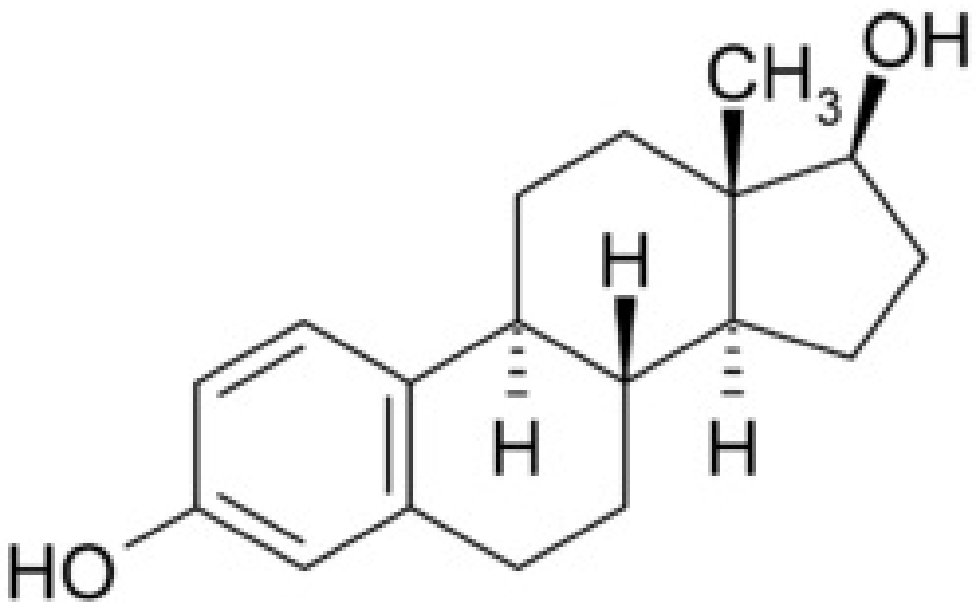
UPPSALA
UNIVERSITET

Naturliga och syntetiska östrogener i avloppsvatten kräver uppdaterade reningsmetoder

Har skillnaderna mellan naturligt och syntetiskt östrogen någon betydelse för reningens effektivitet?



Ingrid Lekberg

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2014
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Endokrinstörande ämnen (EDC:s) så som östrogener har blivit ett stort problem då de används till stor del i läkemedel och framför allt preventivmedel världen över. Reningssystemen lyckas idag inte extrahera dessa ämnen ur avloppsvattnet tillräckligt effektivt utan vattnet som kommer ut från reningsverken är fortfarande förorenat och bidrar till förhöjda koncentrationer östrogen vid utloppen. Östrogenet som oftast används i preventivmedel idag är det syntetiska hormonet etinylestradiol, men på senare år har man hittat sätt att använda det kroppsegna 17β-estradiol istället vilket ska ge färre biverkningar för kvinnorna som tar preparaten. Dessa östrogener ser något olika ut och bryts därför inte ned på samma sätt. Ur ett reningsperspektiv kan det därför finnas olika fördelar och nackdelar i att ettdera östrogenet används i preventivmedel. Syftet med den här litteratursammanställningen är att beskriva en del av forskningen inom rening av östrogener som gjorts de senaste åren. Metoderna som diskuteras är UV-strålning, oligomerisering, adsorption till kolloidalt kol och ”liquid-liquid”-extraktion. Naturliga och syntetiska östrogener har en viss skillnad i konformation men är båda miljövådliga. Den lilla skillnaden i struktur gör att de olika reningsmetoderna som diskuteras har olika effektivitet på naturligt och syntetiskt östrogen, vilket betyder att flera metoder kan behöva kombineras för att skapa ett välfungerande reningssystem.

Inledning

Allt som går igenom våra avloppssystem hamnar i ett reningsverk. Reningsverken har system för att avlägsna olika orenheter från vattnet. Ut på andra sidan strömmar dock inte helt rent vatten (Ternes *et al.* 1999) utan många ämnen, som inte går att se med blotta ögat, följer med - avloppsvattnet ut i naturen. Detta leder till att vattnen vid reningsverkens utlopp får en relativt hög koncentration av dessa kemikalier. Många av kemikalierna som reningsverken inte lyckas fånga är östrogener (Ternes *et al.* 1999), som är så kallade endokrinstörande ämnen, eller EDC:s (endocrine disrupting chemicals). Som namnet antyder kan de interagera med, och störa, det endokrina systemet hos ryggradsdjur (Nationalencyklopedin 2014). Detta är ett stort problem. Fiskarna som lever i dessa vatten blir påverkade på ett direkt vis, och djur som äter fiskarna blir påverkade indirekt.

EDC:s inkluderar såväl naturliga som syntetiska östrogener och även så kallade xenoöstrogener, vilket är ämnen som inte är östrogener men som har en östrogen aktivitet. Det kan vara antingen agonister eller antagonister (Vos *et al.* 2000) som binder till östrogenreceptorerna och följaktligen stör det endokrina systemet. Både naturliga och syntetiska östrogener används i läke- och preventivmedel. 17β-estradiol (E2) är ett naturligt östrogen som på senare år har börjat användas i preventivmedel och uppges kunna ge färre bieffekter i människokroppen än andra, syntetiska hormoner, om det kombineras med rätt progestin(gulkroppshormon) (Mueck & Sitruk-Ware 2011). Anledningen till att man inte använt E2 tidigare är att det bryts ned snabbt i kroppen och att man inte kunde hitta ett passande progestin för att motverka de ojämna blödningar som kvinnor i testgrupper drabbats av(Shulman 2013). Ett hormon som har varit vanligare i preventivmedel är etinylestradiol (EE), ett syntetiskt östrogen som inte bryts ned lika snabbt i kroppen som E2 och därför varit

lättare att skapa fungerande preventivmedel av. Som påpekats tidigare har det syntetiska hormonet dock gett en del oönskade biverkningar för många kvinnor, vilket är anledningen till att man jobbat på att göra ett skonsammare medel med det naturliga östrogenet E2. Ett lyckat preparat har nu tagits fram med antigonadotropiska NOMAC (nomegestrolacetat), som är en progesteronagonist (Mueck & Sitruk-Ware 2011). Detta hoppas man ska förbättra livskvaliteten för kvinnor som använder hormonella preventivmedel.

Väldigt många kvinnor använder sig av p-piller som preventivmedel, över 22 miljoner bara i Europa (Skouby 2004), därför är just p-piller är ett viktigt ämne att diskutera. Tyvärr diskuteras till allra störst del endast de biverkningar som människokroppen upplever och inte till lika stor del den påverkan som p-pillrens innehåll har på djurlivet när de tjänat färdigt sin verkan i våra kroppar. Både E2 och EE återfinns i avloppsvatten och vid utlopp från reningsverk. E2 kan finnas i koncentrationer upp till ca 50 ng L^{-1}, medan EE inte alltid förekommer i mätbara koncentrationer (Desbrow *et al.* 1998). Oavsett är koncentrationerna av östrogen oftast förhöjda i dessa vatten.

Idag finns det inte något effektivt reningssystem för att avlägsna östrogener från avloppsvattnet då reningsverken inte är designade för att rena bort organiska spårämnen. Vissa ämnen, som östrogener, går emellertid att avlägsna till viss del (Janex-Habibi *et al.* 2009). Koncentrationerna må minska under reningen av avloppsvattnet men östrogenerna försvinner inte helt (Gabet-Giraud *et al.* 2010). Detta gör att det ansamlas EDC:s vid utlopp från reningsverk vilket påverkar djurlivet i omgivningen. De påverkar reproduktion, beteende, sexuell utveckling m.m. hos samhällen i dessa vatten och även omgivande terrestra områden (Lintelmann *et al.* 2003). T.ex. inducerar E2 och E1 vitellogenes (bildning av äggula) och feminisering hos fisk (Rankouhi *et al.* 2004) och EE inducerar vitellogenes och feminisering av hanar hos knölskallelöja *(Pimephales promelus)* redan vid relativt låga koncentrationer, vilket eventuellt kan leda till en kollaps av populationen (Kidd *et al.* 2007). Östrogener som EDC:s gör följaktligen skada på omgivningen och något måste göras för att minska denna påverkan.

Det finns olika sätt att angripa uppgiften. Man kan tänka sig att försöka bilda ett nytt östrogen som blir inaktivt eller snabbt degraderar när det kommer ut ur kroppen, men ett mer angreppsvänligt sätt är kanske att försöka bilda ett hållbart system för att rena avloppsvatten från dessa EDC:s och andra kemikalier med liknande egenskaper. I den här studien vill jag undersöka om det finns några skillnader mellan hur det naturliga och det syntetiska östrogenet bryts ned som gör att något av dem har en fördel i reningssyfte. Jag kommer även att diskutera olika uppkommande reningsmetoder ur de olika östrogenernas perspektiv. I huvudtexten nedan beskrivs några metoder som man skulle kunna utveckla, och kanske kombinera för att åstadkomma effektiva reningsmetoder.

P-piller

Kombinerade p-piller innehåller förutom östrogen även en form av progestagen (gulkroppshormon) - oftast något sorts progestin vilket är en syntetisk form att det kroppsegna

progesteronet (Streck 2009). Dessa hormonella preventivmedel är tänkta att lura kroppen att det är en graviditet på gång genom att hålla en viss nivå av östrogen och progestin. Dessa har en negativ feedback på ägglossningen och frisättningen av gonadotropinerna LH (ägglossningsstimulerande hormon) och FSH (follikelstimulerande hormon) (Frye 2006).

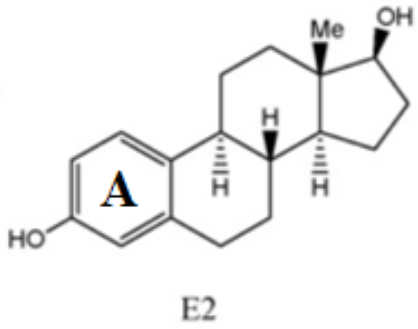
Könshormoner, vilket inkluderar östrogener, progesteron och androgener, bildas i endokrina körtlar (testiklar och äggstockar). Frisläppningen av dessa kontrolleras av koncentrationen könshormon som redan finns tillgängligt i kroppen. Den negativa feedbackmekanismen fungerar så att östrogenerna minskar frisättningen av GnHR (gonadotropinfrisättande hormoner) från hypotalamus och gonadotropinerna LH och FSH från adenohypofysen (Klaassen & Watkins III 2010). Allt östrogen som finns i kroppen bryts inte ned där, utan en del lämnar kroppen tillsammans med urinen.

Östrogener

Östrogen kommer ut via urinen till störst del i konjugerad form, antingen som östrogenglukoronider eller -sulfonider. Denna form gör att de är mer vattenlösliga, men också hormonellt inaktiva, när de lämnar kroppen (Andreolini *et al.* 1987). Inaktiva östrogener har ingen östrogen effekt och fungerar därför inte som EDCs. Det betyder dock inte att potentialen för östrogen aktivitet gått förlorad för dessa kemikalier (Ternes *et al.* 1999). Ternes *et al.* (1999) föreslår att dessa konjugerade former av östrogenerna bryts i reningsverkens aktiva slamprocess (beskrivs på sida 6), vilket frisläpper mer aktivt östrogen istället för att minska koncentrationen. I följande tre stycken beskrivs de tre olika östrogener som diskuteras i denna uppsats - 17β-estradiol, östron och etinylestradiol.

17β-estradiol - ett naturligt östrogen

Av de kroppsegna östrogenerna är 17β-estradiol (figur 1) det huvudsakliga och mest potenta hormonet (Fruzzetti & Bitzer 2010). E2 blir snabbt inaktiverat av enzymer i levern och lämnar sedan kroppen, mestadels i konjugerad form utan någon östrogen aktivitet. När det kommer i kontakt med mikrobiella organismer börjar dock en nedbrytningsprocess av det konjugerade östrogenet som frisätter aktivt E2 och indirekt metaboliten östron (Ternes *et al.* 1999).



Figur 1. Kemisk struktur hos 17β-estradiol, omritad från Li Puma *et al.* (2010).

Östron

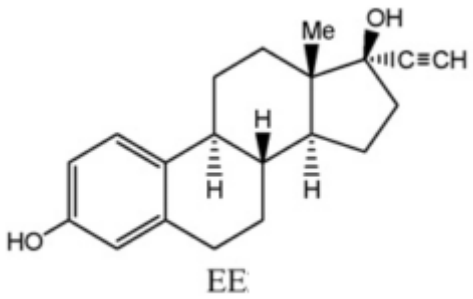
Ett östrogen som bör nämnas när man talar om E2 är östron (E1). Precis som E2 är E1 ett naturligt hormon och det är den första nedbrytningsprodukten som bildas i nedbrytningen av E2. Även östron har östrogen potential och fungerar därför som en EDC, det är dock av en relativt intermediär natur. Mao *et al.* (2009) tolkar det så då att de i sina experiment endast finner E1 där det också återfinns E2. Detta indikerar att när E1 väl har bildats så degraderas det snabbt. Dessa två naturliga östrogener har samma vattenlöslighet men deras molekylärvikt skiljer sig (tabell 1). Skillnaden i vikt beror på att E1 bildas genom att E2 förlorar en vätejon (figur 3) (Peter Guengerich 1990).

Tabell 1. Östrogenernas molekylärmassa och vattenlöslighet (Ben Fredj *et al.*, 2015).

Östrogen	Molekylärmassa (g mol^{-1})	Vattenlöslighet (mg l^{-1}) vid 20 ˚C
E2	272,4	13
E1	270,4	13
EE (syntetiskt östrogen)	296,4	4,8

Etinylestradiol – ett syntetiskt östrogen

Etinylestradiol (eller 17α-ethinylestradiol, figur 2), som hädanefter kommer att hänvisas till som syntetiskt östrogen, bildas genom att en etinylgrupp adderas till C-17 hos 17β-estradiol. Den ändrade formen har gjort EE lättare att använda i preventivmedel eftersom att den tillsatta etinylgruppen saktar ned metabolismen av ämnet och ger det en ökad halveringstid. Detta gör att EE är tillgängligt för biologiska mekanismer under en längre period är E2. Det gör dock även att levern hinner producera mer av de inaktiverande enzymerna i närvaro av EE, vilket kan ha negativa bieffekter hos användare av preventivmedlet (Longcope & Williams 1975).



Figur 2. Kemisk struktur hos etinylestradiol, omritad från Li Puma et al. (2010).

Det syntetiska östrogenet är mer hydrofobt än E2 och E1(se vattenlöslighet i tabell 1). Det är allmänt känt att hydrofoba material dras till varandra, vilket innebär att EE bör vara mer benäget att adsorberas till organiska material än de naturliga östrogenerna.

Nedbrytning av östrogener

På grund av deras något olika kemiska strukturer bryts E2 och det syntetiska östrogenet EE

också ned på något olika vis. Nedan beskrivs skillnaden mellan hur E2 och EE bryts ned och hur nedbrytningen påverkas av mikroorganismer.

Biodegradering under ljus – naturliga och syntetiska östrogener

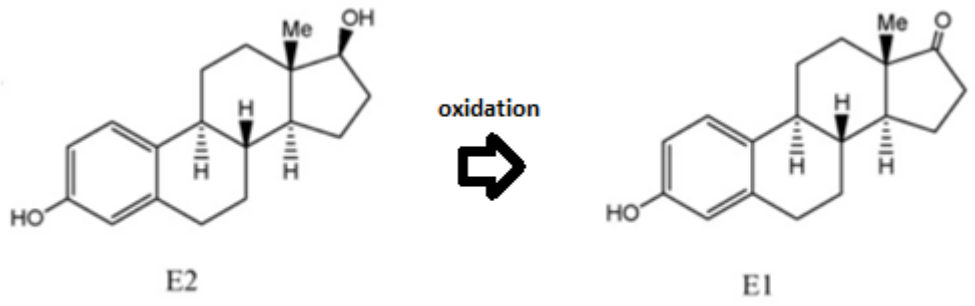
I vatten finns det fullt av mikroorganismer som tar upp och bryter ned ämnen i sin omgivning och på sätt och vis kan rena miljön de lever i. Bradley & Writer (2014) tittade på hur biofilm och sediment, insamlat nedströms från ett reningsverksutflöde, påverkar mineraliseringen av E1, E2 och EE (som märkts med ^{14}C på A-ringen, visas i figur 1) och hur mycket $^{14}CO_2$ som ackumuleras. Alla tre molekyler fick jämförbara värden vad det gällde mineralisering och ackumulering av $^{14}CO_2$ under ljusa förhållanden, medan värdena för E1 och det syntetiska östrogenet var lägre än de för E2 under mörka förhållanden, vilket tyder på att fotodegradering och/eller fotoaktivering i ljusa områden kan hjälpa biodegraderingen av östrogener på traven.

Mineraliseringen av E1 och EE visade sig effektivare under ljusa förhållanden än i mörker medan ingen signifikant skillnad visade sig mellan ljus och mörker när det gäller mineralisering av E2 (Bradley & Writer 2014). Detta tyder på att det finns en skillnad i hur dessa molekyler tas upp och/eller metaboliseras i avloppsvatten.

Den här sortens nedbrytning med hjälp av mikroorganismer kallas för en ”aktivt slam”-process och används i reningen av avloppsvatten (Gabet-Giraud *et al.* 2010).

Nedbrytning av 17β-estradiol

Hydroxylation17β-estradiols första nedbrytningsprodukt östron (E1) bildas genom att C-17 hos E2 oxideras (Peter Guengerich 1990) och hydroxylgruppen(-OH) på den positionen således övergår till en karbonylgrupp (dubbelbunden syreatom, figur 3).



Figur 3. Det första steget i nedbrytningen av E2, omritad från Li Puma et al. (2010).

Biodegradering

De östrogenmolekyler som inte bryts ned i kroppen kan metaboliseras av mikroorganismer i vatten och sediment i reningsverken och vid deras utlopp. Studier har visat att E2 och metaboliten E1 under mörka förhållanden bryts ned snabbare av mikroorganismerna än det syntetiska östrogenet men att skillnaden mellan dem inte är märkbar under ljusa förhållanden (Jürgens *et al.* 2002).

Nedbrytning av etinylestradiol
Den viktigaste nedbrytningsvägen för EE i människor är 2-hydroxylation, och den sker huvudsakligen i levern. Hydroxylationen sker på 16β- och 6α-positionerna på molekylen. Hos EE sker det ingen 16α-hydroxilation, som det gör hos E2. Detta kan bero på det steriska hindret från 17α-etinylgruppen hos EE. Det spelar antagligen också in att 17-kolet, som hos E2 oxideras och bildar E1, hos det syntetiska östrogenet täcks av en etinylgrupp. E1 är ett bättre substrat för 16α-hydroxilation än E2 och det syntetiska EE, men eftersom att EE inte kan bilda E1till lika stor del som E2 kan så är det mindre troligt att hydroxilation sker på den positionen hos det syntetiska östrogenet (Peter Guengerich 1990).

I människokroppen katalyseras oxidationsreaktionerna av cytokrom P-450 IIIA4 hos det syntetiska östrogenet, vilket är mycket likt (88 %) IIIA5 som katalyserar oxidationen av E2 (Peter Guengerich 1990).

Biodegradering
Generellt har det syntetiska EE lägre biodegraderingshastighet än både E2 och E1(Bradley & Writer 2014) under aeroba förhållanden (Ternes *et al.* 1999). Det bryts således ned långsammare av mikroorganismer i naturen och reningsverk, men skillnaden visade sig inte vara statistiskt signifikant.

Dagens metoder för att rena avloppsvatten

Reningsverken idag är i första hand designade för att avlägsna partiklar från avloppsvattnet och inte lika välutvecklade vad det gäller rening från kemikalier. I stegen som framställs nedan minskar visserligen östrogenhalten i avloppsvattnet när det genomgår reningssystemet, men det har visats att östrogenkoncentrationerna vid reningsverkens utlopp trots allt ofta är förhöjda.

Ett primärt reningssteg
En del reningsverk använder en förberedande sedimenteringsprocess där en kemisk behandling, bestående av järnklorid med kalk och polymer, kan ingå. En sådan, så kallad fysikalisk-kemisk, behandling inducerar aggregeringen av kolloida partiklar och ökar på så vis sedimenteringen av de samma (Gabet-Giraud *et al.* 2010). Detta leder i sin tur till att en del hydrofoba molekyler, som tenderar att adsorberas av kolloider, kommer att avlägsnas tillsammans med de aggregerade kolloida pariklarna. Den kemiska tillsatsen i det primära reningssteget ökar östrogenernas avverkningsgrad med upp till 12 % för E1 och mellan 27 och 36 % för E2. I studien, som inkluderade 14 olika reningsverk i Frankrike, valde man att inte räkna in det syntetiska östrogenet EE eftersom att det inte återfanns i lika hög koncentration som E2 och E1(Gabet-Giraud *et al.* 2010). De fann att olika temperaturer inte gav någon signifikant skillnad i östrogenernas avverkningsgrad. I de reningsverk där den kemiska behandlingen inte ingår i det primära reningssteget iakttogs ingen minskning av östrogenhalt i det primära reningssteget (Gabet-Giraud *et al.* 2010).

Sekundär biologisk behandling
Gabet-Giraud *et al.* (2010) gjorde mätningar i den biologiska reaktorn hos olika reningsverk, under vintern när reaktortemperaturen var mellan 9 och 15 ˚C och under höst och vår när temperaturen var runt 20-23 ˚C. Avverkningsgraden för E1 och E2 var något högre vid den högre temperaturen och vid den lägre temperaturen visade sig avverkningsgraden mycket mer varierande än vid den högre, där den var förhållandevis konstant. Bland de reningsverk som undersöktes under höst och vår, den varmare perioden, fanns de som var lågbelastade och de som var mediumbelastade med aktiverat slam. Mätningarna som gjordes i medium-reaktorer visade en lägre avverkningsgrad än de som gjordes i lågbelastade reaktorer. Medium-reaktorerna visade en viss minskning av E2, medan E1 koncentrationen ökade (Gabet-Giraud *et al.* 2010). Det fenomenet har sin förklaring i att E1 bildas när E2 bryts ned (Ternes *et al.* 1999). När ett nitrifierande biofilter, som finns i många reningsverk för kvävereningens skull (Hermansson *et al.* 2006), ingick i processen var avverkningsgraden av E2 och E1 emellertid över 80 %. Mätningarna som gjordes i låg-reaktorerna visade en avverkningsgrad som var över 90 % för både E2 och E1. I låg-reaktorerna användes inga biofilter (Gabet-Giraud *et al.* 2010). Under reningsprocesserna försvinner ca 80-90 % av östrogenerna som fanns i inflödet men fortfarande har utflödesvattnet koncentrationer upp till 50-60 ng L^{-1}.

Tertiär behandling
Eftersom att reningen av östrogener enligt mätningarna Gabet-Giraud *et al.* (2010) gjorde var så pass effektiv redan efter den biologiska behandlingen gjorde de inga mätningar av dem i sina tester av tertiära behandlingar.

Vattenrening
Det är nödvändigt att förstå strukturen och nedbrytningen av östrogener för att förstå vad som händer under reningsprocessen. De konventionella metoderna för att rena vatten från EDC:s är inte tillräckligt välfungerande (Cardinal-Watkins & Nicell 2011). Nedan beskrivs några olika studier från de senaste åren, inriktade på vattenreningsprocesser som kan vara möjliga att använda för att eliminera östrogener från avloppsvatten.

Fotokatalytisk oxidation
Nedbrytningen av östrogener kan skyndas på med hjälp av UV-ljus och en katalysator. Detta fenomen kallas för fotokatalytisk oxidation. Li Puma *et al.*(2010) undersökte nedbrytningshastigheten hos både de naturliga östrogenerna E2 och E1 och det syntetiska EE under belysning av UVA- och UVC-ljus. Östrogenet utsattes för de olika sorternas strålning och under tiden mättes koncentrationsändringen i fotoreaktorn. Man testade hur strålningen påverkade reaktionen både med och utan en katalysator närvarande. Katalysatorn som användes var TiO_2.

Både UVA- och UVC-ljus påverkade nedbrytningen av alla testade östrogener, men utan katalysatorn visade sig UVC-ljuset vara det mest effektiva. Efter 180 minuters UVA-strålning hade E2, E1 och syntetiska EE minskat, i angiven ordning, med 20, 49 och 25 %. Under UVC-strålning var degraderingshastigheten signifikant högre. Efter 180 minuter hade både E2

och EE minskat med 60 %, medan E1 hade degraderats praktiskt taget totalt, med 98 % minskning.

Med katalysatorn TiO_2 närvarande minskade alla östrogenerna med liknande hastighet under både UVA- och UVC-strålning. I det fallet var UVA-ljuset det mest effektiva i degraderingen av östrogenerna. Det var speciellt effektivt för degraderingen av det syntetiska östrogenet.

Ligninasmedierad oligomerisering

Ett annat sätt att rena vatten från östrogen är ligninasmedierad oligomerisering. Mao *et al.* visade 2010 att enzymet ligninperoxidas (LiP), som bildas naturligt av den vita rötsvampen *Phanerochaete chrysosporium* (Shah *et al.* 1992) kan transformera vissa syntetiska och naturliga östrogener, på ett sådant vis att den östrogena effekten minskar, genom att inducera oligomerisering av molekylerna. LiP följer den ”klassiska peroxidaskatalysmekanismen”, där H_2O_2 behövs för att aktivera LiP genom att oxidera det med två elektroner (Banci et al. 1999). De använde sig därför av E2, H_2O_2 och LiP i reaktionen. Efter en timmes reaktionstid hade koncentrationen E2 minskat med 39 % (Mao et al. 2010).

Resultatet från HPLC:n (högupplösande vätskekromatografi) visade fem toppar. Från topparna kunde molekylärvikter uttolkas vilka i sin tur kunde översättas i dimerer och trimerer av E2, och en liten del monomerer av E1. Molekylärvikterna räknades ut med ekvation (1), där n = ett naturligt nummer, 2 eller 3 i detta fall (eftersom det handlar om dimerer och trimerer), och M = molekylärvikten av E2 (Mao *et al.* 2010).

$$\text{Total molekylärvikt} = nM - 2(n - 1) \qquad (1)$$

Det som händer i reaktionen mellan E2 och LiP är att LiP oxiderar E2 och ger molekylerna fria elektroner. I den oxiderade formen är de mer reaktiva och benägna att para ihop sin fria elektron med en annan och på så vis bilda polymerer (Mao *et al.* 2009).

De testade också vilken effekt veratrylalkohol (VA), som bildas av *P. chrysosporium* som en sekundär metabolit i samband med att LiP bildas, kunde ha på reaktionen. Även effekten av naturlig organisk materia (NOM), som är vanligt i fria vattenmassor, testades både i samband med VA och ensamt. Detta gjordes för att få en bättre förståelse för hur reaktionerna faktiskt sker i naturen (Mao *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2010).

Effekt av VA och NOM på LiP-medierad oligomerisering

När VA inkluderades i reaktionen reducerades E2 koncentrationen med 90 % istället för 39 % vilket var fallet då endast LiP var närvarande (Mao *et al.* 2010). VA verkar fungera som en katalysator genom att både hindra inaktiveringen av LiP och samtidigt stimulera dess aktivitet (Mao *et al.*, 2009). I reaktionen med VA närvarande hittade man dessutom en extra topp. Molekylärvikten som toppen representerade var 540 vilket tyder på en produkt där E2 och E1har bundits samman, enligt ekvation (1). Detta fenomen uppträdde inte under några andra förhållanden än när VA var den enda extra tillsatsen.

När NOM var närvarande tillsammans med VA såg man inga E1-E2-kopplingar. Under dessa förhållanden var minskningen av E2-koncentrationen dessutom endast 75 %. Denna minskning av VAs effektivitet som katalysator tillskrivs att NOM konkurrerar med VA om att binda till den aktiva positionen på LiPs yta. Tillsatsen av endast NOM till reaktionen minskade reduktionen av E2 från 39 till 24 % (Mao *et al.* 2010).

Östrogenets bindningsposition på LiP

Mao *et al.* (2009) kunde se en stark korrelation mellan östrogenets molekylära volym och affiniteten mellan substratet och enzymet och detta var den enda korrelation de kunde hitta för att förklara östrogenets bindning till LiP. En sådan korrelation talar för att östrogenet inte binder till LiPs yta, som VA gör, utan till en hålighet i enzymet. Molekylens volym tenderar enligt Mao *et al.* (2009) att vara en viktig faktor i den sortens bindning.

Kolloidal adsorption

Kolloidalt organsikt kol

Något kolloidalt definieras som ett ämne som är finfördelat i ett annat, men inte upplöst, och där partikelstorleken ligger någonstans i nanometer-/mikrometerområdet. Vikten som kolloidalt organiskt kol har i adsorptionssammanhang har länge blivit förbisedd till förmån för andra löslighetsfaser (Nie *et al.* 2014).

Adsorptionsförmågan hos kolloidalt organiskt kol

Nie *et al.* (2014) såg en potential hos det kolloidala organiska kolet och samlade in vattenprover med kolloidalt kol från ett avloppspåverkat vatten. De mätte koncentrationen adsorberat EDC såväl som den kolloidala massan. De mätte även koncentrationen EDC i andra löslighetsfaser för att jämföra med den hos det kolloidala kolet. Mängden kolloidalt organiskt kol visade en positiv korrelation till miljöns östrogenkoncentration vilket betyder att det har en stor adsorptionsförmåga för östrogener, där både E1, E2 och EE är inkluderade. Denna förmåga visade sig högre för det kolloidala kolet än för andra löslighetsfaser (Nie *et al.* 2014).

”Liquid-liquid”-extraktion (LLE)

LLE är en vattenreningsmetod där man använder sig av lösningsmedlet decametylcyclopentasiloxan (D5), även kallat silikon, för att extrahera E1, E2 och/eller EE från ett vatten. Vattenlösningen och D5 blandades under 30 minuter, tills D5 var mättat på östrogen, och tilläts sedan att separera i två faser. En HPLC-analys visade ett linjärt samband för varenda ett av de tre ämnena mellan jämvikten i D5 och vatten. Alltså fördelades varje östrogen på samma vis i de två faserna oavsett sin koncentration. E1 och syntetiska EE blev till större del fördelade i den organiska fasen (D5), medan E2 till större del stannade kvar i vattenfasen. E1 var det ämne som till störst del gick över till den organiska fasen, vilket man vill förklara med att det ensamma elektronparet på östronets karbonylgrupp kan interagera med silikonatomerna i den organiska fasen. Förklaringen till EEs relativt höga fördelning i D5 kan vara den höga elektronegativiteten som dess alkyngrupp förser ämnet med (Ben Fredj *et al.* 2015). Metodens effektivitet påverkas av tre olika faktorer; D5/vatten-kvoten, pH och temperatur. Effekten av de tre faktorerna testades.

Temperaturens påverkan
Ben Fredj *et al.* (2015) kom fram till att extraktionen av östrogenerna ur vattenfasen är en endotermisk reaktion och att en ökad temperatur alltså bör ge en ökad distributionskoefficient (K). Det betyder att mer av ämnet bör extraherats från vattnet till den organiska fasen. Den generella ökningen var 1,89 %/˚C för K_{E1}, 3,43 %/˚C för K_{E2} och 2,83 %/˚C för K_{EE}. Dessa tester gjordes mellan 5-30 ˚C.

Andelen D5 i vattnet
D5/vatten-kvoten testades mellan 1:4 och 4:1. Det visade sig att ju mer D5 som användes desto effektivare extraktion. Procenthalten E1, E2 och EE som man lyckades extrahera ökade, respektive, från 38, 18 och 29 % i kvoten 1:4 till 94, 71 och 88 % i kvoten 4:1.

Högt pH minskar effektiviteten
Inte förrän ett så högt pH som över 9,5 såg man någon skillnad i distributionen av östrogen i de olika faserna, men när pH var såpass högt började distributionskvoten minska, och vid ett pH runt 12 var kvoten för både E1, E2 och EE nästan nere på 0 (Ben Fredj *et al.* 2015). Detta har sin förklaring i att molekylerna vid högt pH förlorar protoner till de mångtaliga hydroxidjonerna och i sin oxiderade form är mer vattenlösliga än i den reducerade formen. Att detta sker vid ett så högt pH beror på att pK_a för dessa ämnen är så högt som ~10,7 (Ben Fredj *et al.* 2015).

Diskussion

Att östrogener är starkt hormonstörande ämnen är vetenskapligt förankrat – de anses vara de EDC:s som har störst östrogen potential i avloppsvatten (Hamid & Eskicioglu 2012). Reningen från östrogener i reningsverk har visat sig bristfällig, då förhöjda nivåer av östrogener ofta återfinns vid reningsverksutlopp (Ternes *et al.* 1999). Detta går emot uppfattningen som Gabet-Giraud *et al.* (2010) vill framhålla om att reningen från östrogener är näst intill hundraprocentigt effektiv redan efter den biologiska nedbrytningen (steg 2) och att inga tertiära behandlingar därför behövs. Enligt Gabet-Giraud *et al.* (2010) var koncentrationen av det syntetiska östrogenet så låg att det inte var lönt att undersöka dess minskning i befintliga reningsverk. En anledning till dessa motstridiga resultat kan vara att Gabet-Giraud *et al.* (2010) använde sig av en lägsta mätningsnivå som är hög när det gäller östrogener, eftersom östrogener har påverkan på sin omgivning redan vid låga koncentrationer. För att göra rättvisa bedömningar av hur de olika östrogenerna kan elimineras behöver man ta hänsyn till deras skillnader.

Det syntetiska östrogenet, som länge använts i p-piller, och det kroppsegna E2 som börjat användas i en del preparat de senaste åren (Shulman 2013), har en del skilda egenskaper som gör att de fungerar olika bra för olika syften. Att E2 är kroppseget innebär att det antagligen är något som har funnits med under en lång tid, under tiden som människokroppen har utvecklats. Kroppen kan hantera E2 bättre på ett sätt som gör att preparat som innehåller det, i kombination med ett bra progestin, ger färre biverkningar än preparat innehållande det

syntetiska östrogenet (Mueck & Sitruk-Ware 2011). En anledning till att E2 ger färre biverkningar är att det snabbare bryts ned i kroppen. Bland annat steriska hinder gör att det syntetiska östrogenet inte påverkas på samma sätt som E2 av de inaktiverande enzymerna som bildas i levern (Peter Guengerich 1990), och det är denna egenskap, att det är tillgängligt för biologisk aktivitet under en längre tid än E2, som har gjort EE så pass användbart i preventivmedel. Det var först nyligen man lyckades ta fram ett preventivmedel med E2 som östrogen, som inte gav testgrupperna okontrollerade mellanblödningar. Problemet hade varit att hitta ett progestin som passade (Mueck & Sitruk-Ware 2011). Att minska biverkningarna av preventivmedel är självklart viktigt, men även E2 är ett östrogen med starkt endokrinstörande aktivitet. E2 påverkar, precis som EE, miljön som det kommer ut i på ett endokrinstörande sätt. Visserligen bryts E2 ned snabbare i kroppen än EE, vilket bör göra att mer östrogen hinner avverkas redan inuti kroppen och en mindre mängd extraheras. Det är oklart om något av de två östrogenerna har en bättre nedbrytning, renings- och miljömässigt. Alla olika östrogener påverkas hur som helst av biodegradering.

När det gäller biodegradering har både E2, E1 och syntetiska EE jämförbara nedbrytningshastigheter under ljusa förhållanden, vilket indikerar att ljuset på något vis aktiverar eller inducerar den heterotrofa biodegradationen av östrogenerna (Bradley & Writer 2014). Man kan spekulera kring om solens strålning hjälper till i oxidationen av östrogenerna genom att göra miljön mer reaktiv, eftersom att fotoner är kända för att få elektroner att exciteras och hoppa i elektronskalen. En av metoderna som diskuteras, fotokatalytisk oxidation, är ljusberoende. I stort sett det enda som krävs för fotokatalytisk oxidation är en katalysator och strålningsutrustning (Li Puma *et al.* 2010). Denna metod visade sig effektiv för alla berörda östrogener, men allra mest för det syntetiska östrogenet. Undersökningen visade dock endast minskningen efter 180 minuter. Vad som skulle behöva undersökas vidare är hur mycket tid som skulle krävas för att sänka koncentrationen av östrogen till noll, om det ens är möjligt med denna metod. Även ligninasmedierad oligomerisering gav tillfredsställande resultat på ca 90 % minskning av E2 när VA fanns närvarande.

Bindningen mellan LiP och substratet det katalyserar är beroende av substratets molekylära volym. Eftersom LiP inte är ett särskilt specificerat enzym - det kan interagera med en rad olika ämnen - och E2 och det syntetiska EE har jämförbara volymer bör även EE kunna genomgå en liknande process. Framtida forskning bör göras på om så är fallet. Här bör östrogenernas skillnader såväl som likheter tas i beaktande. En av deras likheter är östrogenernas semihydrofoba egenskaper.

Östrogeners benägenhet att dras till organiska kolpartiklar har att göra med deras semihydrofoba natur (Ben Fredj *et al.* 2015). Enligt undersökningen av Ben Fredj *et al.* (2015) dras östrogener mer effektivt till större partiklar, kolloider, än till andra löslighetsfaser av organiskt kol. Denna information skulle kunna användas för att rena vatten från liknande hydrofoba kemikalier i någon slags sedimenteringsprocess. Exempelvis skulle man kunna lägga in en tillsats av organiska kolloidpartiklar i det primära reningssteget och därmed säkra det mesta östrogenet i sedimentet. Liknande metoder används redan (Gabet-Giraud *et al.* 2010), där en kemisk tillsats inducerar aggregering av kolloida partiklar. Om dessa kolloida

partiklar är organiskt kol framgår inte i artikeln. Om så inte är fallet skulle det vara på sin plats att jämföra adsorptionsförmågan hos de olika kolloida partiklarna. Även i ”liquid-liquid extraction” är de semihydrofoba egenskaperna hos östrogenerna viktiga.

Eftersom de naturliga östrogenerna E1 och E2 har en högre vattenlöslighet (tabell 1) än syntetiska EE (Ben Fredj *et al.* 2015) blir också metoden mindre effektiv för att extrahera E2. För E1 fungerade metoden bra, trots att det har samma vattenlöslighet som E2, vilket antagligen beror på att när E2 degraderas till E1 blir ett ensamt elektronpar kvar på östronets karbonylgrupp och detta elektronpar kan interagera med silikonet i den organiska löslighetsfasen (Ben Fredj *et al.* 2015). Att temperaturen spelar in i denna rektion kan vara problematiskt, då temperaturen i reningsverk varierar beroende på utomhustemperaturen (Gabet-Giraud *et al.* 2010). En endotermisk reaktion kräver energitillförsel vilket kan vara i form av värme. Det skulle inte vara praktiskt om avverkningen av östrogener var tvungen att minska avsevärt under vinterhalvåret och väldigt energikrävande om reningsverken skulle behöva värmas upp till sommartemperaturer. Metoden har andra brister, som att det kan vara opraktiskt och dyrt att använda för mycket lösningsmedel i taget, samtidigt som man vill ha en så effektiv extraktion som möjligt. Istället för att använda en stor mängd D5 kunde det därför vara praktiskt om det vore möjligt att rena lösningsmedlet och använda det igen, och göra upprepade extraktioner för att bli av med så mycket östrogen som möjligt (Ben Fredj *et al.* 2015).

Både den kolloidala adsorptionen och LLE utnyttjar de hydrofoba egenskaperna hos östrogener. LLE visade sig minst effektivt för E2, som är det östrogen det finns mest av i avloppsvattnet (Ternes *et al.* 1999). För syntetiska EE var metoden väldigt effektiv. Det positiva med metoden är dess snabbhet. Även om den skulle behöva utföras i fler steg så tar det endast 30 minuter innan den organiska fasen mättats med östrogener (Ben Fredj *et al.* 2015) och är redo att renas för att användas igen. Hur denna rening av D5 skulle gå till behöver undersökas innan man kan uttala sig om metodens effektivitet.

Östrogener i naturen kan inte endast tillskrivas läke- och preventivmedelsanvändning. Bland annat djurutfodringar har avloppsrester som innehåller höga mängder EDC:s (Nie *et al.* 2014). Rening av vatten från alla slags avlopp som kan innehålla EDC:s bör prioriteras högt just på grund av att dessa ämnen är störande för det endokrina systemet. Detta gäller inte enbart fiskar i avloppspåverkade vatten. Det kan även påverka människor, bland annat för att när vi äter fisk så får vi i oss de ämnen som ackumulerats i fisken. Eftersom att E2 är det kroppsegna östrogenet kommer det alltid att finnas i och komma ut ur våra kroppar. Om man måste specialisera reningen så är det bättre att eliminera det ena östrogenet redan vid källan och endast använda E2 i preventiv- och läkemedel i framtiden. Inte för att det skulle vara skonsammare för miljön, utan för att göra reningsprocessen simplare och mer effektiv.

Tack

Tack till min handledare Tatjana Haitina som hjälpt mig att strukturera uppsatsen, mina opponenter Greta Nilén och Elin Ljunggren och till min vän Olivia Orback för stödet i

vardagen och de viktiga kafferasterna.

Referenser

Andreolini F, Borra C, Caccamo F, Di Corcia A, Samperi R. 1987. Estrogen conjugates in late-pregnancy fluids: extraction and group separation by a graphitized carbon black cartridge and quantification by high-performance liquid chromatography. Analytical Chemistry **59**:1720–1725.

Banci L, Ciofi-Baffoni S, Tien M. 1999. Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. Biochemistry **38**: 3205–10.

Ben Fredj S, Nobbs J, Tizaoui C, Monser L. 2015. Removal of estrone (E1), 17β-estradiol (E2), and 17α-ethinylestradiol (EE2) from wastewater by liquid–liquid extraction. Chemical Engineering Journal **262**: 417–426.

Bradley PM, Writer JH. 2014. Effect of light on biodegradation of estrone, 17 β -estradiol, and 17 α -ethinylestradiol in stream sediment. JAWRA Journal of the American Water Resources Association **50**: 334–342.

Cardinal-Watkins C, Nicell JA. 2011. Enzyme-catalyzed oxidation of 17β-estradiol using immobilized laccase from *Trametes versicolor*. Enzyme Research **2011**: 1-11.

Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP,Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environmental Science and Technology **32**: 1549–1558.

Fruzzetti F, Bitzer J. 2010. Review of clinical experience with estradiol in combined oral contraceptives. Contraception **81**: 8–15.

Gabet-Giraud V, Miège C, Choubert JM, Ruel SM, Coquery M. 2010. Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. The Science of the Total Environment **408**: 4257–4269.

Hamid H, Eskicioglu C. 2012. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. Water Research **46**: 5813–5833.

Hermansson M, Sörensson F, Lindgren PE, Mattson A, Wik T. 2006. Nitrifierande biofilmer för biologisk kväverening i avloppsreningsverk. VA-Forsk rapport Svenskt Vatten AB 2006:18.

Janex-Habibi ML, Huyard A, Esperanza M, Bruchet A. 2009. Reduction of endocrine disruptor emissions in the environment: the benefit of wastewater treatment. Water Research **43**: 1565–1576.

Jürgens MD, Holthaus KI, Johnson AC, Smith JL, Hetheridge M, Williams RJ. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. Environmental Toxicology and Chemistry **21**: 480–488.

Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW. 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **104**: 8897–901.

Klaassen DC, Watkins III BJ. 2010. Casarett and Doull's Essentials of Toxicology. 2:a uppl. McGraw-Hill Medical, New York.

Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, and Wen-zel A. 2003. Endocrine disrupters in the environment. Pure and Applied Chemistry **75**:631-681.

Li Puma G, Puddu V, Tsang HK, Gora A, Toepfer B. 2010. Photocatalytic oxidation of multicomponent mixtures of estrogens (estrone (E1), 17β-estradiol (E2), 17α-ethynylestradiol (EE2) and estriol (E3)) under UVA and UVC radiation: Photon

absorption, quantum yields and rate constants independent of photon absorption. Applied Catalysis B: Environmental **99**: 388–397.
Longcope C, Williams KI 1975. The metabolism of synthetic estrogens in non-users and users of oral contraceptives. Steroids **25**: 121–133.
Mao L, Huang Q, Lu J, Gao S. 2009. Ligninase-mediated removal of natural and synthetic estrogens from water: I. Reaction behaviors. Environmental Science and Technology **43**: 374–379.
Mao L, Lu J, Habteselassie M, Luo Q, Gao S, Cabrera M, Huang Q. 2010. Ligninase-mediated removal of natural and synthetic estrogens from water: II. Reactions of 17β-estradiol. Environmental Science and Technology **44**: 2599–2604.
Mishell DR. 1976. Current status of oral contraceptive steroids. Clinical Obstetrics and Gynecology **19**: 743–764.
Mueck AO, Sitruk-Ware R. 2011. Nomegestrol acetate, a novel progestogen for oral contraception. Steroids **76**: 531–539.
Nationalencyklopedin, östrogener. WWW dokument 2014-11-27: http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/östrogener. Hämtad 2014-11-27
Nie M, Yang Y, Liu M, Yan C, Shi H, Dong W, Zhou JL. 2014. Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in Shanghai: Occurrence, colloidal contribution and risk assessment. Science of The Total Environment **487**: 785–791.
Peter Guengerich F. 1990. Metabolism of 17 α-ethynylestradiol in humans. Life Sciences **47**: 1981–1988.
Rankouhi TR, Sanderson JT, van Holsteijn I, van Leeuwen C, Vethaak AD, van den Berg M. 2004. Effects of natural and synthetic estrogens and various environmental contaminants on vitellogenesis in fish primary hepatocytes: comparison of bream (*Abramis brama*) and carp (*Cyprinus carpio*). Toxicological Sciences **81**: 90–102.
Shah MM, Barr DP, Chung N, Aust SD. 1992. Use of white rot fungi in the degradation of environmental chemicals. Toxicology Letters **64/65**: 493–501.
Shulman LP. 2013. Changing convention in combination oral contraceptives: estradiol and nomegestrol acetate in a monophasic 24/4 regimen. The Journal of Family Planning and Reproductive Health Care **39**: 211–216.
Skouby SO. 2004. Contraceptive use and behavior in the 21st century: a comprehensive study across five European countries. The European Journal of Contraception and Reproductive Health Care **9**: 57–68.
Streck G. 2009. Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry **28**: 635–652.
Ternes T, Kreckel P and Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants — II. Aerobic batch experiments with activated sludge. Science of the Total Environment **225**: 91–99.
Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambré C, Tarazona JV, Brandt I, Vethaak AD. 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. Critical Reviews in Toxicology **30**: 71–133.

Naturliga och syntetiska östrogener i avloppsvatten kräver uppdaterade reningsmetoder: etisk bilaga

Ingrid Lekberg

Självständigt arbete i biologi 2014

Den självska människan

Vad är viktigast? Är det att vi människor har många tillgängliga sätt att skydda oss mot graviditet, eller är det att vi inte förstör balansen i naturens ekosystem?

Ur den antropocentriska vinkeln kan man argumentera för att det funnits en problematik med att kvinnor själva inte kunnat kontrollera när de ska bli gravida på ett säkert och fungerande sätt, och att detta problem till stor del löstes med att p-pillret uppfanns. Det handlar om valmöjlighet för kvinnor och på så vis kan p-pillret ses som en mänsklig rättighet som behövs för att ett jämställt samhälle ska vara möjligt. Man blir dock tvungen att väga fördelar mot nackdelar. Är denna sexuella frihet värd de biverkningar som kroppen utsätts för? För att kunna värdera risken mot nyttan måste man också ta in det biocentriska perspektivet där det inte bara är människosamhället som är viktigt, utan där miljön och de ekosystem som vi påverkar med våra handlingar är minst lika viktiga.

Värdet hos preventivmedel är extrinsikalt; det ligger hos funktionen att förhindra oönskade graviditeter. Det betyder att hormonpreparat skulle kunna bytas ut mot något annat. Nu finns det faktiskt hormonfria preventivmedel – som kondom, pessar och kopparspiral – men för att helt byta ut p-pillret måste man ersätta det med något som är minst lika praktiskt och behändigt. Man måste även informera om att det finns andra alternativ än hormoner.

Mycket forskning som handlar om att förbättra hormonella preventivmedel handlar endast om att minska biverkningarna för människor. Inte mycket läggs på att förbättra preparaten miljömässigt. Den delen försöker man istället ta hand om genom att hitta metoder för att rena avloppsvattnet från hormonerna.

Forskningsetik

Till den här litteratursammanställningen har jag valt så ny forskning som möjligt, när jag beskriver reningsprocesser som skulle kunna användas i reningsverk i framtiden, eftersom det är modern teknik som behövs för att göra det så effektivt som möjligt. Jag har använt mig av granskade artiklar och även tittat på tidskrifternas ”impact factor” för att försöka avgöra om en artikel är tillförlitlig. Vissa artiklar valde jag bort för att jag tyckte att vissa testparametrar var orelevanta för frågeställningen.

I texten har jag refererat till artiklarna efter att jag har redogjort för deras resultat eller använt mig av ett resonemang de för i sin diskussion. Referenser har använts överallt där jag inte för egna resonemang eller tar upp något allmänt känt. Jag gör tydligt i texten när jag presenterar mina egna tankegångar.

Jag har strävat efter att täcka forskningen kring östrogenreningsmetoder som publicerats de senaste åren, men jag är medveten om att det är lätt att missa artiklar. Jag har insett att jag valt en för bred frågeställning för att kunna täcka forskningen på det sätt jag hade velat i en uppsats av den här storleken, men jag har dock använt flera sökmotorer och varierat mina sökord för att försöka täcka så många relevanta studier som möjligt.