalen var otillräckligt för test, istället anges resultat från en annan undersökt kontrolllokal,  $9,3 \pm 1,0$  ng DHT-ekviv./g, uppmätta i fisk som utsatts i Hallsfjärden utanför Södertälje, med en annan fiskleverantör och andra recipientförhållanden. En jämförelse med denna kontrollnivå har dock ganska litet värde, åtminstone innan ytterligare kontrolllokaler testats. Istället framgår det en tydlig ökning från nivåer i galla av burexponerad fisk till motsvarande i fisk som exponerats för utspätt avloppsvatten. Uppenbarligen innehåller vattnet ämnen som antingen ackumuleras i galla eller förmår öka fiskarnas egen produktion av androgener.

## 4. Slutsatser och kommentarer

Undersökningen av skogsindustriavloppsvatten har således visat att ämnen med androgena effekter i *in vitro*-test förekommer. Förekomsten av hämmande ämnen kan dölja en androgen effekt även i prov som saknat indikationer om androgenitet.

Observationerna ovan kan tyda på att ämnen med androgena effekter förekommer mer generellt i skogsindustriellt avloppsvatten men vid test med modifierade jästceller döljs effekten av en starkare hämmande inverkan (av andra ämnen). Det är därför ännu alltför tidigt att göra jämförelser med olika anläggningars produktionsinriktning eller reningsteknik. Androgeniteten var låg och kunde t.ex. inte beräknas kvantitativt.

Trots grovfraktioneringens lågupplösande förmåga kan ändå vissa egenskaper hos ämnen med androgena effekter skönjas. Det är uppenbarligen flera ämnen med tämligen varierad lipofilitet som orsakar androgenitet. Aktiva ämnen är måttligt lipofila att döma av elueringsprofilen (se Fig. 4 och 11-15) och mindre lipofila än referenssubstanten dihydrotestosteron. Androgenitetens kemiska bakgrund var så heterogen att de separationsmetoder som användes endast spaltade upp den hormonella effekten i ytterligare fraktioner utan att någon påtaglig rening erhöles.

Försök visade att ursprunget till androgeniteten kan vara vedråvaran. Råvatten till processerna i två fabriker undersöktes och befanns sakna mätbar androgenitet. Eftersom de två industrier med påvisbara androgena effekter använde olika processer, en producerade sulfatmassa och den andra TMP-massa, var typen av process inte avgörande. Processvatten från kokning av rötskadad granved gav androgen effekt i test. Ursprung i nedbrytningsprodukter av ved indikerades också av spårbara effekter i humöst sjövattnet. Resultaten överensstämmer såtillvida med de iakttagelser som tidigare gjorts i USA, där man anger omvandlingsprodukter (av växtsteroider) som trolig källa.

Test av ett begränsat provantal avseende hormonella effekter i galla av juvenil fisk som exponerats i avloppsvatten visade ökad hormonell aktivitet, såväl östrogen som androgen. Höjda hormonnivåer i galla av fisk kan anses antingen som ett mått på intern exponering av organismen och således vara närmare knutet till eventuella fysiologiska effekter än t.ex. mått på extern exponering. Hormonnivåer i galla kan också vara en effekt i sig, om ämnen i omgivningen förmått den ännu ej könsmogna fisken att starta produktion av egna hormoner. Fortsatta undersökningar kan visa vilken modell som dominerar.

## 5. Tillkännagivanden

Jäststammarna har erhållits av prof. John Sumpter, Brunel University, Uxbridge, England.

## 6. Referenser

- Borg, B., Antonopoulou, E., Anderson, E., Carlberg, T., Mayer, I. 1993. Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Can. J. Zool.* 71, 2327-2329.
- Bortone, S.A., Williams, P. D., Bundrick, C. M. 1989. Morphological behavioral characters in Mosquitofish as potential bioindicator of exposure to kraft mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 370-377.
- Cody R. P., Bortone, S. A. 1997. Masculinization of Mosquitofish as an indicator of exposure to kraft mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 429-436.
- Denton T.E., Howell, W.M., Allison, J. J., McCollum, J., Marks, B. 1985. Masculinization of Female Mosquitofish by exposure to plant sterols and *Mycobacterium smegmatis*. *Bull Environ. Toxicol.* 35, 627-632.
- Drysdale D. T., Bortone, S. A. 1989. Laboratory induction of intersexuality in the mosquitofish, *Gambia affinis*, using paper mill effluent. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 611-617.
- Gunnarsson, M. 2001. Estrogenicity in fish bile - A new approach to measure endocrine disruption in fish. Master thesis in biology, University of Uppsala.
- Howell, W. M., Black, D. A., Bortone, S. A. 1980. Abnormal expression of secondary sex characters in a population of mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: Evidence for environmentally induced masculinization. *Copeia* 4, 676-681.
- 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.
- Larsson, D. G., Hällman, H., Förlin, L. 2000. More male fish embryos near a pulp mill. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2911-2917.
- Morcillo, T., Porte, C. 2000. Evidence of endocrine disruption in clams – *Ruditapes decussata* – transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environ. Poll.* 107, 47-52.
- Neilson A. H., Hynning P-Å. 1998. PAHs: Products of chemical and biochemical transformation of alicyclic precursors. In *The Handbook of Environmental Chemistry: PAHs and Related Compounds* Vol 3 Part I pp 223-269. (Ed. A. H. Neilson), Springer-Verlag, Berlin.

- 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., Norin, H., Hynning, P-Å. 1996. Toxicity directed fractionation of effluents using the bioluminescence of *Vibrio fischeri* and gas chromatographic/mass spectroscopy identification of the toxic compounds. *Environ. Toxicol. Wat. Qual.* 11, 277-284.
- 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.
- Olsson, P-E., Borg, B., Brunström, B., Håkansson, H., Klasson-Wehler, E., 1998. Endocrine disrupting substances – Impairment of reproduction and development. Naturvårdsverket, Rapport 4859.

Bilaga 1. Sammanfattning av produktions- och processdata för deltagande fabriker år 2000

	A(2001)	B	C	D	E	F
Produktion ton/år	Papper 652 000 TMP 509000 Slip 72000	Oblekt sulfatmassa 383 000 Blekt sulfatmassa 80000 Returfibermassa 108000	Kartong 281 000 Blekt sulfatmassa 58 000	Blekt sulfatmassa (TCF) 373 366 (2000) CTMP-massa 68 297	TMP 553 000 Tråhaltigt tryckpapper 753 200	Blekt sulfatmassa 678 209
Produkter	Tidnings- och journalpapper	Kraftliner	Kartong samt helblekt lövveds- och barrvedssulfatmassa	Blekt barr- och lövvedssulfatmassa, CTMP-massa	Tidningspapper och LWC-papper	Blekt barr- och lövvedssulfatmassa
Vedråvara	Rundved och flis (gran)	Rundved och flis	Rundved och flis	Rundved och flis	Rundved, externflis och sulfatmassa	Rundved och flis
Kokeri		Kontinuerlig	Kontinuerlig	Kontinuerlig		Kontinuerlig
Blekeri Prod. t/d	Ditionitblekning 865 t papper/d	Syrgasförstärkt peroxidblekning	590 (B) 625 (L)	TCF-blekning, 1094 t/d <sup>1)</sup>	Peroxidblekt 1144 t papper/d, Ditionitblekt 290 t papper/d	TCF-blekning, 1442, slutblekt produktion <sup>1)</sup>
Slutbleksekvenser		O-Q-PO	D-(EOP)-D-D (B) D-(EOP)-D-(EP)-D (L)	Q-OP-Z-Q-PO		Q-OP-Z(O)-PO
Återföring av blekerifiltrat			Försök	Delvis	Ja	Ja
Ljushetsnivå			90-91	80->88 <sup>1)</sup>	58-84	>88,5 <sup>1)</sup>
Typ av extern biorening	Aktivslam		Luftad damm	Två biofilmsreaktorer	LAS	LAS
COD nivå, slutavlopp kg/t	2,2 kg/t ppr	11	26	18 <sup>1)</sup>	2,7	10

1) Ej genomsnittsdatab; avser provperioden

Bilaga 2. Data för de fullstora reningsanläggningarna vid de olika brukten under provtagningsperioden.

	A	B	C	D	E	F
Typ av rening	Försedim Neutralisering, Närsalttillsats Delström till biotorn Aktivslam, 4 luftningsbassänger varav 2 med selektorer, simultanfällning och eftersedimentering	Endast sedimentering	Försedimentering Luftad damm	Sulfatfabrikens rening är två aeroba fyllkropps-reaktorer. CTMP-fabrikens vatten renas genom anaerob, aerob och kemisk behandling. Sedimentering sist för båda.	Vattnet renas genom mekanisk rening via två försed. bassänger, sedan biologisk rening (LAS) och slutligen kemisk rening via eftersedimentering och flotation.	Försedimentering Kylning Neutralisering LAS Slutsedimentering Ufjämningsdamm
Slamhalt i luftning, kg/m <sup>3</sup>	5,2				1,2 - 1,5 <sup>2)</sup>	2,6
Slamindex, ml/g	60-65				88,3	92-95
Slamålder, d	9-11				20	37-40
Uppehållstid i luftning, h				5 (sulfatrening)	5 d (luftad lagun) <sup>2)</sup>	70
Uppehållstid i slutdamm, d			4	1 (slutsedimentering)	3 h (eftersedimentering) <sup>2)</sup>	4
Bioreningseffekt COD, %	94		35	50 (sulfatrening)	93,5	66

<sup>2)</sup> Uppskattat värde