



Nr B 2462
Februari 2023

Biologiska effekter av mikroföroreningar

Fallstudie Rimbo reningsverk

Hannes Waldetoft, Joakim Hållén, Bahare Esfahani, Tomas Viktor, Stefan Örn, Gunnar Carlsson,
Emma Gunnerblad & Magnus Karlsson



I **samarbete med** Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsövetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet



Författare: Hannes Waldetoft, Joakim Hållén, Bahare Esfahani, Tomas Viktor och Magnus Karlsson, samtliga IVL, samt Stefan Örn och Gunnar Carlsson, SLU och Emma Gunnerblad, Norrtälje Vatten och Avfall

Medel från: Norrtälje Vatten & Avfall & Stiftelsen Institutet för Vatten- och Luftvårdsforskning

Rapportnummer B 2462

ISBN 978-91-7883-479-2

Upplaga Finns endast som PDF-fil för egen utskrift

© **IVL Svenska Miljöinstitutet 2023**

IVL Svenska Miljöinstitutet AB, Box 210 60, 100 31 Stockholm

Tel 010-788 65 00 // www.ivl.se

Rapporten har granskats och godkänts i enlighet med IVL:s ledningssystem

Innehållsförteckning

Sammanfattning.....	5
Summary	7
Inledning	9
Delstudie 1 – Recipientundersökning	11
Rimbo ARV	11
Recipientförhållanden	12
Kemisk analysmetodik	15
Läkemedel	15
Hormoner	16
PFAS	16
Fenoler	16
Effekttester	17
Föroreningssituationen i recipienten.....	18
Provtagningsmetodik	18
Resultat och diskussion – mätningar i vatten	22
Resultat och diskussion – mätningar i biota	39
Ekotoxikologiska riskkvoter	44
Delstudie 2 – utvärdering av avancerad läkemedelsrening med biologiska tester vid Rimbo ARV	48
Inledning	48
Material och metoder.....	48
Zebrafisk.....	48
Dammsnäcka.....	51
Statistiska analyser.....	52
Resultat	53
Zebrafisk.....	53
Dammsnäckor	56
Humanceller.....	58
Ekotoxikologiska riskkvoter med OZ och GAC.....	58
Diskussion	59
Reproduktion	60
Simbeteende zebrafisk.....	60
Genuttryck zebrafisk och dammsnäcka	61
Sammanfattande bedömning	62
Delstudie 3 – Läkemedelsexponering i Microcosmer.....	64
Inledning	64
Metod 64	
Försöksuppställning	65
Undersökta läkemedel	65
Försöksbetingelser	66



Resultat	67
Exponeringens påverkan på de akvatiska organismerna	67
Reproduktion hos kräftdjur	67
Fytotoxicitet	68
Analyser av läkemedel	69
Biokoncentrationsfaktorer	71
Sammanfattande diskussion och slutsatser	75
Referenser	79
Appendix A	82
Appendix B	92
Appendix C	97

Sammanfattning

Mellan december 2021 och september 2022 genomfördes i anslutning till Rimbo avloppsreningsverk (ARV) i Norrtälje kommun, mätningar av mikroföroreningar i vatten och biota. Även biologiska tester med zebrafisk och dammsnäcka, samt exponeringsförsök med arter representerandes olika trofinivåer, genomfördes. Det övergripande syftet var att utvärdera effekter av reningsverkets utsläpp av mikroföroreningar på akvatiska organismer i recipienten, samt att i allmänhet förbättra kunskapsläget avseende sådana effekter. Bakgrunden är att planering pågår för att införa avancerad rening i syfte att avskilja mikroföroreningar. Projektet är samfinansierat av Norrtälje Vatten & Avfall och Stiftelsen Institutet för Vatten- och Luftvårdsforskning. Provtagningar i vatten genomfördes i recipienterna Vallbyån och Kundbysjön, i den uppströms belägna sjön Syningen samt i verkets utgående avloppsvatten. Analyser i biota genomfördes i fisk från Kundbysjön och Syningen samt signalkräfta från Vallbyån. Mikroföroreningarna innefattade läkemedel, hormoner, PFAS och fenoler. Som komplement till mätningar av enskilda substanser användes även en uppsättning effekttester för mätning av östrogen aktivitet, androgen aktivitet, anti-androgen aktivitet samt oxidativ stress och aktivering av arylhydrokarbonreceptorn (AhR). Den östrogena effekten mättes även via *yeast estrogen screen* (YES).

Mätningar av läkemedel i vatten visade på tydliga skillnader mellan provpunkter uppströms respektive nedströms reningsverket, samt betydande variation mellan olika provtagningstillfällen, både vad gäller vilka läkemedel som detekterades och i vilka koncentrationer dessa förekom. Risk för negativ påverkan på organismer bedöms, via beräknade riskkvoter, kunna föreligga avseende exponering för framför allt citalopram och oxazepam. Dessa beräknade risker minskar om avancerad rening införs. Koncentrationerna av diklofenak och ciprofloxacin, vilka har bedömningsgrunder, låg dock under tillåtna max- och medelkoncentrationer. I gädda, abborre och sarv från Kundbysjön och Syningen detekterades flertalet läkemedel. Resultaten visade på högst halter i fisk från Kundbysjön. Detta gällde dock inte entydigt alla organ eller arter. Flest läkemedel detekterades i njure av gädda från Kundbysjön, där 11 av de 22 analyserade läkemedlen fanns i detekterbara halter i något av proven. Detta indikerar att njure av gädda är en lämplig matris för att undersöka förekomst av läkemedel i biota. Mätningar av fenoler visade på ett obetydligt tillskott av dessa från Rimbo ARV till recipient. Avseende PFAS låg summan av PFAS₁₁ i snitt på 41 ng/L i utgående vatten, men det tillskottet resulterade endast i marginella skillnader mellan referens- och recipientvatten. I abborre och gädda från Kundbysjön och signalkräfta från Vallbyån underskreds gällande gränsvärden för PFAS med god marginal. Mätningar av östrogena hormoner visade på koncentrationer av östron och 17 β -östradiol i utgående vatten från Rimbo ARV mellan <2-48 ng/L respektive <2-16 ng/L, vilket innebar ett tillskott till recipienten i och med att uppströms lokaler hade lägre koncentrationer. Mellan referens- och recipientvatten syntes dock inga tydliga skillnader. Båda dessa hade koncentrationer under eller omkring analysmetodens detektionsgräns. Det innebär att koncentrationerna i flera fall är osäkra och därmed svåra att jämföra sinsemellan och gentemot bedömningsgrunder, eftersom bedömningsgrunderna ligger lägre än analysmetodens detektionsgräns. Koncentrationen av 17 α -etinylostradiol var under detektionsgränsen på 2 ng/L i samtliga prover, och bedömningsgrunden ligger på 0,035 ng/L.

De effekttester som genomfördes visade inte på några skillnader mellan recipient- och referensvatten. Den östrogena aktiviteten, baserat på ER-aktiviteten och angivet som ekvivalenter av 17 β -östradiol, varierade mellan 0,15-1,6 ng/L i referensvatten och 0,32-1,8 ng/L i

recipientvatten, vilket resulterade i likvärdig riskklassning. Överlag bedöms den uppsättning effekttester som använts vara ett effektivt verktyg vid undersökning av förekomst av miljöfarliga ämnen, till stor del med tanke på de låga detektionsgränser testen har. YES-testet, även det angivet som ekvivalenter av 17β -östradiol, visade på effekter i nedströms provpunkter under metodens detektionsgräns på 0,1 ng/L i fem av sex prover. Vid en mätning nedströms i Vallbyån var effekten 1,7 ng/L, vilket påvisar risk för hormonstörande effekt. Resultaten påvisar också de stora variationer som kan förekomma mellan olika provtagningstillfällen. Särskilt för koncentrationer av läkemedel i vatten och fisk från recipienten förekom stor variation, vilket innebär att upprepade provtagningar representerande olika årstider och flödesållanden är nödvändiga för att teckna representativa medelvärden. Andra ämnen, exempelvis PFAS, förekom i stabilare koncentrationer.

De biologiska tester som genomfördes visade i allt väsentligt inte på några negativa effekter. Försöksorganismerna var zebrafisk, där mortalitet, äggläggning, kondition, simdistans och genuttryck mättes, samt dammsnäcka, där överlevnad, äggproduktion och genuttryck mättes. Testet, som pågick under en knapp månad, ger dock inga svar på långtidseffekter av den kroniska exponering för läkemedel som akvatiska organismer i recipienten utsätts för, utan visar mer på att akuta toxiska effekter inte föreligger. Studier för bedömning av bioackumulering av sex utvalda läkemedel (karbamazepin, citalopram, diklofenak, metoprolol, sertralin och venflaxin) genomfördes i ett microcosmsystem innehållande maskar, insekter, kräftdjur och grodor. Djuren exponerades i samma glaskärl för höga koncentrationer läkemedel som tillsattes som en engångsdos till omgivande vatten. Överlevnad, beetende, och för kräftdjuren även reproduktion, registrerades. Mängden läkemedel analyserades i ett samlingsprov av respektive organism efter 28 dygns exponering. Upptaget varierade betydligt mellan olika organismgrupper och specifika läkemedelssubstanser. Sertralin och citalopram är de mest fettlösliga av de undersökta substanserna, och koncentrationerna i grodyngel var 200 gånger högre för sertralin, respektive 40 gånger för citalopram, än i omgivande medium. Övriga substanser ackumulerades i mindre omfattning, och i vissa fall utsöndrades de under försöken så att de var lägre i de biologiska proverna än i omgivande medium.

Sammanvägt visade resultaten av denna studie inte på några tydliga negativa effekter. Det är, baserat på de kemiska mätningarna, entydigt att Rimbo ARV i varierande utsträckning bidrar med tillförsel av mikroföroreningar till recipienten. Däremot visar inte de effekttester och biologiska tester som användes på att utsläppen är stora nog för att leda till negativa effekter på akvatiska organismer. Beräkningarna av riskkvoter avseende läkemedel visade dock på att risk för negativa effekter kan föreligga avseende några läkemedel. Sammantaget ger utförda undersökningar och biologiska tester svagt stöd för att det är motiverat att införa mer avancerad rening vid Rimbo ARV avseende studerade mikroföroreningar. Den begränsade miljönytta med att införa avancerad rening vid Rimbo ARV som resultaten pekar mot bör även vägas mot den miljö- och klimatpåverkan som implementering och drift av den avancerade reningen medför. EU-kommissionen har nyligen presenterat ett förslag till ett nytt direktiv om rening av avlopp från tätbebyggelse inom unionen. I förslaget diskuteras bland annat skärpta krav på utsläppsnivåer för läkemedelsrester och andra mikroföroreningar vid reningsverk över en viss storlek. Direktivet kommer sannolikt att få stor inverkan på avloppsreningsverkens arbete i flera decennier framåt och det är därför viktigt att fler utredningar genomförs som kastar ljus över mikroföroreningars eventuella ekologiska betydelse. Det försöksupplägg som här använts, med upprepade provtagning över en längre tidsperiod både uppströms och nedströms reningsverket, samt nyttjande av konventionella kemiska mätningar, biologiska tester och effekttester, bör vara användbart i framtida studier.

Summary

Between December 2021 and September 2022, measurements in water and biota of micropollutants were conducted at Rimbo wastewater treatment plant (WWTP), located in Norrtälje municipality. Also, an in-vivo experiment using zebrafish (*danio rerio*) and great pond snail (*Lymnaea stagnalis*) was conducted, as well as an experiment assessing pharmaceutical uptake in different trophic levels of aquatic fauna. The main purpose was to evaluate the effects of the emitted micropollutants from the WWTP on aquatic organisms in the effluent receiving area, and to increase the knowledge of such effects in general. At Rimbo WWTP, there are plans to implement advanced wastewater treatment with the purpose of removing micropollutants. The project was funded by Norrtälje Vatten & Avfall and the Research foundation of IVL (SIVL).

Water sampling was conducted in the effluent receiving Vallbyån Creek and Lake Kundbysjön, in Lake Synningen located upstream of Vallbyån Creek, and in the WWTP effluent. Micropollutants included pharmaceuticals, estrogenic hormones, PFAS and phenols. In addition to chemical analyses of specific substances, bioassays of estrogenic activity, androgen activity, anti-androgen activity as well as oxidative stress and activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) were conducted. Estrogenic effects were also assessed using *yeast estrogen screen* (YES).

Measurements of pharmaceuticals in water demonstrated clear differences between upstream and downstream areas, with higher pharmaceutical load downstream. There was however substantial variability between the different sampling occasions, both regarding which substances that were detected and at which concentrations. Risks of negative effects, calculated as risk ratios, were present, mainly from exposure to diclofenac and oxazepam. These risks were shown to be reduced if advanced wastewater treatment is implemented. However, concentrations of diclofenac and ciprofloxacin, for which there are limit values, fell below the limit values. In northern pike, European perch and common rudd, several pharmaceuticals were detected. This was however not the case for all species and analyzed tissues (muscle, kidney, liver, and bile). Most pharmaceuticals were detected in kidney of pike, with 11 of 22 substances above the detection limits. This indicates that pike kidney is a suitable tissue for investigating the presence of pharmaceuticals in biota. The results showed the highest levels of pharmaceuticals in fish from Lake Kundbysjön. Measurements of phenols showed an insignificant addition of these from Rimbo WWTP to the receiving waters. Regarding PFAS, the sum of PFAS₁₁ was on average 41 ng/L in the effluent, but that addition resulted in only marginal differences between the upstream and downstream sites. In perch and pike from Lake Kundbysjön and crayfish from Vallbyån Creek, the PFAS levels were well below the current limit values. Measurements of estrogenic hormones showed concentrations of estrone and 17 β -estradiol in the effluent between <2-48 ng/L and <2-16 ng/L respectively, which indicated an addition to the receiving waters since the upstream sampling points had concentrations lower than this. Despite this, no clear differences were noted between upstream and downstream sites. Both had concentrations below or close to the detection limit at 2 ng/L. This means that they are uncertain and difficult to compare to limit values, since the limit values are lower than the detection limit. 17 α -ethinylestradiol was below the detection limit of 2 ng/L in all samples, and its limit value is at 0,035 ng/L.

The bioassays that were conducted showed no differences in activities/effects between upstream and downstream sites. The estrogenic activity ranged between 0.15-1.16 ng/L E2-equivalents upstream and 0.32-1.8 ng/L E2-equivalents downstream, resulting in the same risk assessment. In general, the bioassays used are regarded as a useful tool when examining the presence of

environmental pollutants, to which the low detection limits are a contributing factor. The YES-test showed estrogenic effects in the downstream sites below the detection limit at <0.1 ng/L E2-equivalents in five of six samples. One sample had 1.7 ng/L E2-equivalents, showing a risk for estrogenic effects.

The results also put emphasis on the significant variability that can be present between different sampling occasions. Especially for pharmaceuticals in water and fish, the variability was large, stressing the need for multiple samples representing different seasons and flow rates to obtain representative averages. Other substances, such as PFAS, were present in more stable concentrations.

The tests performed on zebrafish and great pond snail showed no clear negative effects. In zebrafish, the mortality, egg count, condition, swimming distance and gene expression were assessed. In great pond snail, mortality, egg production and gene expression were assessed. The test, going on for about a month, cannot give any answers regarding long term chronic effects, but rather shows that there are no acute toxic effects.

Studies for the assessment of bioaccumulation of six different drugs (carbamazepine, citalopram, diclofenac, metoprolol, sertraline and venflaxine) were conducted in a microcosm system containing worms, insects, crustaceans, and frogs. The animals were exposed in the same glass vessel to high concentrations of drugs that were added as a single dose. Survival, behavior and for the crustaceans also reproduction, were recorded in the various glass vessels. The amount of the drugs was analyzed in a pooled sample of each organism after 28 days of exposure. The uptake varied substantially between the different organism groups and the specific drug substance. The drugs sertraline and citalopram are the most fat-soluble of the substances examined and the concentrations in tadpoles were 200 times higher for sertraline, and 40 times for citalopram, respectively, than the surrounding medium. Other substances accumulated to a lesser extent and in some cases, they were excreted during the experiments so that they were lower than in the surrounding medium.

In summary, the results from this report show no clear negative effects. It is, based on the chemical analyses, evident that Rimbo WWTP contributes with micropollutants to the receiving waters, but the biological tests and assays indicated that the magnitude is not large enough to induce negative effects in the aquatic organisms. Calculations of risk ratios of pharmaceuticals however indicated risks from a few substances. Overall, the investigations and biological tests carried out give weak support that it is justified to introduce more advanced purification at Rimbo WWTP regarding the studied micropollutants. The limited environmental benefit of introducing advanced treatment at Rimbo WWTP that the results point towards should also be weighed against other environmental and climate impacts that implementation and operation of the advanced treatment entails. The European Commission has recently presented a proposal for a new directive on the treatment of sewage from urban areas within the Union. The proposal discusses, among other things, stricter requirements on emission levels for drug residues and other micropollutants at treatment plants above a certain size. The directive will likely have a major impact on the work of sewage treatment plants for several decades to come, and it is therefore important that more investigations are carried out that shed light on the possible ecological significance of micro pollutants. The experimental setup used here, with repeated sampling over a longer period both upstream and downstream of the treatment plant, as well as using conventional chemical measurements, biological tests, and effect tests, should be useful in future studies.

Inledning

De flesta läkemedel vi använder utsöndras via urin och avföring i oförändrad form eller som metaboliter och hamnar till slut i avloppet, och med undantag för antibiotika ökar läkemedelsanvändningen för varje år (Socialstyrelsen, 2022), varför även utsläppen av läkemedelsrester från avloppsreningsverken ökar. Läkemedelsresterna kan sedan nå våra vattendrag efter att ha passerat genom reningsverken eftersom dagens reningsverk inte är byggda för att rena bort läkemedel. Dessutom är läkemedel framtagna för att vara kemiskt stabila och för att påverka biologiska processer inom human- och veterinärmedicin. Många läkemedel är verksamma även i andra djur som de inte är avsedda för eftersom många fysiologiska funktioner är evolutionärt stabila. Eftersom reningsverken kontinuerligt släpper igenom läkemedelsrester ut i recipienten kan vattenlevande organismer konstant vara exponerade för en läkemedelscocktail.

Effekterna på vilda vattenlevande organismer i recipienter till reningsverk är relativt okända. Ett av de mest kända exemplen är feminisering av könsorgan och andra könshormonella effekter hos hanfisk från vattendrag utanför reningsverk, som sammankopplats med utsläpp av östrogena kemikalier, framförallt östrogena hormonläkemedel (Folmar et al., 2001; Folmar et al., 1996; Jobling et al., 2002; Jobling et al., 1998; Van Aerle et al., 2001). Senare studier sammankopplar, förutom östrogener, även dessa könsutvecklingsstörningar till exponering för anti-androgena kemikalier i avloppsvatten (Jobling et al., 2009; Jobling et al., 2006; Katsiadaki et al., 2012). Många studier i labmiljö har visat att miljörelevanta koncentrationer av läkemedel kan påverka viktiga funktioner i vattenlevande organismer. Fisk exponerad för naturliga och syntetiska östrogener kan feminiseras och utveckla dubbelkönighet (Kidd et al., 2007; Örn et al., 2016). Njurskador hos fisk har observerats efter exponering för det smärtstillande antiinflammatoriska läkemedlet diklofenak (Näslund et al., 2017). Psykoaktiva läkemedel har rapporterats påverka fiskens beteende med effekter på populationsnivå (Brodin et al., 2013; Klaminder et al., 2016). Beroende på de kemiska egenskaperna hos olika läkemedel uppför de sig olika när de nått våra vattendrag. Vissa läkemedel bioackumuleras i vävnad hos organismer, medan andra är långlivade och kan transporteras långa sträckor - exempelvis det anti epilektiska läkemedlet karbamazepin som har påvisats i alla delar av Östersjön (Björklenius et al., 2018).

Utifrån risken för långsiktiga negativa effekter hos vattenlevande organismer av konstant exponering av läkemedelsrester ökar behovet att införa avancerad rening på reningsverken. För att bedöma och validera behandlingseffektivitet för olika avancerade reningssteg utgör en kombination av kemiska mätningar och biologiska tester en god bas för att identifiera eventuella utsläpp från filterbehandlingen. Utvärdering med biologiska tester möjliggör identifiering av effekter från eventuella kemiska transformationsprodukter som kan skapas vid nedbrytning av läkemedel och som normalt inte identifieras via standardiserade kemiska analyser. De biologiska testerna fångar samtidigt upp den sammanlagda effekten av alla ingående kemikalier som avloppsvatten innehåller. Utöver biologiska tester kan risken för negativa effekter på akvatiska organismer i recipient också undersökas via så kallade effekttester, vilka bygger på att genmodifierade celler exponeras för ett testvatten. Dessa tester har fördelen att de inkluderar påverkan från alla enskilda ämnen eller ämnesgrupper som kan ha en viss negativ påverkan, exempelvis hormonstörande effekt. Det går också att genomföra mätningar av enskilda ämnen och sedan jämföra koncentrationen i recipient mot bedömningsgrunder eller gränsvärden. Att enbart välja ett sådant tillvägagångsätt kan dock vara vanskligt, framför allt för östrogena hormoner, där de lägsta koncentrationer som laboratorierna kan detektera oftast är högre än gränsvärdet (Holm & Önnby, 2022). Ett resultat under detekterbar nivå innebär alltså inte nödvändigtvis att gränsvärdet underskrids. Den problematiken kan undvikas genom

användande av just östrogena effekttester. Ytterligare en metod för bedömning av påverkan från läkemedel är att jämföra uppmätta koncentrationer, antingen i recipient eller utgående renat avloppsvatten, mot effektkoncentrationer framtagna från en sammanvägning av genomförda studier (Ågerstrand, 2019).

EU-kommissionen har nyligen lämnat ett förslag till ett nytt så kallat avloppsdirektiv med höga ambitioner gällande avskiljning av olika ämnen i avloppsvatten från tätorter (Regeringskansliet Faktapromemoria 2022/23:FPM21). Vid många svenska kommunala reningsverk utreds förutsättningarna för avskiljning av läkemedelsrester och andra svårnedbrytbara organiska ämnen - ofta benämnda mikroföroreningar. Planerad eller redan implementerad kompletterande rening fanns år 2021 vid ett tiotal svenska reningsverk. Vid fyra av dessa består den extra reningen av aktiverat kol, vid en står tillsättning av ozon för den extra reningen, och vid resterande sex används både aktiverat kol och ozon. Införandet av extra reningssteg medför kostnader som i slutändan hamnar på vattenkonsumenterna, och det estimeras att kostnadsökningen motsvarar 10-15 procent av dagens taxa (FORMAS, 2022). Dessutom medför driften av de extra reningsstegen ökad energi- och materialförbrukning, varför det är viktigt att nyttan med den extra reningen vägs mot ökade kostnader och annan negativ miljöpåverkan.

Kunskapsläget vad gäller mikroföroreningars förekomst i kommunala avloppsvatten är förhållandevis gott. Ett antal studier har genomförts där koncentrationer av olika substanser har mätts i utgående avloppsvatten (Baresel et al., 2015). För många ämnen finns också studier som belyst deras toxicitet gentemot olika organismer (Ågerstrand, 2019; FORMAS, 2022) vilket legat till grund för att olika bedömningsgrunder och gränsvärden införts som stöd i vattenvårdsarbetet (HVMFS, 2019). Huvuddelen av dessa studier är emellertid utförda i laboratoriemiljö där organismer under kontrollerade förhållanden exponerats för enskilda substanser.

Även fast det finns en uppsättning tillgängliga tester och metoder för effektbedömning samt att flera reningsverk redan implementerat extra rening är det otillräckligt känt i vilka koncentrationer mikroföroreningar förekommer i olika recipienter till kommunala reningsverk, i vilken mån de tas upp av förekommande organismer och vilka effekter de eventuellt ger upphov till (FORMAS, 2022). Att förbättra kunskapsläget avseende dessa frågeställningar har varit utgångspunkt för föreliggande studie som omfattar mätningar i recipientvatten och organismer samt biologiska tester med exponering av fisk och ryggradslösa djur för mikroföroreningar. Underlaget till studien emanerar från Rimbo avloppsreningsverk (ARV) och dess recipient Norrtäljeån, vars delsträcka som passerar Rimbo ARV heter Vallbyån. Norrtälje kommun genom det kommunala VA-bolaget Norrtälje Vatten och Avfall utreder för närvarande förutsättningarna och behovet av att uppgradera reningsverket.

Delstudie 1 – Recipientundersökning

Rimbo ARV

Rimbo ARV byggdes liksom många andra svenska reningsverk i slutet av 1960-talet och reningen bestod då av mekanisk rening, kemisk rening med förfällning samt en biobädd. För att skydda recipienten, Vallbyån, anlade man även en damm för uppsamling och syresättning av vattnet. Under åren har utsläppskraven skärpts och man har lagt till en efterfällning med sedimentering samt sandfilter för slutpolering av det utgående vattnet. Det senaste tillägget är en fördenitrifikation med biofilmsbärare. Idag är verkets biologiska rening (fördenitrifikation och biobädd) dimensionerad för 10 000 pe. Planering pågår för att uppgradera dessa anläggningsdelar till det tillståndsgivna 13 200 pe.

Idag tar Rimbo ARV emot vatten från Rimbo samhälle samt delar av Ekebyholm, en mindre ort norr om Rimbo. En stor del av belastningen kommer från Textilia Tvätt & Textilservice AB där man bland annat tvättar Region Stockholms tvättgods från sjukhus och vårdinrättningar.

Den beräknade maxbelastningen på verket är (exklusive extern belastning) ca 7 300 pe (5 300 boende och 2 000 pe från Textilia) men det är sällan den uppmätta belastningen överstiger 5 000 pe, mycket på grund av att många boende arbetspendlar och att belastningen från Textilia oftast ligger runt 1 000 pe förutom under belastningstoppar.

Man håller idag på med renoveringsarbeten där bland annat rötammare och slamhantering renoveras och moderniseras samt arbeten som avser att förbättra provtagning och flödesmätning i verket. När detta arbete är färdigt kommer verket även att återigen ta emot externslam från ytterverk för rötning och avvattning samt behandla septiskt slam från enskilda avlopp.

Verkets process består idag av mekanisk, biologisk och kemisk rening. Den mekaniska reningen består av rensfilter, luftat sandfång med en liten dosering av fällningskemikalie samt en försedimentering. Efter försedimenteringen fördelas vattnet till fördenitrifikation och biobädd där huvuddelen av vattnet först passerar fördenitrifikationen. Här finns även en biopumpsump samt fördelningar så att vattenflödet passerar biobädd och denitrifikationssteg flera gånger. Efter biosteget finns en mellansedimentering med två parallella linjer där slam från den biologiska reningen avskiljs. Härfter kommer vattnet till oxidations-dammen vilken nu inte längre har som syfte att syresätta vatten innan det släpps ut i recipient utan endast tjänar som en buffertvolym. Från dammen pumpas vattnet till ett kemiskt reningssteg där man doserar PIX 111 (järnklorid) som fällningskemikalie varpå flockarna avskiljs genom sedimentering. Reningsverkets sista steg är ett poleringssteg med kontinuerligt spolade sandfilter av typen Dynasand. Det färdigbehandlade vattnet släpps sedan ut i Vallbyån. På grund av att Vallbyån är liten med tidvis låg vattenföring och att man nedströms gjort restaurering av en fågelsjö så har verket de hårdaste utsläppskraven i Norrtälje kommun (**Tabell 1**).

Tabell 1 Utsläppskrav för Rimbo ARV. Riktvärdena för organiskt material, fosfor och totalkväve är per kvartal och gränsvärdena är per kalenderår. Kraven för utsläpp av ammoniumkväve föreligger endast under juni till oktober för både rikt- och gränsvärde.

	Organiskt material (BOD 7) mg/L	Totalfosfor mg/L	Ammoniumkväve mg/L	Totalkväve mg/L
Riktvärde	0,5	0,25	3	15
Gränsvärde	0,5	0,25	5	-

Recipientförhållanden

Rimbo ARV är beläget inom Norrtäljeåns avrinningsområde (**Figur 1**). Norrtäljeåns avrinningsområde är 350 km² stort och domineras av skogsmark (55 %). Andelen jordbruksmark är förhållandevis hög och uppgår till ca 25 procent medan andelen sjöar och vattendrag till ca sju procent (källa: SMHI). Norrtäljeån består av fyra huvudgrenar - Vallbyån som passerar Rimbo, Vretaån från Rö i sydväst, Kyrksjöån i syd och Malstaån i norr. Vallbyån och Vretaån sammanflödar strax innan utloppet i Lommaren vid Husby-Sjuhundra. Även Malstaån och Kyrksjöån har sina utlopp i Lommaren. Efter Lommarens utlopp fortsätter ån genom Norrtälje stad för att slutligen mynna ut i Östersjön i Norrtäljeviken.

De sjöar som primärt studerats i föreliggande studie är Syningen, belägen uppströms Rimbo samt Kundbysjön, som är belägen nedströms. Vallbyån förbinder de två sjöarna och rinner genom Rimbo tätort, där även utsläppspunkten för renat avloppsvatten från Rimbo ARV är belägen (**Figur 1**). Förutom Vallbyån mynnar Långsjöns utlopp ut i Kundbysjön. I **Tabell 2** redovisas ett antal hydromorfologiska mått för sjöarna Syningen och Kundbysjön.

Tabell 2 Medeldjup, maxdjup, area, volym, omsättningstid, medelvattenföring (MQ) och medellågwaterföring (MLQ) i respektive sjöutlopp (källa: SMHI).

Sjö	Medeldjup (m)	Maxdjup (m)	Area (km ²)	Volym (Mm ³)	Omsättningstid (dagar)	MQ (m ³ /s)	MLQ (m ³ /s)
Syningen	2,4	2,5	1,22	2,9	57	0,59	0,20
Kundbysjön	1,0	2	0,245	0,25	4	0,76	0,21



Figur 1 Översiktskarta som visar Norrtäljeans avrinningsområde och Rimbo ARV. Orange cirkel visar utsläppspunktens läge i Vallbyån.

Kundbysjön kan karaktäriseras som en grund slättlandssjö med hög förekomst av makrofyttisk vegetation. Närområdet runt sjön domineras av våtmarksområden och jordbruksmark. Sjön har en ungefärlig yta på 24,5 ha, medeldjup på ca 1,0 meter. Räknat på medelvattenföringen i Kundbysjöns utlopp är omsättningstiden i sjön ca 4 dagar. Nedströms Kundbysjön rinner Vallbyån in i sjön Björkarn, som även den är grund och även den kraftigt igenväxt. Båda sjöarna fungerar således mer eller mindre som våtmarker och står sannolikt för ett betydande närsaltsupptag, åtminstone under sommarhalvåret.

Vallbyån rinner vidare in i Husbyån som i sin tur rinner in i sjön Lommaren (med volym ca 5,5 Mm³ och omsättningstid på ca 30 dagar) och vidare till Norrtäljeviken i Östersjön. Det är en liten höjdskillnad mellan reningsverkets utläppspunkt i Vallbyån och Husbyån nedströms Björkarn, varvid vattnet rinner långsamt och någon mekanisk syresättning ej är att vänta på denna sträcka. Både uppströms Rimbo ARV i Vallbyån till Syningen och nedströms Björkarn är nivåskillnaderna större och vattnet strömmar med betydligt större vattenhastigheter.

Syningen, som är belägen uppströms reningsverket i Vallbyån, har ett medeldjup på ca 2,4 meter och en längre omsättningstid på ca 57 dagar. Sjöns inlopp och utlopp utgörs av våtmarksområden.

Recipientkontroll

I Norrtälje kommun finns 20 kommunala avloppsreningsverk av varierande storlek, varav Rimbo ARV är ett av dessa. Effekter av reningsverkens påverkan på vattenmiljön övervakas genom ett recipientkontrollprogram (Lindqvist, 2022). Programmet omfattar såväl biologiska som fysikalisk-kemiska undersökningar av de sjöar, vattendrag och kustområden som utgör direkta eller indirekta recipienter för reningsverken. Recipientkontrollprogrammet har utformats för att möta de krav som ställs genom EU:s vattendirektiv.

I **Tabell 3** redovisas uppmätta nivåer av ett antal fysikalisk-kemiska parametrar i Syningen och Kundbysjön. Data avser perioden 2019–2020 och är hämtat från den samordnade recipientkontrollen.

Tabell 3 Nivåer av ett antal fysikalisk-kemiska parametrar i Syningen och Kundbysjön. Data från perioden 2019–2020, hämtat från den samordnade recipientkontrollen.

Lokal	Syrgashalt (mg/l O ₂)*	Syrgasmättnad (%)*	Siktdjup (m)	Tot-N (µg/L N)	Tot-P (µg/L P)	TOC (mg/L C)
Syningen	9,5	80,7	1,6	1387	36,4	18,2
Kundbysjön	10,0	89,5	1,8	2599**	51,5	

*avser bottenvatten

**1 686 µg/l exkluderat februari 2019, då 7 020 resp. 7 315 µg/l uppmättes i Kundbysjön

Ekologisk och kemisk status

De två i huvudsak berörda vattenförekomsterna som omfattas av Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om god ekologisk och kemisk status, är i föreliggande studie "Norrtäljeån-Vallbyån" och "Norrtäljeån-Balkensån". Norrtäljeån-Vallbyån sträcker sig från Syningens utlopp tills att Vallbyån grenar ihop sig med Långsjöns utlopp och går då över i Norrtäljeån-Balkensån som sträcker sig genom Kundbysjön och Björkarn tills att ån grenas ihop med Husbyån ("Norrtäljeån-Husbyån").

Både Norrtäljeån-Vallbyån och Norrtäljeån-Balkensån klassas i VISS (Vatteninformationssystem Sverige) till måttlig ekologisk status, med övergödning och fysisk påverkan som utslagsgivande faktorer för bedömningen. Med avseende på övergödning anges i VISS för Norrtäljeån-Vallbyån:

”Kvalitetsfaktorn näringsämnen är utslagsgivande med avseende på miljökonsekvenstyp övergödning och resulterar i måttlig status. Bedömningen har låg tillförlitlighet utifrån miljökonsekvenstyp övergödning eftersom: 1) Klassningen av näringsämnen är osäker i förhållande till klassgränsen god/måttlig status. 2) Klassning av relevant biologisk parameter saknas. 3) Betydande påverkan har konstaterats med avseende på miljökonsekvenstyp övergödning.”

Och för Norrtäljeån-Balkensån:

”Kvalitetsfaktorn kiselalger (IPS) är utslagsgivande med avseende på miljökonsekvenstyp övergödning och resulterar i måttlig status. Bedömningen har låg tillförlitlighet utifrån miljökonsekvenstyp övergödning eftersom: 1) Klassningen av kiselalger är osäker i förhållande till klassgränsen god/måttlig status. 2) Klassning av relevant stödjande parameter saknas. 3) Betydande påverkan har konstaterats med avseende på miljökonsekvenstyp övergödning.”

Kemisk status klassas till ”Uppnår ej god” för båda vattenförekomsterna. Detta på grund av att gränsvärdena för de prioriterade ämnena kvicksilver (Hg) och polybromerade difenyleterar (PBDE) överskrids. Havs- och vattenmyndigheten har utifrån en nationell analys gjort bedömningen att gränsvärdena för Hg och PBDE överskrids i Sveriges alla vattenförekomster. Orsaken till detta är att långväga atmosfärisk deposition av Hg och PBDE till mark och vatten resulterat i en belastning av dessa ämnen så att halterna i vatten överskrider sina respektive gränsvärden.

Kemisk analysmetodik

Kemiska analyser utfördes vid IVL Svenska Miljöinstitutets laboratorium i Stockholm för haltbestämning av läkemedel, östrogena hormoner, poly- och perfluorerade ämnen (PFAS) samt alkylfenoler och bisfenol A i både vattenprover och biologiska prover. Östrogena effekttester (YES-test) utfördes vid IVLs laboratorium i Stockholm för bestämning av effektkoncentrationen av hormonstörande ämnen i vattenprover. Övriga effekttester genomfördes av Biocell Analytica AB i Uppsala.

Läkemedel

Vattenprover spikades med isotopmärkta standarder innan de extraherades med HLB fastfaskolonner och eluerades med 5ml metanol följt av 5ml aceton. Extraktet indunstades till torrhet och återlöstes i 1ml metanol: vatten (1:1) och filtrerades in i LC vialer.

Hela organismer från ekotoxikologiska tester (se Delstudie 3 för samtliga arter) frystorkades och homogeniserades samt spikades med isotopmärkta standarder innan de extraherades med vätskeextraktion. Fiskmuskelprover homogeniserades och spikades med internstandard innan de extraherades med vätskeextraktion. Extraktionen skedde i 3 omgångar, först med surgjord metanol:vatten lösning (7:3) följt av två gånger med acetonitril. Extraktet indunstades till torrhet och återlöstes i 1ml metanol: vatten (1:1) och filtrerades in i LC vialer.

Njure, lever och hepatopankreas från fisk och kräfta homogeniserades och spikades med isotopmärkta standarder innan de extraherades med 10ml acetonitril. Fettet extraherades med hexan och avlägsnades. Provextraktet indunstades till torrhet och återlöstes i 1ml metanol: vatten (1:1) och filtrerades in i LC vialer.

Gallvätskeprover från fisk spikades med isotopmärkta standarder innan de extraherades med vätske-vätskeextraktion i diklormetan och mättad saltlösning. Vattenfasen avlägsnades och den återstående organfasen indunstades till torrhet. Extraktet återlöstes sedan i 1ml metanol: vatten (1:1) och filtrerades in i LC vialer.

Proverna analyserades på HPLC-MS/MS med en bifenylnkolonn. Halten av läkemedel i proverna uppskattades mot en kalibreringskurva och justerades för återvinning för varje ämne.

Hormoner

Vattenprover spikades med isotopmärkta standarder och surgjordes till pH <4 innan de extraherades med ENV+ fastfaskolonner och eluerades med 12ml metanol: metyl-tert-butyleter (1:9). Extraktet indunstades till torrhet och återlöstes i 4ml metanol: etylacetat (2:8) och renades sedan på PSA fastfaskolonner. Extraktet indunstades till torrhet igen och återlöstes i 1,5 ml metanol: vatten (1:1) och filtrerades in i LC vialer.

Proverna analyserades på HPLC-MS/MS med en C18 kolonn. Halten av hormoner i proverna uppskattades mot en kalibreringskurva och justerades för återvinning för varje ämne.

PFAS

Vattenprover spikades med isotopmärkta standarder innan de extraherades med WAX fastfaskolonner och eluerades med 4ml metanol följt av 4ml 0,1% ammonium: metanol-lösning. Extraktet indunstades tills 1ml återstod och överfördes till vial varpå volymetrisk standard tillsattes.

Muskelprover av fisk och kräfta homogeniserades och spikades med isotopmärkta standarder innan de extraherades med 2 X 5ml metanol. Extraktet indunstades till 1ml och renades med 25mg tillsatt aktivt kol som sedan avlägsnades med centrifugering. Till extraktet tillsattes sedan ammoniumacetatlösning för utfällning av ytterligare orenligheter som avlägsnades genom centrifugering. Det renade extraktet överfördes sedan till LC vial.

Proverna analyserades på HPLC-MS/MS med en C8 kolonn. Halten av PFAS i proverna uppskattades mot en kalibreringskurva och justerades för återvinning som beräknats från den volymetriska standarden.

Fenoler

Vattenprover spikades med isotopmärkta standarder och surgjordes till pH <4 innan de extraherades med metyl-tert-butyleter följt av pentan i separertratt. Extraktet indunstades till torrhet och återlöstes i 1ml metanol: vatten (1:1) och filtrerades in i LC vialer.

Proverna analyserades på HPLC-HRMS med en C18 kolonn. Halten av fenoler i proverna uppskattades mot en kalibreringskurva och justerades för återvinning för varje ämne.

Effekttester

Jästceller (YES-test)

YES, eller *yeast estrogen screen* är ett in-vitro screeningtest baserat på modifierade jästceller som undersöker östrogen aktivitet (se exempelvis Svenson et al. (2003)). Testet påvisar den totala östrogena aktiviteten i ett vattenprov, angivet som ekvivalenter av 17β -östradiol. Till skillnad från att direkt mäta koncentrationen av 17β -östradiol i ett vattenprov ger YES-testet en sammanvägd bild av den östrogena aktiviteten - det väger alltså in påverkan från samtliga ämnen i provet med östrogen aktivitet. De modifierade jästcellerna innehåller en human östrogenreceptor kopplat till en reporter gen som producerar ett enzym som omvandlar den tillsatta färgindikatorn då östrogenliknande ämnen binder till receptorn.

Vattenprover surgjordes med HCl till pH $3\pm 0,1$ innan de extraherades med ENV+ fastfaskolonner och eluerades med 8ml aceton. Dimetylsulfoxid tillsattes till extraktet som sedan indunstades tills all aceton evaporerats. Extraktet pytsades ut på plattor med modifierade jästceller samt tillväxtmedium och färgindikator som inkuberades vid $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 3 dygn.

Plattorna analyserades med en spektrofotometer vid 540nm samt 620nm och effektkoncentrationen av östradiolekvivalenter uppskattades mot en kalibreringskurva samt en positiv kontroll.

Humanceller

Provvatten koncentrerades 5000 ggr via fastfasextraktion och späddes sedan minst 100 gånger under analysen. Den slutliga koncentrationsfaktorn var därmed som högst 50 ggr högre jämfört med ett okoncentrerat vattenprov.

Initialt testades proverna för cytotoxicitet för att utesluta sådan stor allmäntoxisk påverkan att det inte går att mäta specifika toxiska effekter i proverna. Därefter analyserades proverna i spädningsserier om minst fyra koncentrationer, för varje analys.

Testerna genomförs på odlade celler som modifierats för att medge mätning av specifika toxiska effekter. Det som mäts är i vilken utsträckning en viss receptor i cellen aktiveras. Storleken på aktiveringen motsvarar effekten från samtliga ämnen i ett prov som kan ge utslag för just den specifika receptorn. De receptorer som undersökts är östrogenreceptorn (ER), androgenreceptorn (AR) arylhydrokarbonreceptorn (AhR) samt oxidativ stress (Nrf2).

Effekten anges som en ekvivalent av en referenssubstans. För AhR-aktivitet är referenssubstansen *2,3,7,8-tetraklorodibenzodioxin (TCDD)*, för ER-aktivitet *17 β -östradiol*, för AR-aktivitet *dihydrotestosteron (DHT)*, för anti-AR-aktivitet *hydroxyflutamid (OHF)* och för Nrf2-aktivitet *tertiär butylhydrokinon (tBHQ)*.

För att avgöra om ett prov innehöll ämnen som kan ge toxisk effekt undersöktes först om någon av de analyserade koncentrationerna hade aktiviteter högre än en på förhand bestämd detektionsgräns. Prover med aktivitet över denna gräns klassades som aktiva, och en aktivitet angivet som ekvivalenter av referenssubstansen beräknades.

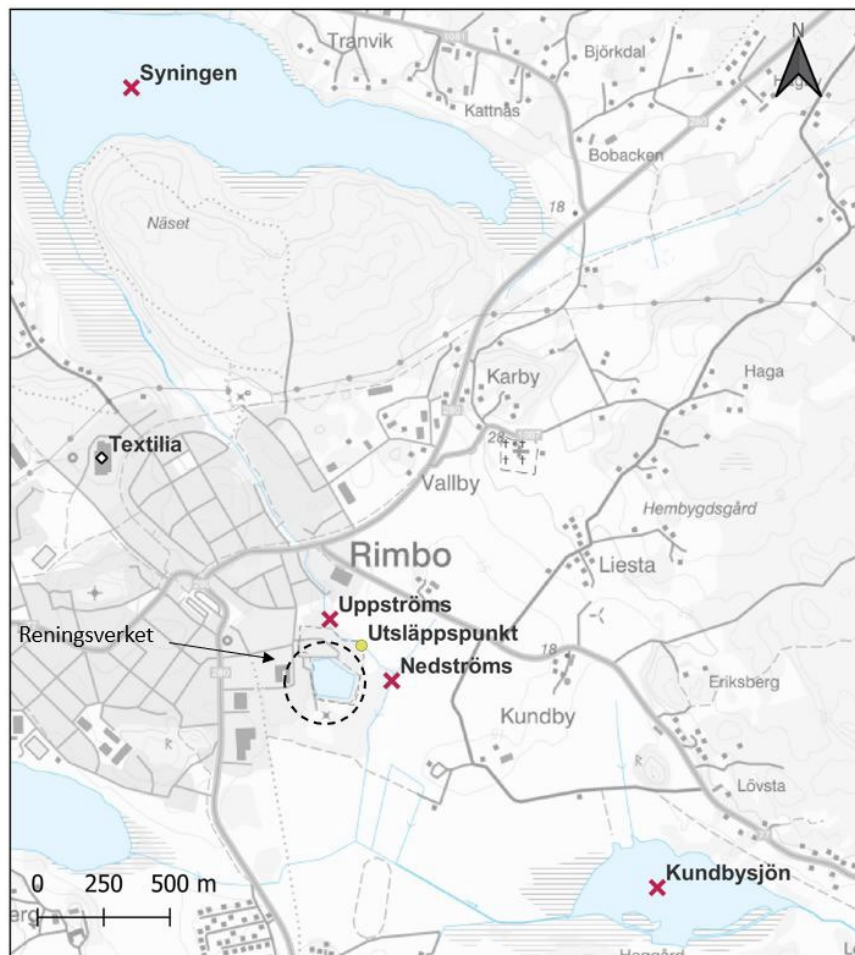
Dessa tester genomfördes av Biocell Analytica AB.

Föroreningsituationen i recipienten

Provtagningsmetodik

Vattenprover

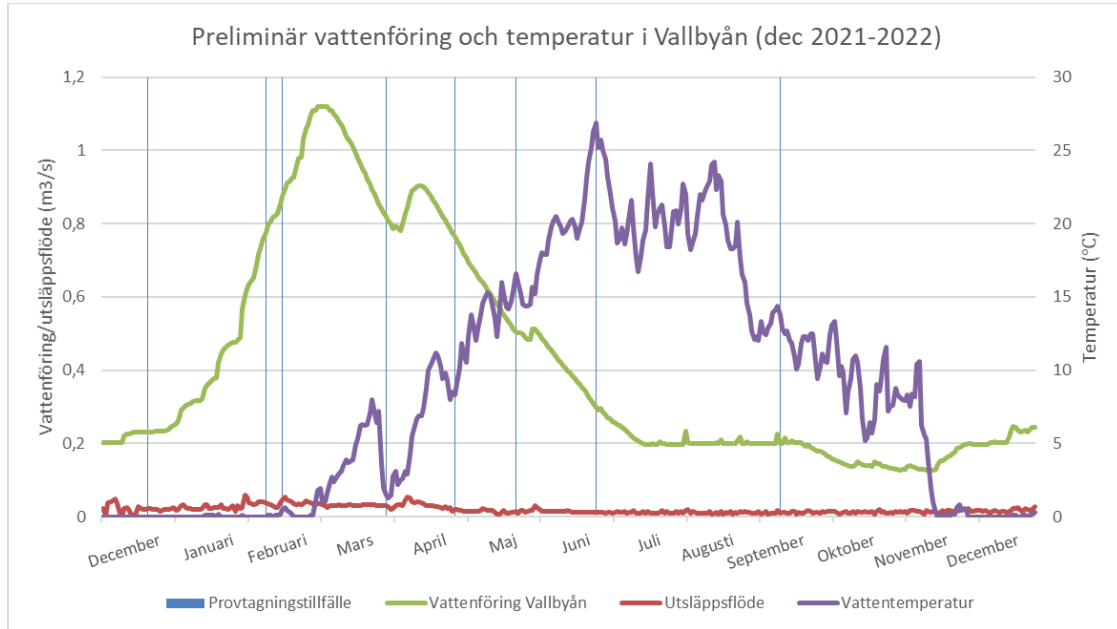
Analyser av mikroföroreningar i vattenprover genomfördes från totalt sju provpunkter: inkommande avloppsvatten, utgående avloppsvatten, uppströms i Vallbyån, nedströms i Vallbyån, i sjöarna Syningen och Kundbysjön, samt i tvätteriet Textilias utgående avloppsvatten (**Figur 2**). Provpunkten uppströms i Vallbyån valdes som referens till provpunkten strax nedströms reningsverkets utloppspunkt. Syningen valdes som referenssjö till Kundbysjön. Denna rapport fokuserar på provpunkterna utgående, uppströms, nedströms, Syningen och Kundbysjön.



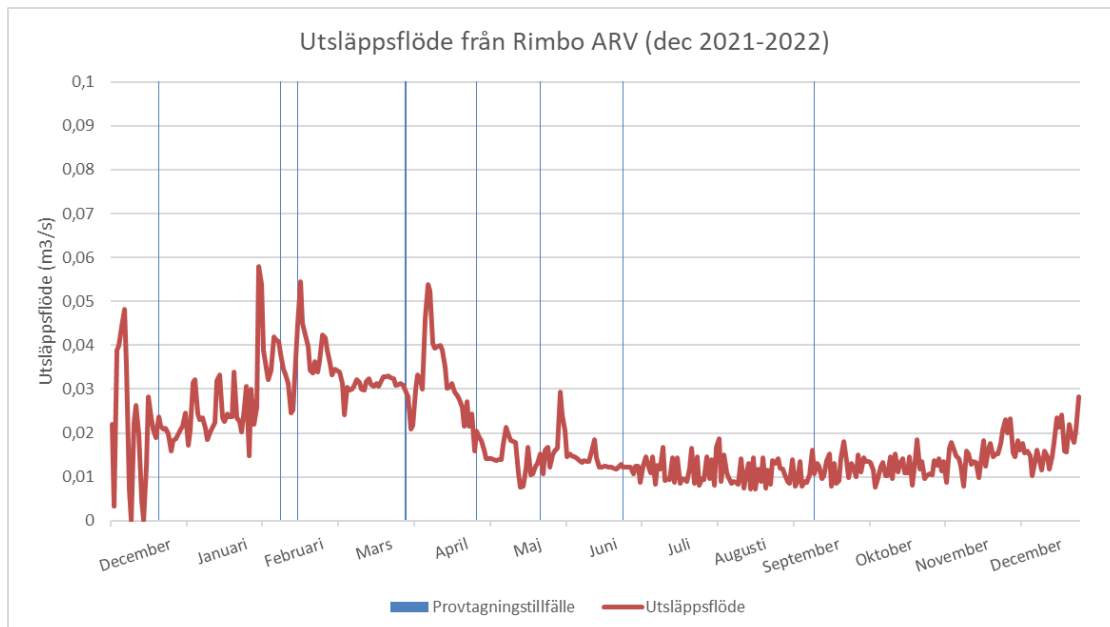
Figur 2

Områdeskarta med Rimbo ARVs utsläppspunkt, tvätteriet (Textilia), uppströms- och nedströms provpunkter samt sjöarna Kundbysjön och Syningen. Vattenytan inom reningsverkets område är en sedimentationsdamm. Inkommande och utgående vatten provtaget inne på reningsverkets område.

Vattenprover i utgående vatten, uppströms och nedströms provpunkter togs på månadsbasis mellan december 2021 och september 2022, med undantag för januari, juli och augusti (**Tabell 4**). Vid varje provtagning analyserades läkemedel. I övrigt förekom viss variation i analyserna, mot bakgrund av att genomgång av delresultat visat på att mindre frekvent provtagning gett tillräcklig underlag, samt av budgetmässiga skäl. Under provtagningsperioden varierade flödet i Vallbyån enligt **Figur 3**, och verkets utgående flöde **Figur 4**. Flödet i Vallbyån är reglerat, med ett minimum på 0,2 m³/s, vilket syns i **Figur 3**.



Figur 3 Provtagningsstillfällena (vatten) i relation till vattenföring och temperatur i Vallbyån (data: SMHI vattenwebb).



Figur 4 Provtagningsstillfällena (vatten) i relation till utsläppsflöde från Rimbo (data från reningsverkets egna mätningar).

Tabell 4 Provtagningsmatris för vattenprovtagningen. Uppdelat per provpunkt och ämnesgrupp.
*december 2021. Övriga månader under 2022.

Provpunkt	Ämnesgrupp	dec*	jan	feb	mar	apr	maj	jun	jul	aug	sep
Nedströms	Läkemedel	x		x	x	x	x	x			x
	Hormoner	x		x	x	x	x				
	YES-test			x	x		x	x			
	Fenoler				x		x	x			
	PFAS			x	x	x		x			
	Celltester				x		x	x			
Uppströms	Läkemedel	x		x	x	x	x	x			x
	Hormoner	x		x	x	x	x				
	YES-test			x	x		x				
	Fenoler				x		x	x			
	PFAS			x	x	x		x			
	Celltester				x		x	x			
Utgående	Läkemedel	x		x	x	x		x			x
	Hormoner	x		x	x	x					
	YES-test			x	x			x			
	Fenoler				x			x			
	PFAS			x	x	x		x			
	Celltester				x			x			
Inkommande	Läkemedel			x	x	x					
	Hormoner			x	x	x					
	YES-test			x	x						
	Fenoler				x						
	PFAS			x	x						
	Celltester				x						
Textilia	Läkemedel			x		x					
	Hormoner			x		x					
	YES-test			x							
	Fenoler					x					
	PFAS			x		x					
Kundbysjön	Läkemedel	x		x			x	x			
	Hormoner	x		x			x				
	YES-test						x	x			
	Fenoler						x	x			
	PFAS							x			
	Celltester						x	x			
Syningen	Läkemedel			x			x	x			
	Hormoner			x			x				
	YES-test						x				
	Fenoler						x	x			
	PFAS							x			
	Celltester						x	x			

Vatten för analys av läkemedel, hormoner, YES-test och PFAS uttogs i 1-liters plastflaskor. Fenolproverna uttogs i brända glasflaskor om 250-500 ml, alternativt teflonflaskor om 1 liter. Stickprov i ytvatten togs för provpunkterna uppströms, nedströms, Kundbysjön och Syningen. För inkommande avloppsvatten, utgående avloppsvatten och Textilias utgående vatten uttogs samlingsprover på veckobasis (veckoprover). I de fall större variationer i inkommande flöden förelåg under provtagningsveckan flödesviktades provmängderna för respektive dygn innan samlingsprov blandades. Analyspaketet inkluderade 24 läkemedel (**Tabell 5**), tre hormoner, 19 olika PFAS, tre fenoler och sex effekttester (**Tabell 6**).

Tabell 5 Undersökta läkemedel och deras terapeutiska effekt.

Substans	Terapeutisk effekt
Atenolol	Blodtryckssänkande
Karbamazepin	Antiepileptika
Ciprofloxacin	Antibiotika
Citalopram	Antidepressiv
Klaritromycin	Antibiotika
Diklofenak	Anti-inflammatorisk
Erytromycin	Antibiotika
Flukonazol	Antimykotika
Furosemid	Diuretika
Ibuprofen	Anti-inflammatorisk
Ketokonazol	Antimykotika
Losartan	Blodtryckssänkande
Metotrexat	Cytostatika
Metoprolol	Blodtryckssänkande
Naproxen	Anti-inflammatorisk
Oxazepam	Ångstdämpande/lugnande
Paracetamol	Smärtstillande
Propranolol	Blodtryckssänkande
Sertralin	Antidepressiv
Sulfametoxazol	Antibiotika
Tramadol	Smärtstillande
Trimetoprim	Antibiotika
Venlafaxin	Antidepressiv
Zolpidem	Sömnmedel

Tabell 6 Ingående ämnen i varje ämnesgrupp/kategori som undersökts, exklusive läkemedel.

Analyter			
Hormoner	Östron (E1)	17 β -Östradiol (E2)	17 α -Etinylöstradiol (EE2)
PFAS	PFBA	PFUnDA	PFNS
	PFPeA	PFDoDA	PFDS
	PFHxA	PFBS	PFUnDS
	PFHpA	PFPeS	6:2 FTS
	PFOA	PFHxS	8:2 FTS
	PFNA	PFHpS	
	PFDA	PFOS	
	Fenoler	Bisfenol A	4-n-nynolfenol
Effekttester	YES-test	AR-aktivitet	Anti-AR-aktivitet
	Nrf-aktivitet	ER-aktivitet	AhR-aktivitet

Biotaprover

Utöver vatten undersöktes också fisk från Kundbysjön och Syningen, samt signalkräfta från Vallbyån. Fisken analyserades för läkemedel i muskel, njure, lever och galla. Kräftorna analyserades för läkemedel i stjärtmuskeln och för PFAS i hepatopankreas, vilket är ett organ som kombinerar de funktioner som i människa sköts av lever och bukspottkörtel.

Fiskeinsatser genomfördes i mitten av februari 2022 och i slutet av maj 2022. Fisket i februari bedrevs från isen med angeldon medan det i maj bedrevs med bottenstående nät. Av den fångade fisken preparerades individprover av muskel, lever, galla och njure. Undantaget är sarv, där njuren analyserades som ett samlingsprov (Tabell 7). Kräftfisket genomfördes i september ca 200 m uppströms respektive ca 200 nedströms reningsverkets uppsläppspunkt i Vallbyån. Ett samlingsprov från uppströms provpunkt bildades av fyra kräftor och två samlingsprover från nedströms provpunkt bildades av fem kräftor vardera.

Tabell 7 Provmatrix för analyser av läkemedel i fisk från Syningen och Kundbysjön. Visar arter, organ, fångstplats och antal individer/prover som analyserades.

		Syningen	Kundbysjön		
		Gädda	Gädda	Abborre	Sarv
Feb	Organ	Muskel, lever, galla och njure	Muskel, lever, galla och njure	Muskel, lever, galla och njure	
	Antal analyser	3	2	1	
Maj	Organ	Njure	Njure		Njure
	Antal analyser	1	1		1*

*analyserades som samlingsprov av njure från fem individer. Övriga prover var individprover.

Resultat och diskussion – mätningar i vatten

Läkemedel

Resultaten avseende läkemedel redovisas som skillnader mellan Kundbysjön-Syningen och uppströms-nedströms i Vallbyån, samt som jämförelse mot miljö kvalitetsnormer för de läkemedel där sådana finns framtagna. Om en koncentration varit lägre än analysmetodens detektionsgräns

(LOD) har koncentrationen satts till noll, för att i figurerna ge en tydligare bild av vilka läkemedel som detekterats. Samtliga primärdata redovisas i **Appendix A**.

Baserat på mätningarna i utgående vatten presenteras inledningsvis en skattning av vilka mängder av varje substans som årligen tillförs Vallbyån (**Tabell 8**). Mängderna beräknades genom att multiplicera medelkoncentrationer i utgående vatten med medelflödet av utgående vatten på 800 000 m³/år. Resultaten visar att som mest 1000 gram av en enskild substans (losartan) släpps ut från Rimbo ARV. Totalt skattas 6 500 gram av dessa 24 substanser nå recipienten per år. Osäkerhetsintervallet är dock relativt brett (1 500 g, 12 000 g). Det bör också nämnas att totalmängderna endast inkluderar de 24 substanser som inkluderats i dessa analyspaket. I verkets utgående vatten finns naturligtvis flertalet andra läkemedel som bidrar till totalhalten. Mängderna av ciprofloxacin och ketokonazol är högst osäkra på grund av litet antal mätningar. Inget konfidensintervall beräknades för metotrexat eftersom fyra mätningar var <2 ng/L och ett förekom som spårvärde, mellan 1-3 ng/L.

Tabell 8 Beräknade mängder (gram) läkemedel som släpps ut i Vallbyån per år från Rimbo ARV. Redovisat som snittmängd samt nedre och övre gräns baserat på 95% konfidensintervall. Om konfidensintervallets nedre gräns varit negativ (<0) anges denna som noll i tabellen. *endast baserad på två, respektive ett mätvärde.

Substans	Medel (g)	Nedre gräns (g)	Övre gräns (g)	Antal mätningar
Atenolol	47	17	76	6
Karbamazepin	110	62	160	6
Citalopram	100	23	180	6
Klaritromycin	43	6,4	79	6
Diklofenak	610	65	1200	6
Erytromycin	9,6	0	33	6
Flukonazol	84	23	140	6
Furosemid	810	160	1400	6
Ibuprofen	990	0	2500	6
Losartan	1000	350	1700	6
Metoprolol	810	350	1300	6
Naproxen	540	85	1000	6
Oxazepam	260	110	410	6
Paracetamol	36	0	110	6
Propranolol	43	9	78	6
Sertralin	22	6,5	38	6
Sulfametoxazol	290	95	490	6
Tramadol	200	90	300	5
Trimetoprim	46	18	73	6
Venlafaxin	300	26	580	6
Zolpidem	1	0	2,3	6
Ciprofloxacin*	110	0	1000	2
Ketokonazol*	60			1
Metotrexat	0,16			5
<i>Totalt</i>	6500	1500	12000	

Uppströms och nedströms provpunkt i Vallbyån

Koncentrationerna uppströms i samtliga mätningar var under LOQ, men förekom i vissa fall som spårvärden (se **Appendix A-Tabell A:1**). Nedströms däremot detekterades olika läkemedel frekvent (**Appendix A-Tabell A:2**). Beräkningar av variationskoefficient (CV) genomfördes för de läkemedel som kunde detekteras i minst hälften av de åtta mätningarna (**Tabell 7**). Resultaten visade på CV-värden mellan 63 och 169%, vilket tolkas som generellt stor spridning i koncentrationer. CV=100% innebär att den genomsnittliga spridningen (standardavvikelsen) är lika stor som medelvärdet. Max- och minvärdena visar också tydligt på att spridningen är stor. Exempelvis var maximal koncentration ibuprofen 610 ng/L medan minimum var <4 ng/L.

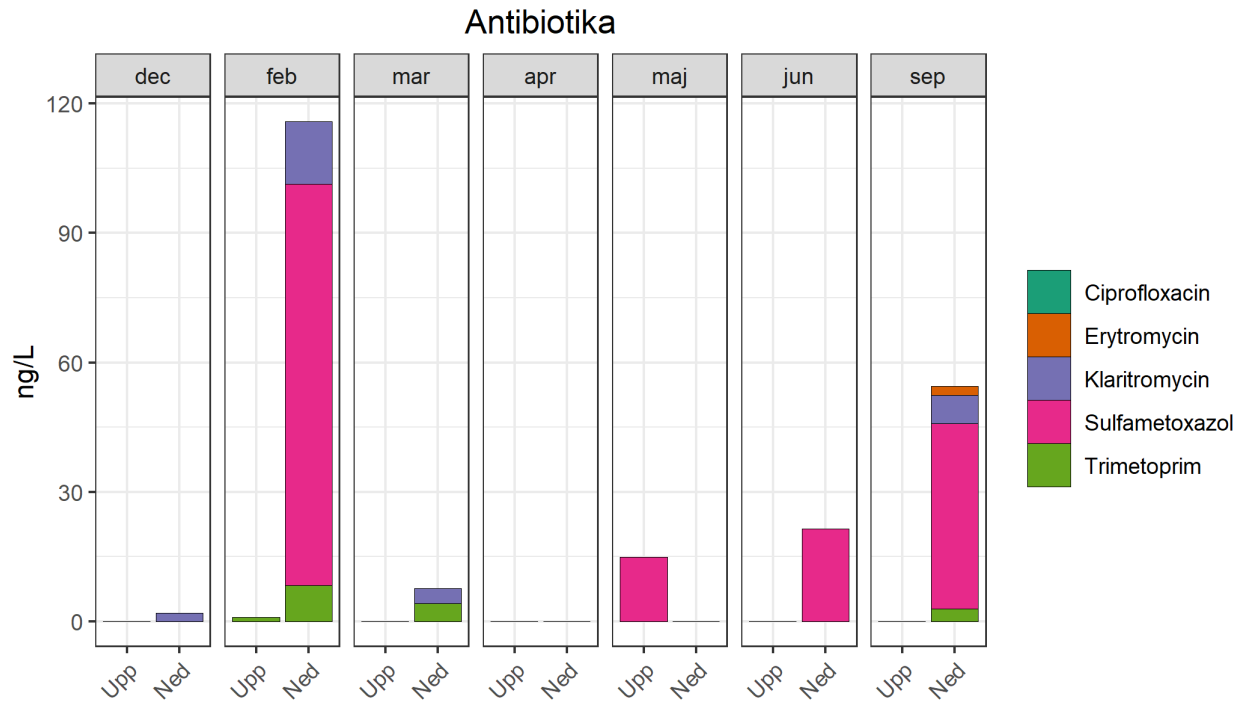
Tabell 9 Medelvärde och spridningsmått för de läkemedel som detekterades i minst hälften av de åtta proverna från nedströms provpunkt i Vallbyån.
CV (variationskoefficient) = $100 \cdot \text{stdev} / \text{medel}$.

Substans	Medel (ng/L)	Min (ng/L)	Max (ng/L)	Stdev (ng/L)	CV (%)
Atenolol	4,2	<2	10	3,2	75
Citalopram	9,9	<2	21	7,6	77
Diklofenak	65,8	11,7	210	76,2	116
Ibuprofen	159,5	<4	610	269,1	169
Losartan	95,8	22,1	330	100,8	105
Metoprolol	76,6	<6	170	73,4	96
Naproxen	43,9	11,0	88	27,0	62
Oxazepam	20,2	6,9	47	14,6	73
Sertralin	2,0	<2	4,1	1,2	63
Sulfametoxazole	34,1	<4	130	43,5	127
Trimetoprim	3,9	<2	10	3,0	77
Venlafaxin	27,6	<2	110	37,2	135

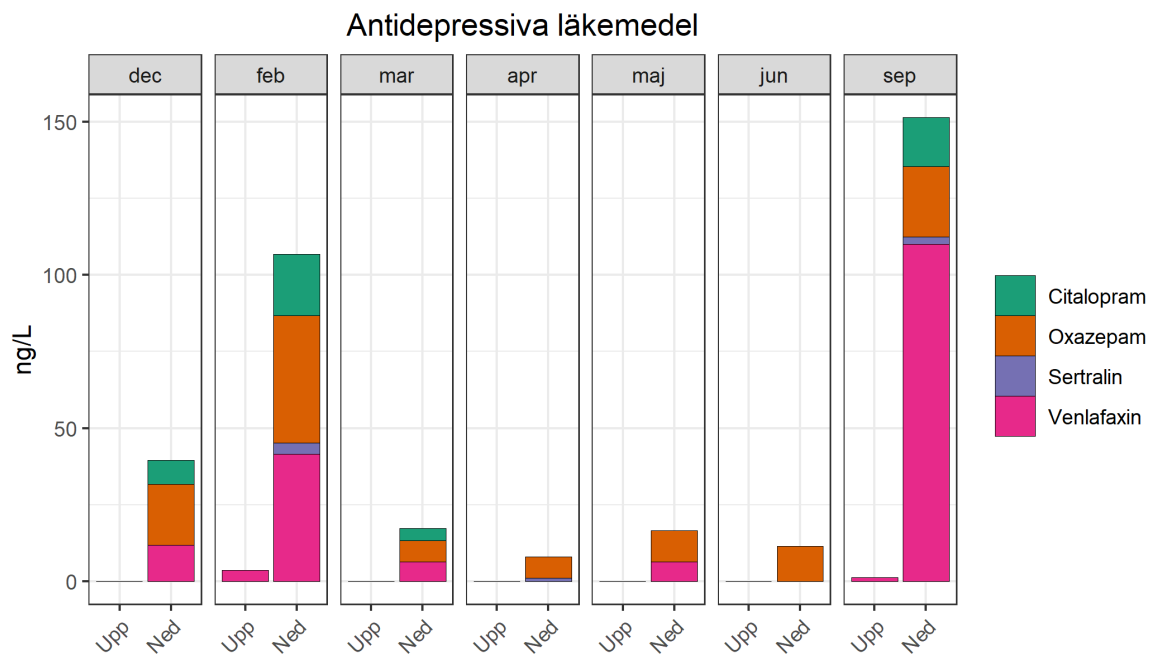
Det noteras, oavsett terapeutisk effekt (smärtstillande, antibiotika etc), en tydlig koncentrationsökning av läkemedel i Vallbyån när vattnet passerar reningsverkets utsläppspunkt (**Figur 5-Figur 9**). Det förelåg en stor säsongsmässig variation, vilket till stor del förklaras av hur vattenföringen och därmed den initiala utspädningen i Vallbyån varierar. Därutöver förekommer också skillnader i flöde och läkemedelskoncentration i verkets utgående vatten och även en slumpvis variation kopplat till provtagning och kemisk analys.

Högst koncentrationer nedströms i Vallbyån uppmättes i februari och september. Figurerna visar tydligt att det inom varje funktionell grupp är det vissa läkemedel som dominerar i recipienten: den totala koncentrationen antibiotika består till största del av sulfametoxazol, de antidepressiva domineras av venlafaxin och oxazepam och blodtrycksmedicinerna av losartan och metoprolol. I gruppen smärtstillande detekterades diklofenak och naproxen vid varje tillfälle. Paracetamol och tramadol detekterades bara i februari i nedströms provpunkt. Av de läkemedel som undersöktes men inte tillhör någon av de ovan beskrivna terapeutiska grupperna detekterades furosemid i högst koncentrationer (**Figur 9**).

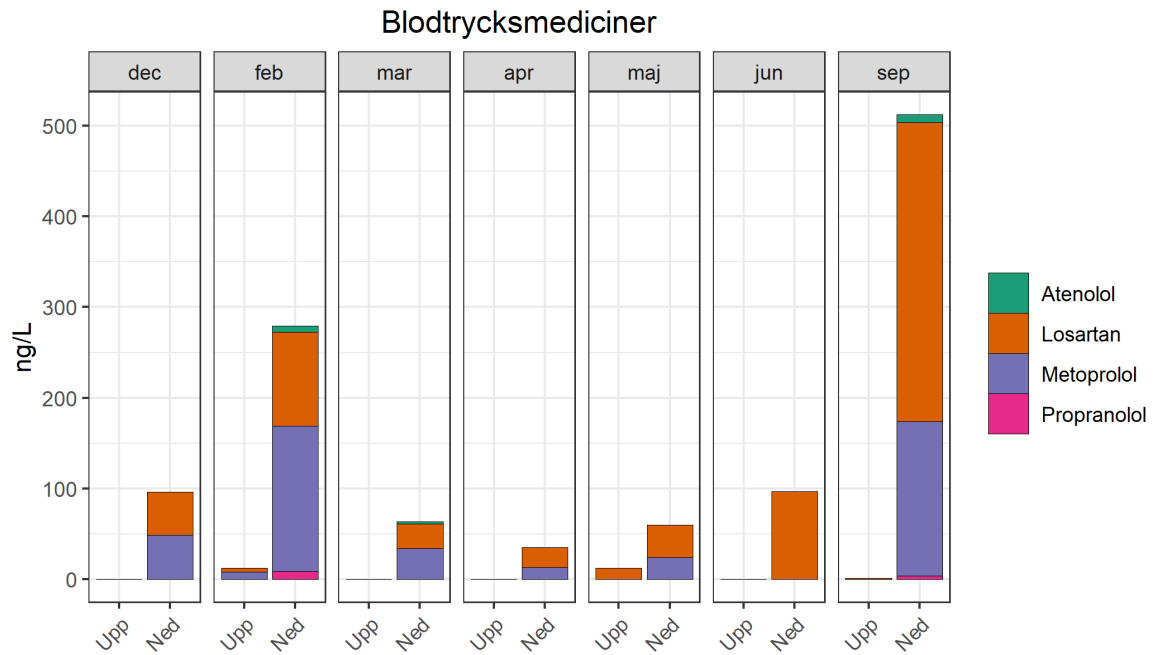
Summan av alla 24 undersökta läkemedel gav, angivet som *medel (min-max)*, baserat på de sju mätningar som gjordes i respektive punkt: 10 (0-31) ng/L uppströms och 502 (113-1500) ng/L nedströms. In snitt var alltså koncentrationen av läkemedel ca 50 gånger högre nedströms jämfört med uppströms. Skillnaden mellan minimum (113 ng/L) och maximum (1500 ng/L) nedströms visar på att koncentrationsskillnaderna nedströms i Vallbyån kan skilja 13-faldigt över året.



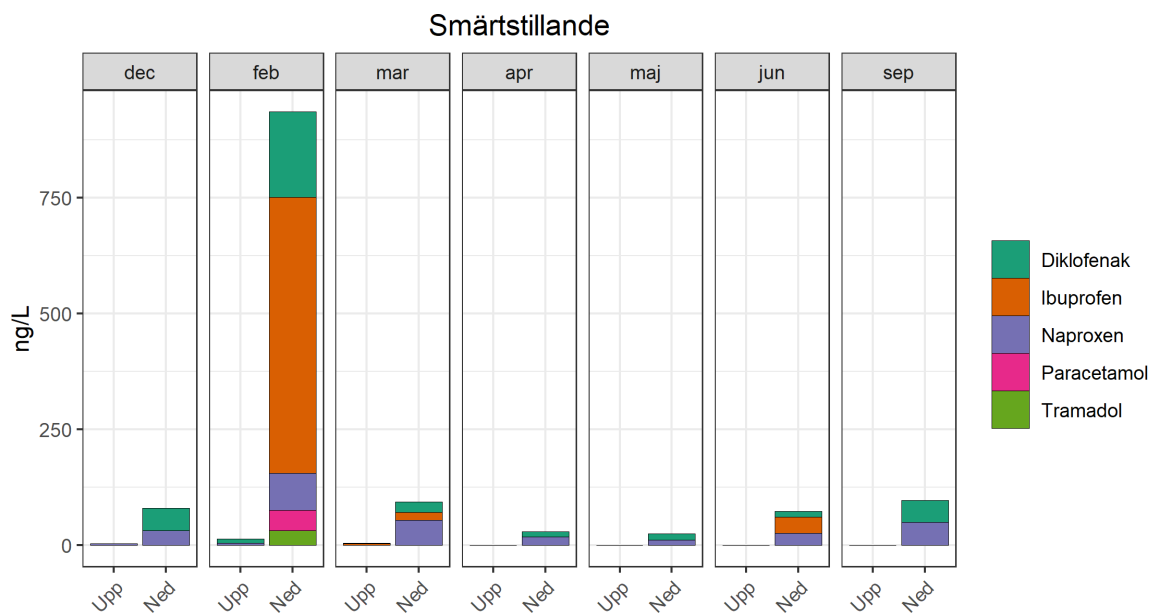
Figur 5 Skillnad i antibiotika (ng/L) mellan uppströms och nedströms provtagningspunkt.



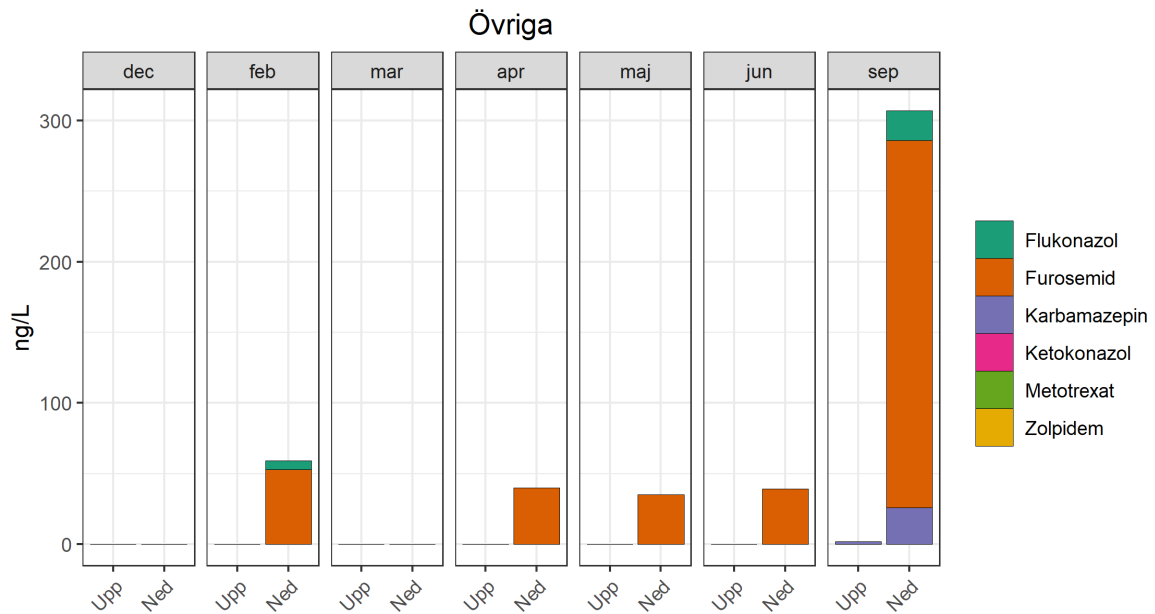
Figur 6 Skillnad i antidepressiva läkemedel (ng/L) mellan uppströms och nedströms provtagningspunkt.



Figur 7 Skillnad i blodtryckssänkande läkemedel (ng/L) mellan uppströms och nedströms provtagningspunkt.



Figur 8 Skillnad i smärtstillande läkemedel (ng/L) mellan uppströms och nedströms provtagningspunkt.



Figur 9 Skillnad mellan uppströms och nedströms provtagningspunkt avseende de undersökta läkemedel som inte tillhör de terapeutiska grupperna i Figur 5-Figur 8.

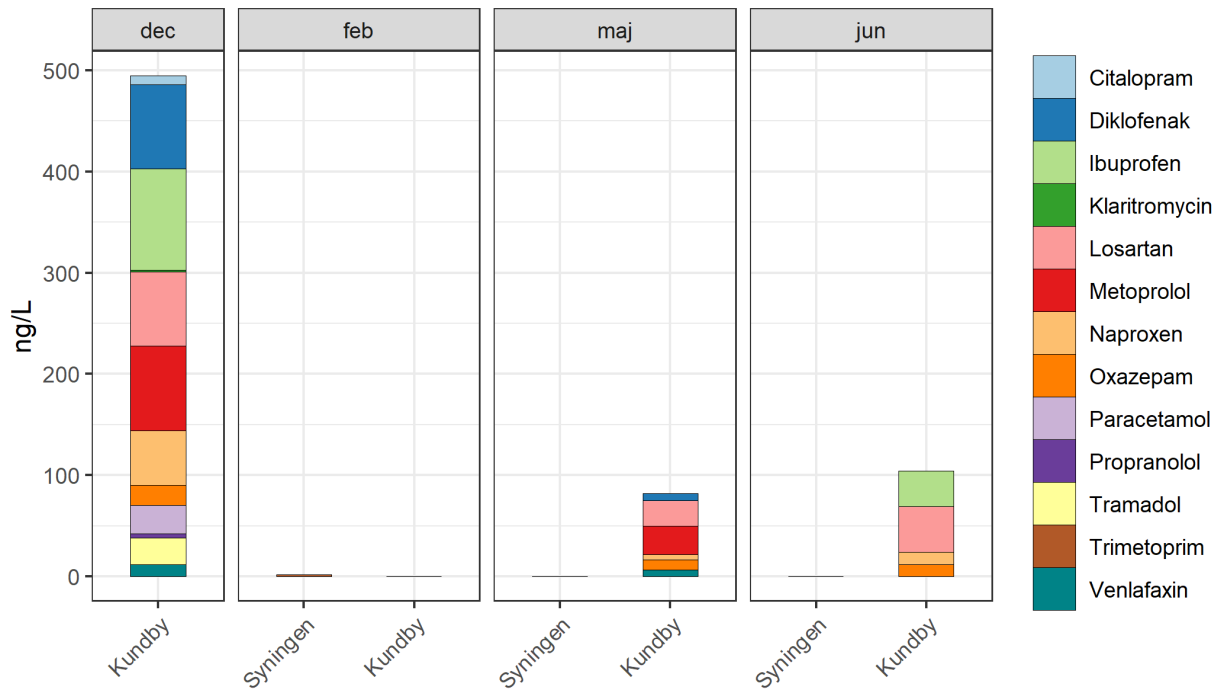
Kundbysjön och Syningen

Koncentrationerna i Syningen var, i alla tre prover som undersöktes, under LOD, med undantag för trimethoprim vilken förekom som spårvärde (mellan LOD och LOQ) vid ett tillfälle (**Figur 10**). I Kundbysjön förekom dock att läkemedel detekterades i kvantifierbara koncentrationer.

I Kundbysjön var det dock stor variation i de fyra prover som togs, och koncentrationernas storlek kunde inte heller med enkelhet förklaras av de i Vallbyån. Totalkoncentrationerna av de 24 undersökta läkemedlen, angivet som medel (min-max), var 170 (0-500) ng/L i Kundbysjön, vilket jämfört med motsvarande nedströms i Vallbyån på 502 (113-1500) ng/L visar på att koncentrationer i Kundbysjön i snitt är ca 3 gånger lägre än i Vallbyån.

Vid provtagningen i februari var det låga koncentrationer i Kundbysjön, samtidigt som koncentrationerna nedströms i Vallbyån var höga (**Figur 5-Figur 9**). I december, då högst koncentrationer uppmättes i Kundbysjön, var inte koncentrationerna nedströms i Vallbyån särskilt höga. Dessa resultat antyder att det mellan stickprov i olika provpunkter i samma recipientsystem samma dag kan förekomma stor variation i vilka läkemedelskoncentrationer, som inte enbart kan förklaras av spädning.

Resultaten visar också att vilka enskilda substanser som detekteras varierar. I Kundbysjön i maj och juni, när totalkoncentrationerna var likartade, detekterades metoprolol, venlafaxin och diklofenak i maj men inte i juni. I juni detekterades ibuprofen, men så var inte fallet i maj.



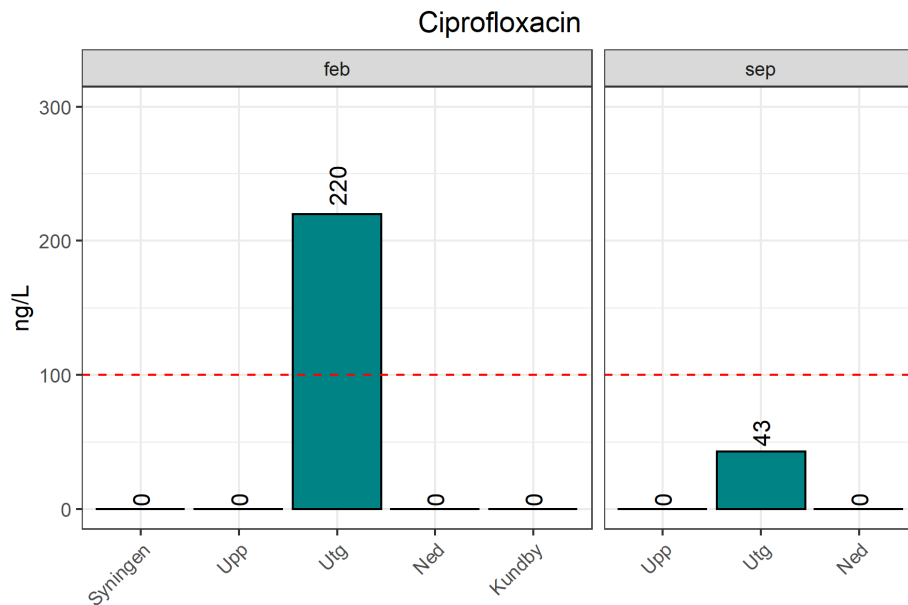
Figur 10 Detekterade läkemedel i Syningen och Kundbysjön. Båda sjöarna provtogs samtidigt i februari, maj och juni. I december provtogs endast Kundbysjön. Koncentrationer <LOD satta till noll. Sammantaget tre prover från Syningen och fyra från Kundbysjön.

Koncentrationer i relation till kemisk och ekologisk status

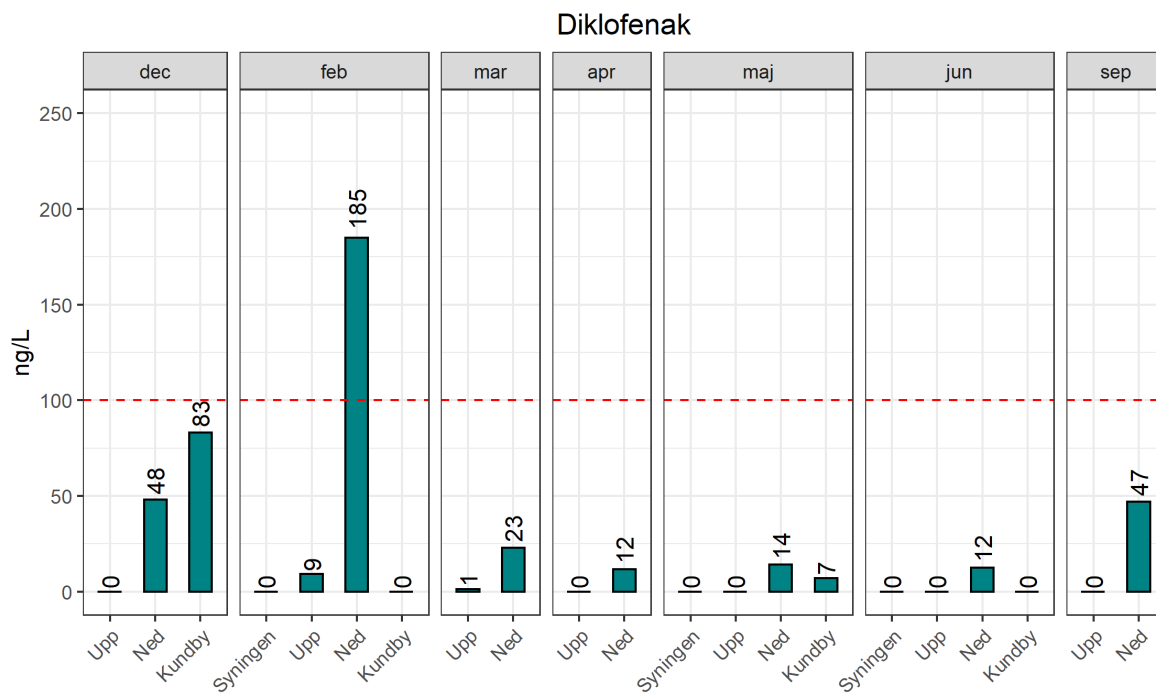
Maximalt tillåtet årsmedelvärde för inlandsytvatten finns framtaget för diklofenak, och maximal tillåten koncentration för ciprofloxacin (HVMFS, 2019). Båda dessa ligger på 100 ng/L.

En viktig kommentar är att ciprofloxacin endast kunde mätas i februari och september på grund av dålig återvinning i den kemiska analysen. I nedströms och uppströms provpunkt genomfördes två mätningar i februari (2022-02-08 och 2022-02-15), samtliga med koncentrationer under detektionsgränsen (<20-<23 ng/L). Det innebär att det finns tre mätvärden för ciprofloxacin nedströms och ett för Kundbysjön. Maximal tillåten koncentration överskreds inte i någon av dessa mätningar (**Figur 11**).

Bedömningsgrunden för årsmedelvärde för diklofenak underskreds i Vallbyån och Kundbysjön. Medel var 66 ng/L nedströms i Vallbyån och 23 ng/L i Kundbysjön vilka underskrider gränsvärdet. Medelvärdesberäkningen antog halva LOD om koncentrationen var mindre än LOD. Maximal uppmätt koncentration i dessa provpunkter var 83 ng/L i Kundbysjön och 210 ng/L nedströms i Vallbyån (**Figur 12**).



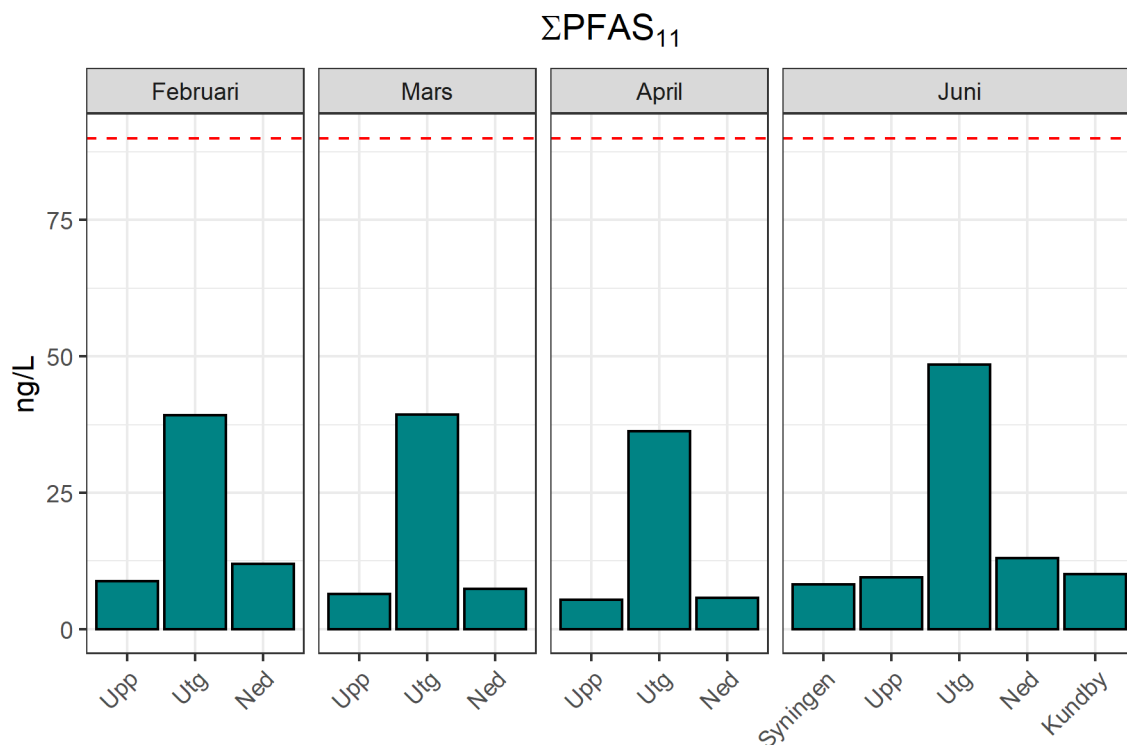
Figur 11 Koncentrationer av ciprofloxacin i vattenprover. Bedömningsgrund avseende maximal tillåten koncentration på 100 ng/L (HVMFS, 2019) markerat med röd streckad linje. Staplarna märkta med mätvärdet. Koncentrationer under LOD satta till noll.



Figur 12 Koncentrationer av diklofenak i vattenprover. Bedömningsgrund avseende maximalt tillåtet årsmedelvärde på 100 ng/L (HVMFS, 2019) markerat med röd streckad linje. Staplarna märkta med mätvärdet. Koncentrationer under LOD satta till noll. Staplar för uppströms och nedströms i februari avser medelvärde av två mätningar (2022-02-08 och 2022-02-15). Se Appendix A för primärdata.

PFAS

Summamåttet PFAS₁₁ låg under bedömningsgrunden på 90 ng/L (HVMFS, 2019) i samtliga mätningar i recipienten men även redan i utgående vatten (**Figur 13**). Däremot syns att koncentrationen i utgående vatten är betydligt högre än uppströms i Vallbyån, vilket innebär att det sker ett påslag av PFAS till Vallbyån från reningsverket. Detta återspeglas i att koncentrationerna i snitt var något högre nedströms än uppströms. Koncentrationen i utgående vatten var 41 (36-49) ng/L, nedströms 10 (6-13) ng/L och uppströms 8 (5-10). Ett t-test av skillnader mellan nedströms och uppströms gav icke-signifikant resultat ($p > 0,05$), men det är utifrån koncentrationerna i utgående vatten tydligt att ett visst tillskott sker.



Figur 13 Summa PFAS₁₁ (PFBA, PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFBS, PFHxS, PFOS, 6:2 FTS) i vattenprover. Röd linje markerar bedömningsgrund enligt HVMFS (2019).

Fenoler

Samtliga fenoler var med marginal under respektive bedömningsgrund för årsmedel och totalkoncentration i recipientvatten (**Tabell 11**). Koncentrationen nonylfenol låg omkring 32 ng/L i utgående vatten, och enstaka ng/L uppströms, vilket indikerar ett visst tillskott från verket. Kundbysjön hade dock inte högre koncentrationer av någon fenol i jämförelse med Syningen, vilket tyder på låg belastning av dessa ämnen från Rimbo ARV. Koncentrationerna Kundbysjön var i samtliga mätningar under LOD eller som spårvärden, mellan LOD och LOQ.

Tabell 10 Fenoler (ng/l). "<" avser <LOD. Spårvärden redovisas som LOD-LOQ. I utgående anges de datum mellan vilka veckoprov uttogs.

Provpunkt	Datum	Bisfenol A (ng/L)	Nonylfenol [ng/L]	Oktylfenol [ng/L]
Utgående	21 mar – 27 mar	16	36	1-3
	20 jun – 26 jun	17	28	7
Uppströms	2022-03-31	<4	3-10	<1
	2022-05-25	2-5	1-5	1-3
	2022-06-28	2	<1	<1
Nedströms	2022-03-31	25	10	<1
	2022-05-25	<2	7	<1
	2022-06-28	1-2	2,6	1-2
Syningen	2022-05-25	14	1-5	1-3
	2022-06-28	2	<1	<1
Kundbysjön	2022-05-25	2-5	1-5	<1
	2022-06-28	1-2	1-2	<1
Gränsvärde årsmedel (HVMFS, 2019)		1600	300	100
Gränsvärde maximal konc. (HVMFS, 2019)		2700	2000	

Hormoner

E1 och E2 detekterades i flera fall i det utgående vattnet (**Tabell 12**). Däremot syns inga tydliga skillnader mellan uppströms och nedströms provpunkter. E1 och E2 uppmättes den 15e februari som spårvärde respektive 6 ng/L uppströms samtidigt som koncentrationer nedströms var 7 respektive 6 ng/L. I övrigt låg koncentrationerna nära LOD och LOQ varför de anses de som relativt osäkra, varför de inte jämförs mot gällande bedömningsgrund enligt HVMFS (2019). I Kundbysjön och Syningen detekterades aldrig E2, men E1 fanns som spårvärde vid ett tillfälle.

EE2 var lägre än LOD i samtliga mätningar vid samtliga provpunkter. Däremot utesluter inte det att gränsvärdet på 0,035 ng/L överskrids, i och med att LOD är högre än detta. Notera att mätningarna av E2 till viss del även förekommer i kommande avsnitt om effekttester.

Tabell 11 Koncentrationer (ng/L) av hormonerna östron (E1), 17 β -östradiol (E2) och 17 α -etinylostradiol (EE2) för varje provpunkt och provtagningstillfälle. *ämnet kan ej detekteras, halt är under detektionsgränsen. ** ämnet kan detekteras men ej kvantifieras, halten är mellan detektionsgränsen (LOD) och kvantifieringsgränsen (LOQ). I utgående anges de datum mellan vilka veckoprov uttogs. Decemberprovet är från 2021, övriga 2022. I decemberprovtagningen analyserades triplikat i utgående. Dessa redovisas som *medel (min-max)*.

Provpunkt	Provdatum	E1 (ng/L)	E2 (ng/L)	EE2 (ng/L)	LOD	LOQ
Utgående	13 dec – 19 dec	21 (18-23)	16 (12-18)	*	2	6
	31 jan – 6 feb	48	13	*	2	5
	21 mar – 27 mar	16	**	*	2	6
	18 apr – 24 apr	**	*	*	2	6
Uppströms	2021-12-20	*	*	*	2	6
	2022-02-08	*	*	*	2	6
	2022-02-15	**	6	*	2	5
	2022-03-31	*	*	*	2	6
	2022-04-29	**	*	*	2	6
	2022-05-25	**	*	*	2	6
Nedströms	2021-12-20	*	*	*	2	6
	2022-02-08	**	**	*	2	5
	2022-02-15	7	6	*	2	5
	2022-03-31	**	*	*	2	6
	2022-04-29	**	*	*	2	6
	2022-05-25	**	**	*	2	6
Syningen	2022-02-15	*	*	*	2	6
	2022-05-25	*	*	*	2	6
Kundbysjön	2021-12-20	**	*	*	2	6
	2022-02-15	*	*	*	2	6
	2022-05-25	*	*	*	2	6
Bedömningsgrund inlandsytvatten (ng/L) (HVMFS, 2019)			0,4	0,035		

Sammanfattning

Mätningarna av mikroföroreningar i recipient- och referensvatten visade på ett tydligt tillskott av flertalet läkemedel från Rimbo ARV till Vallbyån och Kundbysjön samt ett mindre tydligt tillskott av PFAS. Det var stor variation i läkemedelskoncentration mellan de olika provtagningarna – de enskilda läkemedlen förekom i koncentrationer mellan under detektionsgräns och några hundratal ng/L i recipienten, vilket i en recipient med förhållandevis låg spädning av utgående vatten är att förvänta, se exempelvis Viktor et al. (2021) där koncentrationerna i recipienten är högre, på grund av allmänt högre koncentrationer i utgående vatten och lägre spädning i recipienten.

Totalkoncentrationen av de 24 analyserade läkemedlen var snitt 170 ng/L i Kundbysjön, 510 ng/L nedströms i Vallbyån och 10 ng/L uppströms i Vallbyån. Det totala tillskottet från Rimbo ARV till recipienten av de 24 läkemedlen beräknades till 6 500 gram per år. De högsta koncentrationerna nedströms i Vallbyån uppmättes i prover från vinter och höst och de lägsta under vår och sommar. Koncentrationerna av diklofenak och ciprofloxacin, för vilka det finns bedömningsgrunder, låg under sina respektive maximala tillåtna medel- och maxkoncentrationer på 100 ng/L. Diklofenak var i snitt 66 ng/L och som mest 185 ng/L nedströms i Vallbyån. Ciprofloxacin kunde endast mätas vid tre tillfällen nedströms i Vallbyån på grund av analystekniska skäl. Koncentrationen var i samtliga tre mätningar under detektionsgränsen, som varierade mellan 23 och 5 ng/L.

Rimbo ARV förefaller ha minimal påverkan på koncentrationer av fenoler i recipienten och fenolkoncentrationerna var allmänt låga, i en storleksordning omkring analysmetodens detektionsgräns. Hormonerna E1 och E2 detekterades i utgående vatten mellan 2-48 respektive <2-16 ng/L, men inga tydliga skillnader i koncentration syntes mellan referens- och recipientvatten. Som högst uppmättes 7 ng/L E2 nedströms i Vallbyån, men motsvarande prov uppströms låg på 6 ng/L. E2 kunde inte detekteras i något prov (<2 ng/L). Den östrogena påverkan bedöms dessutom bäst via komplettering med effekttester (se avsnitt "Effekttester").

Sammantaget framkommer att Rimbo ARV inte bidrar betydande med fenoler och PFAS till recipienten. Tillskottet av läkemedel från verket är däremot tydligt. Koncentrationerna fluktuerade dock mycket under året i recipienten vilket innebär varierande exponering för akvatiska organismer. I relation till bedömningsgrunder för diklofenak och ciprofloxacin var koncentrationerna inte att anse oroväckande höga.

Effekttester

Östrogen effekt

Risken för hormonstörande effekter i recipienten kan utifrån YES-testen och ER-aktiviteten (analyserad av Biocell Analytica) bedömas enligt metod beskriven i NORMAN network & Water Europe (2019). Metoden kategoriserar kvoten av uppmätt värde och ett effektbaserat triggervärde (EBT) i någon av kategorierna enligt **Tabell 12**. Denna kategorisering utgör färgkodningen i **Tabell 13**. EBT har hämtats från Neale et al. (2021) och anges ligga mellan 0,2-0,4 ng/L. Här har medelvärdet (0,3 ng/L) använts.

Tabell 12 Rekommenderade åtgärder vid olika grader av hormonstörande effekt i recipient. Översatt från engelska i originalkällan (NORMAN network & Water Europe, 2019).

Status	Rekommenderad åtgärd*
Uppmätt/EBT<1	Ingen åtgärd behövs
1 < Uppmätt/EBT < 3	Kontrollera data, mät var tredje månad i ett år och tills uppmätt/EBT<1
3 < Uppmätt/EBT < 10	Kontrollera data, omedelbar ny provtagning, kvantifiera vilka ämnen som leder till störningen. Mät var tredje månad i ett år och tills uppmätt/EBT<1
10 < Uppmätt/EBT < 100	Allt ovanstående plus utökad källspårning. Även mätningar i inkommande avloppsvatten för att säkerställa säkerhetsfaktorernas osäkerhetsintervall kopplat till reduktion i verket och spädning i recipient
Uppmätt/EBT > 100	Allt ovanstående plus omedelbar myndighetskontakt för att bestämma åtgärder. Bekräfta verkets åtgärder genom ytterligare provtagning fastställande att uppmätt/EBT<100.

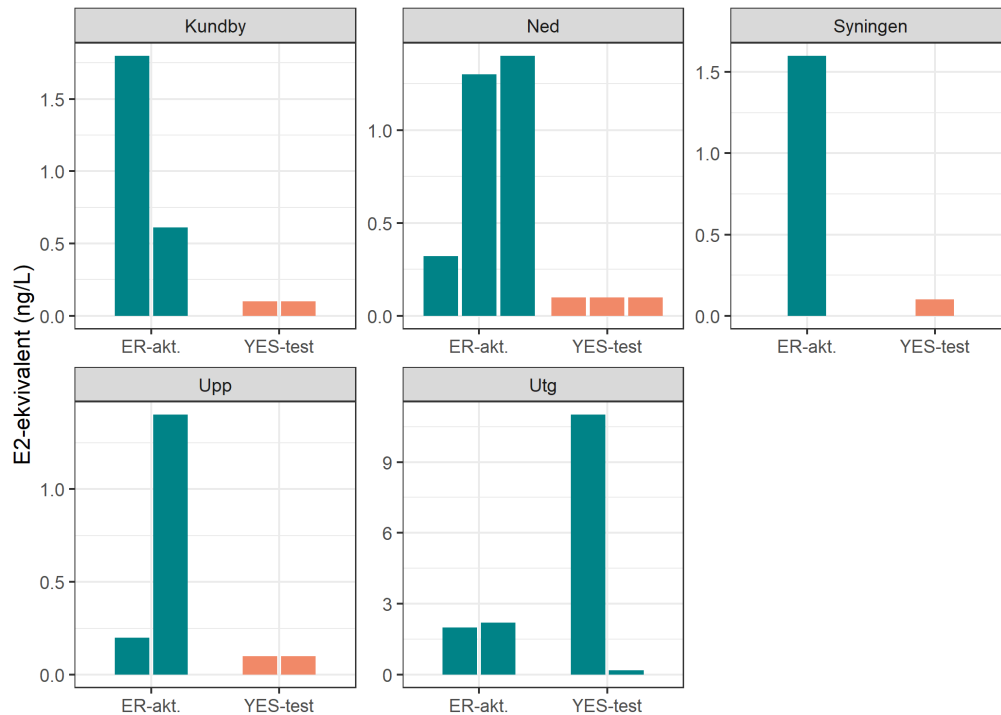
Resultaten visar på att vattnet nedströms i Vallbyån kan ha hormonstörande effekt, då YES-testet i februari resulterade i en effekt knappt sex gånger större än EBT. Detta skulle då enligt de rekommenderade åtgärderna motivera uppföljande provtagning och kvantifiering av specifika ämnen. Efterföljande prover visade genomgående på effekter under EBT. Vattnet i Kundbysjön förefaller inte ha någon hormonstörande effekt enligt YES-testen. Dock återspeglar provtagningarna i Kundbysjön vår- och sommarförhållanden. Mätningen uppströms antyder att högre effekter kan förekomma under andra tidpunkter, men med tanke på den ytterligare spädning som sker när Vallbyån når Kundbysjön är det högst troligt att ett februariprov i Kundbysjön hade visat på lägre effekt. Uppströms vatten i Vallbyån och Syningen hade ingen hormonstörande effekt i något prov. Notera att metoden ska användas på recipientvatten. Utgående vatten från reningsverket har tagits med i tabellen endast för att ge en uppfattning om effekten i det renade avloppsvattnet som släpps ut i Vallbyån. De rekommenderade åtgärderna för klassningen i utgående vatten behöver alltså inte genomföras.

ER-aktiviteten däremot visade i flera fall på 4-5 gånger högre aktivitet än EBT i Kundbysjön och nedströms Vallbyån, vilket är högre än motsvarande YES-test. Dock var aktiviteterna i Syningen och uppströms i Vallbyån i samma storleksordning, vilket indikerar att Rimbo reningsverk inte markant ökar vattnets ER-aktivitet. Mönstret, med generellt högre resultat för den östrogena effekten när det mäts som ER-aktivitet jämfört med YES-test, framkommer tydligt i **Figur 14**, som visar att ER-aktivitet i samtliga prover från uppströms och nedströms provpunkter var högre än motsvarande YES-test. Den östrogena aktiviteten var i flera fall minst 15 gånger högre i testet av ER-aktivitet jämfört med YES-testet. Däremot syntes inte det mönstret i mätningarna av utgående vatten, där YES-testet i ena mätningen gav högre resultat än motsvarande test av ER-aktivitet.

Tabell 13 visar också på fördelen med att använda effekttester som komplement eller ersättning till kemiskt uppmätta koncentrationer av E2. I referens- och recipientvatten kunde koncentrationerna bara fastställas vara <2 ng/L eller som osäkra spårvärden, någonstans mellan detektions- och kvantifieringsgräns, medan ER-aktivitet och YES-test gav högre precision. I en sammanställning om in-vivo och in-vitro tester för hormonstörande effekter (Robitaille et al., 2022) nämns dock ett antal svagheter med YES-testen, varav ett är att det har en betydligt högre detektionsgräns än tester baserade på däggdjursceller. Just det argumentet var dock inte relevant vid mätningarna vid Rimbo ARV, eftersom testet utfört på humanceller konsekvent gav högre resultat än YES-testets detektionsgräns i de fall YES-testen inte kunde detektera någon aktivitet. Andra argument mot YES-testen är att de har ett lägre upptag av substanser jämfört med däggdjursceller och att det inte kan skilja på antagonister och agonister (förstärkande och hämmande effekter).

Tabell 13 Resultat av YES-test och åtgärdsklassning av eventuellt hormonstörande effekt, beräknad som kvoten av uppmätt effekt (E2 ekvivalenter) av YES-test och effektbaserat triggervärde (EBT) på 0,3 E2-ekvivalenter (ng/L). Färgkodning enligt Tabell 12. *Om <0,1 har 0,05 antagits.

Lokal	Månad	Uppmätt E2 (ng/L)	YES-test (E2-ekv. ng/L)	YES-test Uppmätt*/EBT	ER-aktivitet (E2-ekv. ng/L)	ER-aktivitet Uppmätt/EBT
Utgående	Februari	13	10,5	35,0		
	Mars	2-6	11,0	37	2,0	6,6
	Juni		0,19	0,6	2,2	7,3
Uppströms	Februari	<2	<0,1	0,2		
	Mars	<2	<0,1	0,2	0,20	0,7
	Maj	<2	<0,1	0,2	1,4	4,5
	Juni				0,73	2,4
Nedströms	Februari	2-5	1,7	5,7		
	Mars	<2	<0,1	0,2	0,32	1,1
	Maj	2-5	<0,1	0,2	1,3	4,3
	Juni		<0,1	0,2	1,4	4,6
Syningen	Maj	<2	<0,1	0,2	1,6	5,4
	Juni				0,15	0,5
Kundbysjön	Maj	<2	<0,1	0,2	1,8	5,9
	Juni		<0,1	0,2	0,61	2,0



Figur 14 Jämförelse mellan två celltester för östrogen effekt: ER-aktivitet och YES-test, vid de mättillfällen båda mätts samtidigt. Orangea staplar avser resultat under YES-testets detektionsgräns på 0,1 ng/L. ER-aktiviteten var aldrig under detektionsgränsen.

Nrf2-, AR-, Anti-AR- och AhR-aktivitet

Inledningsvis kan nämnas att de tester som Biocell Analytica genomfört (även ER-aktiviteten i föregående avsnitt) är relativt nya och därmed inte lika beprövade som andra metoder, exempelvis YES-test eller biologiska tester på zebrafisk, för att utvärdera effekter från avlopps- eller recipientvatten. I en nyligen publicerad rapport utvärderades denna uppsättning tester, genomförda av samma företag, och slutsatsen var att de är ett värdefullt verktyg för att undersöka förekomsten av miljöfarliga ämnen i vatten och reningseffektivitet i konventionella reningsverk eller pilotanläggningar (Holm & Önnby, 2022).

Resultaten för denna uppsättning tester, exklusive ER-aktivitet som redovisades i föregående avsnitt, visas i **Tabell 14**. Ur tabellen görs följande observationer:

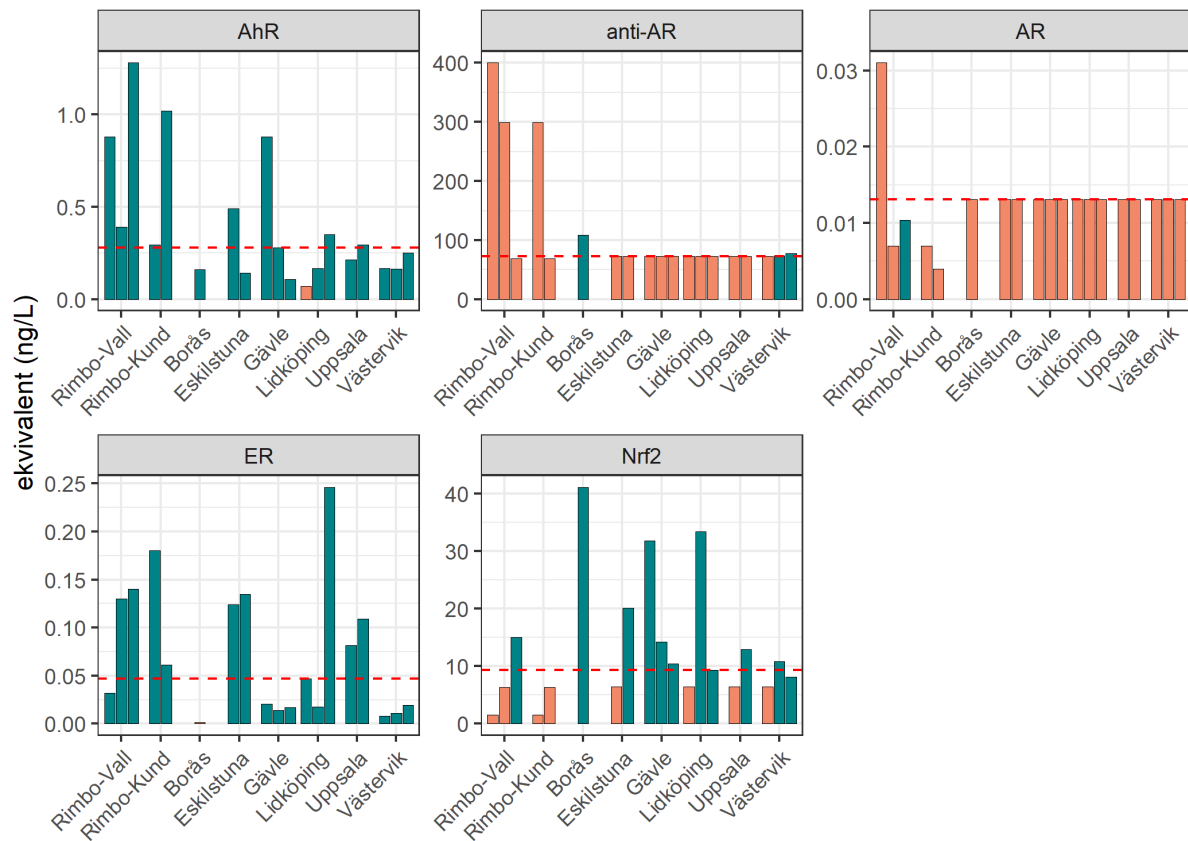
- Nrf2-aktiviteten var inte generellt högre i recipientvatten jämfört med referensvatten.
- Anti-Ar-aktiviteten var konstant under detektionsgräns i referens- och recipientvatten.
- AR-aktiviteten var generell sett under detektionsgräns, med undantag för en mätning i nedströms provpunkt.
- AhR-aktiviteten var i samma storleksordning i referens- och recipientvatten.

Tabell 14 Resultat av effekttester samt åtgärdsklassning av östrogen effekt (ER-aktivitet). Beräknad som kvoten av uppmätt effekt (E2 ekivalenter) och effektbaserat triggervärde (EBT) på 0,3 ng/L. Färgkodning enligt Tabell 12. I utgående anges de datum mellan vilka veckoprov uttogs.

Provpunkt	Provdatum	Nrf2-aktivitet (ug/L)	Anti-AR aktivitet (ng/L)	AR-aktivitet (ng/L)	AhR-aktivitet (ng/L)
Utgående	21 mar – 27 mar	32	900	<0,031	5,8
	20 jun – 26 jun	27	72	<0,004	1,1
Uppströms	2022-03-31	15	<400	<0,031	1,1
	2022-05-25	2,1	<300	<0,007	1,9
	2022-06-28	<6,3	<69	<0,004	0,95
Nedströms	2022-03-31	15	<400	<0,031	0,88
	2022-05-25	<1,5	<300	<0,007	0,39
	2022-06-28	<6,3	<69	0,0104	1,3
Syningen	2022-05-25	3,9	<300	<0,007	0,29
	2022-06-28	<6,3	<69	<0,004	0,97
Kundbysjön	2022-05-25	<1,5	<300	<0,007	0,29
	2022-06-28	<6,3	<69	<0,004	1,0

I den nyligen nämnda undersökningen (Holm & Önnby, 2022) undersöktes sex svenska avloppsreningsverk med samma uppsättning tester. En jämförelse av aktiviteter i recipientvatten vid den studien och föreliggande rapportens mätningar vid Rimbo ARV visas i **Figur 15**. Figuren visar att AhR-aktiviteten vid Rimbo ARV låg något över medianvärdet för samtliga övriga verk. AR- och anti-AR går inte att jämföra på grund av stora skillnader i detektionsgräns samt att aktiviteterna generellt var under detektionsgränsen. ER-aktiviteten var i nivå med Eskilstuna och Uppsala, vars recipienter också är vattendrag eller våtmarksområden, men högre än Gävle och Västervik vars recipienter är kustområden. Även Nrf2-aktiviteten var likartad mellan Rimbo, Eskilstuna och Uppsala.

Sammantaget verkar recipienten till Rimbo ARV avvika något vad gäller AhR-aktivitet, men i övrigt ha likartade aktiviteter som övriga. För mer detaljerad beskrivning av samtliga ARV i jämförelsen och deras respektive recipient hänvisas till originalpublikationen (Holm & Önnby, 2022).



Figur 15 Aktiviteter i mätningar vid Rimbo ARV, från denna rapport, samt sex andra ARVs från (Holm & Önnby, 2022). Röd streckad linje markerar median. Orangea staplar anger aktivitet under LOD. Aktiviteten är då satt lika med LOD. "Rimbo-Vall" =nedströms provpunkt i Vallbyån, "Rimbo-Kund" = Kundbysjön.

Sammanfattning

Den övergripande tolkningen är att Rimbo ARV inte tydligt ökar Nrf2-, ER-, AR-, anti-AR- eller Ahr-aktivitet i och med att aktiviteterna var likartade i referens- och recipientvatten. I Vallbyån var aktiviteterna följande: Nrf2-aktiviteten låg mellan <1,5-15 ng/L nedströms och 2,1-15 ng/L uppströms. Anti-AR aktiviteten var genomgående under detektionsgräns i både referens-och referensvatten. AR-aktiviteten låg mellan <0,007-0,01 ng/L nedströms och <0,004-<0,031 ng/L. Ahr-aktiviteten låg mellan 0,88-1,3 ng/L nedströms och 0,95-1,9 ng/L uppströms. ER-aktiviteten låg mellan 0,32-1,4 ng/L nedströms och 0,2-1,4 ng/L uppströms.

Undantaget från de likartade koncentrationerna nedströms/uppströms i Vallbyån YES-testet i februari där provet nedströms hade flerfaldigt högre östrogen effekt på 1,7 ng/L, jämfört med provet uppströms på <0,1 ng/L E2-ekv. Detta var dock inget genomgående mönster utan noterades bara vid ett provtagningsstillfälle.

Resultat och diskussion – mätningar i biota

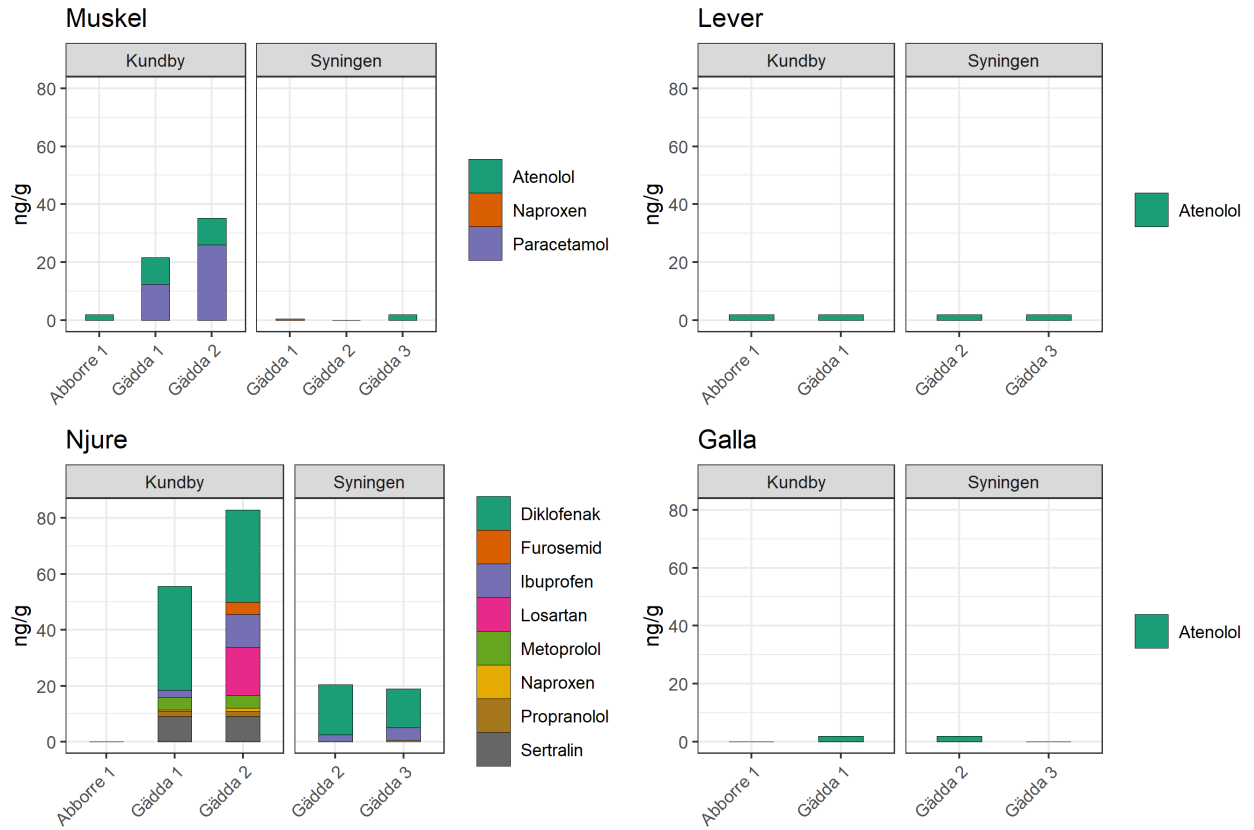
Läkemedel

I den första analysomgången av fisk, där läkemedel analyserades i muskel, njure, lever och galla från gädda och abborre, detekterades läkemedel i prover från både Kundbysjön och Syningen (**Figur 16**). Resultaten visade på att flest läkemedel detekterades i njure av gädda. Av den anledningen analyserades bara njure i den fisk som fångades i det uppföljande fisket i maj (**Figur 17**). Sammantaget detekterades 11 av de 22 läkemedel som analyserad i njure av gädda, vid någon av de två provtagningarna. Dessa var citalopram, metoprolol, propranolol, sertralin, tramadol, venlafaxin, diklofenak, furosemid, ibuprofen, losartan och naproxen. Högst koncentration var av diklofenak (37 ng/g vv) i njure följt av paracetamol i muskel (26 ng/g vv) och propranolol i njure (20 ng/g vv). Samtliga dessa var i gädda från Kundbysjön.

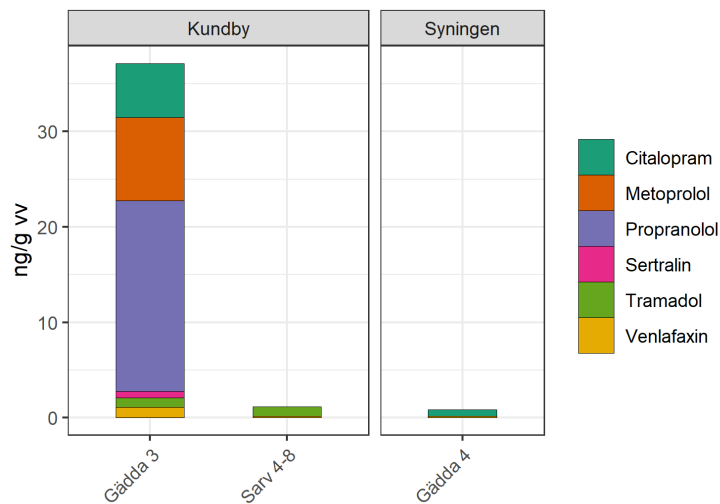
I fisken från Syningen detekterades naproxen, atenolol och ibuprofen (**Figur 16**) samt citalopram och venlafaxin (**Figur 17**). Citalopram venlafaxin, naproxen och atenolol som uppmättes som spårvärde. Därav är halterna osäkra.

Resultaten visar tydligt på att läkemedelshalterna är generellt sett högre i fisken från Kundbysjön jämfört med fisk från Syningen. Detta syns främst vid jämförelse av halter i njure av gädda. Resultaten pekar mot att njure av gädda har högre halter i relation till andra organ och arterna abborre och sarv. Dock analyserades bara ett prov av abborre respektive sarv vilket gör att den slutsatsen är högst osäker.

I övrigt detekterades de inflammationshämmande/smärtstillande läkemedlen diklofenak, naproxen, paracetamol och ibuprofen. Utöver detta uppmättes även furosemid och sertralin. I kräftorna från Vallbyån däremot detekterades inga läkemedel - samtliga undersökta ämnen hade halter under detektionsgränsen, se **Appendix A-Tabell A:10**.



Figur 16 Detekterade läkemedel (ng/g våtvikt) i muskel, lever, njure och galla, i två gäddor och en abborre från Kundbysjön, samt i tre gäddor från Syningen. Av de tre gäddorna från Syningen analyserades alla i muskel, men endast två i lever, njure och galla. Från fisket i februari 2022.



Figur 17 Detekterade läkemedel (ng/g våtvikt) i njure från en gädda och ett samlingsprov av fem sarvar från Kundbysjön, samt en gädda från Syningen. Från fisket i maj 2022. I sarvprovet utgörs stapeln av tramadol och venlafaxin (spårvärde). Stapeln av gädda från Syningen utgörs av citalopram och venlafaxin (spårvärde).

Att läkemedel återfinns i fisk från vattenområden som i varierande grad mottar renat avloppsvatten från recipient är inte ovanligt. I åar, floder och flodmynningar som är recipienter till ARVs har läkemedel detekterats i fisk (Álvarez-Muñoz et al., 2015; Brooks et al., 2005; Du et al., 2014; Huerta et al., 2018; Ramirez et al., 2007; Schultz et al., 2010), men även i kust- och havsområden med hög spädning av avloppsvattnet har läkemedel detekterats (Karlsson & Viktor, 2014; Vieno et al., 2017). I Vänern, Vättern och Mälaren undersöktes lever av abborre, och endast från Vättern galla av röding (Waldetoft et al., 2021). I totalt 10 prover kunde inga läkemedel detekteras. Enskilda substanser som detekterats i ovan nämnda studier innefattar bland annat diklofenak, citalopram, sertralin, oxazepam, karbamazepin, ciprofloxacin, ibuprofen och fluoxetin. Storleksordningen på halter av läkemedel i fisk brukar vara mellan <LOD och enstaka ng/g.

Ofta analyseras fiskens muskel, plasma, lever eller hjärna. Njure är inte lika vanligt förekommande, och mätningar i gädda har inte hittats varför mätningarna till denna rapport är svåra att jämföra mot litteraturen. Resultaten framstår dock varken som avvikande höga eller avvikande låga, eftersom några läkemedel detekterades i storleksordningen ng/g samtidigt som flertalet var under detektionsgränsen.



Figur 18 Isfiske med angeldon efter gädda i Syningen. Foto: Joakim Hållén, 2022-02-15.

PFAS

PFAS mättes i stjärtmuskel i kräfta från Vallbyån och i muskel av gädda och abborre från Kundbysjön (Tabell 15). Totalt analyserades 20 enskilda PFAS-ämnen, varav de som inte redovisas i tabellen finns i **Appendix A – Tabell A:11**. Resultaten visar på låga halter sett till gränsvärdet för PFOS på 9,1 ng/g vv (HVMFS, 2019) och de artspecifika gränsvärden som gäller från och med 1 januari 2023 (European Commission, 2022). Dessa artspecifika gränsvärden gäller för de enskilda varianterna och summan av PFAS₄. Mest informativt är dock att jämföra mot antingen gränsvärden för ΣPFAS₄ eller PFOS, eftersom PFOS vanligtvis utgör majoriteten av ΣPFAS₄ i biota (Augustsson et al., 2021). I kräftorna var den högsta uppmätta halten ΣPFAS₄ 0,54 ng/vv medan gränsvärdet

ligger på 5,0 ng/g vv. Abborren och gäddan hade halter av Σ PFAS₄ strax under 1,0 ng/g vv medan gränsvärdet ligger på 45 respektive 8,0 ng/g vv.

Halterna var något högre i kräftorna nedströms reningsverket, vilket förefaller rimligt utifrån den tillförsel av PFAS som sker via verkets utgående vatten (**Figur 13**), men det är svårt att fastställa med tanke på det låga antalet prover. I fisken var halten PFOS 0,84-0,85 ng/g vv.

Tabell 15 PFAS (ng/g vv) i samlingsprover av stjärtmuskel av signalkräfta från Vallbyån och i gädda och abborre från Kundbysjön. PFAS₄ innefattar PFHxS, PFOS, PFOA och PFNA.

Prov	Organ	PFOS	PFOA	PFNA	PFHxS	Σ PFAS ₄
Kräfta uppströms	stjärtmuskel	0,10	<0,13	0,09	<0,03	0,19
Kräfta nedströms (A)	stjärtmuskel	0,34	<0,13	0,05	0,16	0,54
Kräfta nedströms (B)	stjärtmuskel	0,23	<0,13	<0,04	0,09	0,32
Kundby abborre	muskel	0,85	<0,13	0,05	<0,03	0,90
Kundby gädda	muskel	0,84	<0,13	<0,04	<0,03	0,84
Gränsvärde ¹		9,1				
Gränsvärde ² kräfta		3,0	0,7	1,0	1,5	5,0
Gränsvärde ² abborre		35	8,0	8,0	1,5	45
Gränsvärde ² gädda		7,0	1,0	2,5	0,2	8,0

¹(HVMFS, 2019). ²(European Commission, 2022)

Den Europeiska livsmedelssäkerhetsmyndigheten (EFSA) fastställde år 2020 ett tolerabelt veckointag (TVI) för Σ PFAS₄, på 4,4 ng/kg kroppsvikt (EFSA, 2020). Utifrån uppmätta halter av PFAS₄ går det därmed att beräkna hur mycket fisk/kräfta som går att äta innan TVI överskrids.

Beräkningen som här genomförts har antagit att personen som konsumerar fisken/kräftan väger 70 kg och att en portion består av 150 gram fisk/kräfta. Dessutom har det kompenserats för den mängd PFAS som intas via dricksvattnet. Det har antagits att dricksvattnet innehåller 4,2 ng/L PFAS₄ (Norrsvatten, 2022) och att en person intar två liter dricksvatten per dygn. Halten Σ PFAS₄ har antagits till medelvärdet i abborren och gäddan, respektive medelvärdet i kräftproverna nedströms reningsverket.

Resultaten (**Tabell 16**, **Tabell 17**) visar på att konsumtion två gånger i veckan av fisk från Kundbysjön leder till ett intag motsvarande 104% av TVI, alltså att det maximala intaget överskrids marginellt. För kräftorna medges en större konsumtionsmängd innan TVI överskrids, på ca 4 portioner per vecka. Den generella riktlinjen från Livsmedelsverket, satt med avseende på förekomst av kvicksilver, är att egenfångad insjöfisk konsumeras högst en gång per vecka. För den som försöker bli gravid, är gravid eller ammar gäller högst 2-3 gånger per år.

Det kan också nämnas att två fiskportioner i veckan från av fisk från Kundbysjön är betydligt större mängder än vad motsvarande beräkning i många svenska vatten skulle ge, i och med att PFAS-halterna i fisk är högre på många håll, framför allt i urbana områden och andra områden påverkade av punktkällor. I Väneren, Vättern och Mälaren låg PFOS-halterna mellan 1,5-17 ng/g vv i muskel från abborre (Barthel Svedén & Olsson, 2021). I flertalet sjöar i Stockholmsområdet överskrider halterna ofta gränsvärdet för kemisk status på 9,1 ng/g vv (Pettersson, 2022) och intagsberäkningar av sådana halter resulterar i betydligt striktare kostrekommendationer.

Gränsvärdet för PFOS i abborre på 35 ng/g vv överskrids endast i tydligt förorenade vatten, varför det i många fall inte är ett lämpligt jämförvärde för att konstatera om halterna i abborre är höga eller låga. Konsumtion av fisk med PFOS-halter över 35 ng/g vv bör undvikas helt.

Tabell 16 Intagsberäkning avseende PFAS från konsumtion av fisk från Kundbysjön.

Antal fiskportioner per vecka	PFAS ₄ från fisk (ng per vecka)	PFAS ₄ från dricksvatten (ng per vecka)	Totalt intag (ng)	TVI för person à 70 kg (ng)	% av TVI
0,25	33	59	91	308	30
0,5	65	59	124	308	40
1	131	59	189	308	61
2	261	59	320	308	104

Tabell 17 Intagsberäkning avseende PFAS från konsumtion av signalkräfta från Vallbyån, nedströms Rimbo ARV.

Antal portioner kräfta per vecka	PFAS ₄ från kräfta (ng per vecka)	PFAS ₄ från dricksvatten (ng per vecka)	Totalt intag (ng)	TVI för person à 70 kg (ng)	% av TVI
0,25	16	59	75	308	24
0,5	32	59	91	308	30
1	65	59	123	308	40
2	129	59	188	308	61
4	258	59	317	308	103

Sammanfattning

Mätningarna i fisk visade på att läkemedel förekommer i högre halter i fisk från Kundbysjön jämfört med Syningen. Av de arter som undersöktes var halterna högst i gädda. Av de organ som undersöktes (muskel, lever, galla och njure) var halterna högst i njure. I njure av gädda detekterades sammanlagt 11 av de 22 undersökta läkemedlen vid minst ett av fisketillfällena. Detta indikerar att njure av gädda är en bra matris för undersökning av förekomst av läkemedel i fisk.

Högst halt av ett enskilt läkemedel var diklofenak som detekterades i som mest 37 ng/g vv, följt av paracetamol (26 ng/g vv) och propranolol (20 ng/g vv). Litteraturen på området gav stöd för att man kan förvänta sig att detektera läkemedel i fisk från recipienter till ARVs i ungefär de storleksordningar som förekom här. Den bästa jämförelsen skulle dock göras mot njure av gädda men några sådana mätningar hittades inte i litteraturen.

I hepatopancreas av signalkräfta från Vallbyån detekterades inga läkemedel. PFAS-halterna var att betrakta som generellt låga, med PFOS på 0,84-0,85 ng/g vv i abborre och gädda och 0,19-0,54 ng/g vv i kräfta. Intagsberäkning baserat på summan av PFAS₄ i fisk från Kundbysjön och kräfta från Vallbyån visade att de kan ätas mer än en gång i veckan utan att tolerabelt veckointag (TVI) för PFAS överskrids. De nyligen antagna gränsvärden som finns avseende PFAS i fisk och kräfta underskreds (European Commission, 2022). Gränsvärdena för PFOS ligger på 7, 35 och 3 ng/g vv i abborre, gädda respektive kräfta.

Ekotoxikologiska riskkvoter

Ett sätt att bedöma risken för påverkan av läkemedelsrester och andra ämnen på vattenlevande organismer är att beräkna så kallade riskkvoter, mellan antingen beräknad eller uppmätt läkemedelskoncentration i vattnet och den maximala koncentration av samma substans där inga effekter påvisats vid ekotoxikologiska studier. Riskkvoterna kan alltså beräknas på två olika sätt:

- **PEC/PNEC:** Den beräknade kvoten betecknas PEC/PNEC i det fall en beräknad läkemedelskoncentration har använts. PEC (Predicted Environmental Concentration) beräknas utifrån uppmätt koncentration i utsläppspunkten, i det här fallet från Rimbo ARV, samt förväntad utspädning av respektive substans i recipienten. PNEC (Predicted No Effect Concentration) beskrivs senare i detta stycke.
- **EC/PNEC:** EC/PNEC kan användas i det fall uppmätt koncentration funnits tillgänglig för det aktuella vattnet. EC (Environmental Concentration) är den uppmätta koncentrationen i recipienten. En säkrare bedömning av den toxikologiska risken i vatten kan göras om analysresultat av ämnet finns tillgängligt så att riskkvoten EC/PNEC kan beräknas.

PNEC (Predicted No Effect Concentration) baseras på NOEC (No Observed Effect Concentration), som motsvarar den koncentration som är gränsen för när toxiska effekter i den akvatiska miljön har observerats. Till dessa värden tillämpas även en säkerhetsfaktor som tar hänsyn till osäkerheten i de ekotoxikologiska studier som ligger till grund för NOEC. Säkerhetsfaktorn för varje substans beror på tillgängliga toxikologiska data. Enligt riskbedömningsreglerna i REACH-förordningen (ECHA guidance on chemical risk assessment; echa.europa.eu) ska säkerhetsfaktorer tillämpas enligt:

- Säkerhetsfaktor 10: vid tre kroniska test vid tre olika trofinivåer.
- Säkerhetsfaktor 50: vid ett akut test samt två kroniska tester vid tre olika trofinivåer.
- Säkerhetsfaktor 100: två akuta tester samt ett kroniskt test vid tre olika trofinivåer.
- Säkerhetsfaktor 1000: tillämpas i det fall kroniska tester saknas.
- I vissa fall finns endast LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) tillgängligt för PNEC-bestämning och då tillkommer en faktor 2 för att kompensera för osäkerheten.

Som underlag i den aktuella bedömningen används data från Sehlén et al. (2015) som uppdaterades under 2019 inom förstudieprojektet vid Himmerfjärdsverket (Ågerstrand, 2019).

Riskkvoten EC/PNEC beräknas genom att dividera den uppmätta koncentrationen med PNEC. Riskkvoten PEC/PNEC beräknas enligt:

$$\text{Riskkvot} \left(\frac{PEC}{PNEC} \right) = \frac{ARV \text{ UT}}{PNEC * \text{Utspädning}}$$

I beräkningen av PEC har även hänsyn tagits till "bakgrundskoncentrationer" av de läkemedel som detekterats uppströms i Vallbyån.

Hög risk för oönskade effekter anses föreligga om riskkvoten är 1 eller högre. I intervallet 0,1–1 är risken måttlig, och en riskkvot <0,1 medför en låg risk. Riskkvoterna har givits en färgkodning enligt **Tabell 18**.

Tabell 18 Riskklassning av PEC/PNEC och EC/PNEC.

Risikkvot (PEC/PNEC e.l. EC/PNEC)	Risk
<0,1	Låg risk
0,1-1	Måttlig risk
>1	Hög risk

Tabell 19 visar effektkoncentrationer (PNEC), relaterade osäkerhetsfaktorer, koncentrationer i utgående avloppsvatten från Rimbo ARV samt beräknade PEC och PEC/PNEC risikkvoter. I **Tabell 20** redovisas motsvarande tabell men med uppmätta koncentrationer (EC). Alla uppmätta och beräknade koncentrationer presenteras som medelvärden för samtliga provtagningstillfällen under studien. PEC är beräknat utifrån medelvattenföring i den nedre delen av Vallbyån och Kundbysjöns utlopp (se avsnitt "Recipientförhållanden" tidigare i rapporten). Observera att för zolpidem, ketoconazole och metotrexat finns inga tillgängliga PNEC-värden som bedömts vara nog tillförlitliga. EC/PNEC redovisas inte för hormonerna på grund av att dessa i hög utsträckning underskridit analysmetodens detektions- och kvantifieringsgräns i recipientvattnet. PEC/PNEC redovisas inte för EE2 på grund av samma anledning.

Av resultaten framgår att fyra substanser överskrider risikkvoten (1,0) i Vallbyån (nedströms) samt Kundbysjön: citalopram, oxazepam, östron och östradiol (**Tabell 19**). Diklofenak, furosemide, sertraline (endast Vallbyån) och sulfametoxazol ligger inom den måttliga risikkvoten (0,1–1). Beräknade kvoter är lägre i Kundbysjön på grund av en större utspädning jämfört med Vallbyån. Intressant är att även risikkvoterna för uppmätta koncentrationer (**Tabell 20**) till stor del följer detta, det vill säga lägre kvoter i Kundbysjön jämfört med Vallbyån nedströms. Av **Tabell 20** framgår att uppströms i Vallbyån, det vill säga innan Rimbo ARV, är samtliga risikkvoter låga för de substanser som detekterats. Nedströms reningsverket ger de uppmätta koncentrationerna höga risikkvoter för citalopram (110 i Vallbyån och 29 i Kundbysjön), diklofenak (1,3 i Vallbyån) och oxazepam (2,0 i Vallbyån och 1,0 i Kundbysjön). Den högsta uppmätta risikkvoten erhöles för citalopram med 110 i Vallbyån. NOEC-värdet för citalopram baseras dock på få effektstudier och det beräknade PNEC-värdet kommer därmed med en hög osäkerhetsfaktor (2000).

Resultaten för de predikterade kvoterna (PEC/PNEC) och de uppmätta (EC/PNEC) var i hög grad samstämmiga gällande vilken riskkategori kvoten inföll i. Av de 20 substanser som kategoriserades både som predikterade och uppmätta kvoter i Vallbyån, överensstämde riskklassningen i 18 fall. De två som inte matchade var klaritromycin och diklofenak. I båda fallen var klassningen en risknivå högre i uppmätt jämfört med predikterad. Klaritromycin hade "låg risk" som predikterad men måttlig risk som uppmätt. Diklofenak hade måttlig risk som predikterad men hög risk som uppmätt. Av de 12 substanser som kategoriserades både som predikterade och uppmätta kvoter i Kundbysjön överensstämde riskklassningen i samtliga fall.

För hormonerna baseras beräknade PEC till stor del på mätningar som varit under analysmetodens detektions-/kvantifieringsgräns. Här kan det därför finnas motiv att även utgå från riskbedömning kopplat till genomförda effekttester av östrogen påverkan (se avsnitt "Effekttester" tidigare i rapporten).

Tabell 19 Tabellen visar PNEC (Predicted No Effect Concentration) med tillhörande säkerhetsfaktorer (Sehlén et al., 2015; Ågerstrand, 2019), utgående koncentrationer från Rimbo, beräknade koncentrationer (PEC) nedströms i Vallbyån (Vallbyån N) och Kundbysjön samt beräknade riskkvoter för respektive substans och lokal (PEC/PNEC). Grön färgkodning tolkas som låg risk, gul som måttlig risk och orange som hög risk. "n" är antalet mätningar som medelvärdet baseras på.

Substans	PNEC (ng/l)	Säkerhetsfaktor	Utgående Rimbo (ng/l)	n	PEC Vallbyån N (ng/l)	PEC Kundbysjön (ng/l)	PEC/PNEC Vallbyån N	PEC/PNEC Kundbysjön
Läkemedelsrester								
Atenolol	32 000	100	58,6	6	2,4	1,9	0,000076	0,000061
Karbamazepin	2 500	10	140	6	6,1	4,9	0,0024	0,002
Citalopram	0,075	2x1000	126	6	5,3	4,2	70	56
Klaritromycin	40	50	53,3	6	2,2	1,8	0,056	0,044
Diklofenac	50	2x10	762	6	34	28	0,68	0,55
Erytromycin	20	1000	12,1	6	0,5	0,4	0,025	0,02
Flukonazol*	15 000	SSD*	104	6	4,4	3,5	0,00029	0,00023
Furosemid	156	1000	1007	6	42	33	0,27	0,21
Ibuprofen	102 000	10	1239	6	52	41	0,00051	0,00041
Losartan*	7 800	100	1259	6	55	44	0,0071	0,0057
Metoprolol	2590	100	1014	6	44	35	0,017	0,014
Naproxen	15000	10	676	6	30	24	0,002	0,0016
Oxazepam	10	2x50	326	6	14	11	1,4	1,1
Paracetamol	46 000	10	45	6	1,9	1,5	0,000041	0,000032
Propranolol	228	10	54,1	6	2,3	1,8	0,0099	0,0079
Sertralin	9,4	50	27,8	6	1,2	0,9	0,12	0,098
Sulfametoxazole	118	50	368	6	17	14	0,15	0,12
Tramadol*	170 000	1000	244	5	10	8,1	0,00006	0,000048
Trimetoprim	500	50	56,9	6	2,6	2,1	0,0052	0,0042
Venlafaxin*	3220	1000	377	6	17	14	0,0052	0,0042
Zolpidem	***	-	1,26	6	0,053	0,042	-	-
Ciprofloxacin	64	50	132	2	5,5	4,4	0,086	0,068
Ketokonazol	***	-	75,0	1	3,1	2,5	-	-
Metotrexat	***	-	0,40	5	0,017	0,013	-	-
Hormoner								
Östron (E1)	0,08	100	21,5		1,7	1,6	22	20
Östradiol (E2)	0,04	10	7,63		1,9	1,9	48	47

*Data från CWPharma (inte kontrollerat).

**SSD (Species Sensitivity Distribution), det vill säga ingen säkerhetsfaktor.

***Ingen aktuell bedömning av PNEC tillgänglig.

Tabell 20 Tabellen visar uppmätta koncentrationer (EC) i Vallbyån uppströms Rimbo (Vallbyån U), nedströms i Vallbyån (Vallbyån N) och Kundbysjön samt beräknade riskkvoter för respektive substans och lokal (EC/PNEC). Grön färgkodning tolkas som låg risk, gul som måttlig risk och orange som hög risk. Beräkningarna utgår från samma PNEC-värden som redovisas i föregående tabell. "n" är antalet mätningar som medelvärdet baseras på, för nedströms provpunkt i Vallbyån respektive Kundbysjön.

Substans	n Vallby	n Kundby	EC Vallbyån U (ng/l)	EC Vallbyån N (ng/l)	EC Kundbysjön (ng/l)	EC/PNEC Vallbyån U	EC/PNEC Vallbyån N	EC/PNEC Kundbysjön
Atenolol	8	4	*	3,13	*	-	0,000098	-
Karbamazepin	8	4	0,250	3,25	*	0,00010	0,0013	-
Citalopram	8	4	*	8,48	2,18	-	110	29
Klaritromycin	8	4	*	5,13	0,495	-	0,13	0,012
Diklofenac	8	4	2,44	65,8	22,5	0,049	1,3	0,45
Erytromycin	8	4	*	0,250	*	-	0,013	-
Flukonazol	8	4	*	4,18	*	-	0,00028	-
Furosemid	8	4	*	60,0	*	-	0,38	-
Ibuprofen	8	4	0,375	155	33,8	0,0000037	0,0015	0,00033
Losartan	8	4	2,87	95,8	35,8	0,00037	0,012	0,0046
Metoprolol	8	4	1,95	76,3	28,0	0,00075	0,029	0,011
Naproxen	8	4	1,57	43,9	17,9	0,0001	0,0029	0,0012
Oxazepam	8	4	*	20,2	10,4	-	2,0	1,0
Paracetamol	8	4	*	10,9	7,00	-	0,00024	0,00015
Propranolol	8	4	*	2,70	1,00	-	0,012	0,0044
Sertralin	8	4	*	1,38	*	-	0,15	-
Sulfametoxazole	8	4	1,86	31,3	*	0,016	0,27	-
Tramadol	7	4	*	9,14	6,55	-	0,000054	0,000039
Trimetoprim	8	4	0,244	2,96	*	0,00049	0,0059	-
Venlafaxin	8	4	1,06	27,2	4,56	0,00033	0,0084	0,0014
Zolpidem	8	4	*	*	*	-	-	-
Ciprofloxacin	3	1	*	*	*	-	-	-
Ketokonazol	2	1	*	*	*	-	-	-
Metotrexat	7	3	*	*	*	-	-	-

*Substans under analysmetodens detektionsgräns vid samtliga mätillfällen.

Delstudie 2 – utvärdering av avancerad läkemedelsrening med biologiska tester vid Rimbo ARV

Inledning

Syftet med denna studie var att med biologiska tester utvärdera två olika reningsmetoder för läkemedelsrening vid Rimbo ARV. De biologiska tester som ingick i denna studie baserades på ekotoxikologiska tester från två olika trofiska nivåer för att representera vattenlevande organismer i det mottagande akvatiska ekosystemet. De ekotoxikologiska testerna bestod av in vivo-tester med zebrafisk och dammsnäcka, där effekter på gen-, organism- och populationsnivå utvärderades. Zebrafisk (*Danio rerio*) är en av de vanligaste arterna av fiskar som används för toxikologiska tester. Till skillnad från inhemska svenska fiskarter som reproducerar sig en gång per år reproducerar sig zebrafisk flera gånger i veckan. Från grupper av lekande zebrafisk kan därmed reproduktionsutfallet studeras dagligen. Större dammsnäcka (*Lymnaea stagnalis*) är ett ryggradslöst blötdjur (mollusk) som är vanligt förekommande i vattensystem i Europa, Asien och Amerika, dvs en väldigt relevant ekologisk art för svenska vattenmiljöer, där större dammsnäcka ofta återfinns i hela landet, dock vanligast i Syd- och Mellansverige. In vivo-testerna med zebrafisk och dammsnäcka utfördes på plats vid Rimbo ARV i en labutrustad försökscontainer.

Material och metoder

Fisk- och snäckexponeringar utfördes i en inredd 10 fots container. Fyra parallella linjer förbereddes och belastades kontinuerligt med fyra olika försöksvatten: Referensvatten utgjordes av dagens utgående avloppsvatten från Rimbo ARV (UT); UT-vatten behandlat med granulerat aktivt kol (GAC), respektive UT-vatten behandlat med ozon + sandfiltrering (OZ), samt aktivkolfilterat kranvatten (KV) som utgjorde kontrollvatten. Provtagning av försöksvatten skedde även för analys av cellaktivitet utförd av BioCell Analytica AB (se metod Humanceller s.19). Alla försöksvatten tillfördes var sin 100-L fördelningstunna som fungerade som utjämningsstankar i containern (**Figur 21**). Luft tillfördes de behandlade vattnen i fördelningstunnorna för att dels driva av eventuellt restozon och övermättnad av syrgas, dels för att lufta upp utgående respektive kolfilterat avloppsvatten för att säkerställa att syrebrist inte påverkade organismer i försöken. Anläggningen var värmeisolerad och möjlighet fanns till uppvärmning, kylning och hög luftomsättning. Temperaturen loggades i inom- och utomhusluft, i fördelningstankarna för akvarierna och i varje enskilt akvarium.

Zebrafisk

Försöksdesign

Den experimentella designen utgjordes av fyra försöksvatten med tre replikat vardera. För varje försöksvatten användes tre separata 60-liters akvarier där grupper av vuxen zebrafisk exponerades kontinuerligt under tre veckor i april-maj 2022. Sammanlagt bestod försöksuppställningen av 12

akvarier med 10 zebrafiskar vardera vid start. Försöksvatten från de fyra fördelningstunnorna leddes via ansluten PEM-slang, rostfria rör och silikonslang till vardera av de tre 60-litersakvarierna. Flödet skedde genom självtryck från tunnorna och reglerades med kulventiler och slangklämmor till ett flöde av ca. 0,1 L/min vilket gav en omsättning av totalvolymen i akvarierna av 2,5-3 ggr/dygn. I överkant av akvarierna fanns borrade utloppshål med anslutet PEM-rör för att leda vattnet via bräddavlopp till utgående avlopp i containern. I utloppen användes silplattor för att förhindra att fiskarna skulle rymma. Varje akvarium var utrustat med termostatstyrd doppvärmare för att hålla temperaturen konstant vid ca. 25 °C och syresättning av vattnet skedde genom externa luftpumpar (JBL Pro Air) som pumpade luft via silikonslang till keramiska luftstenar nedsänkta i vattnet. Drift av försöksuppställningen skedde genom kontinuerlig pumpning under en vecka innan försöksstart för att säkerställa systemfunktion. Vattenkvalitetsparametrar (temperatur, pH, konduktivitet, syrehalt) mättes som stickprov men temperaturen loggades kontinuerligt i försöksakvarierna under försöket. Daglig tillsyn skedde av teknisk utrustning och fiskhälsa. Matning av fiskar skedde dagligen med kommersiellt flingfoder (SeraVipan). Studien utfördes i enlighet med etiskt tillstånd beviljat av Uppsala djurförsöksetiska nämnd (Dnr 5.8.18-02613/2022).



Figur 19 Försökscontainer visande fördelningstunnor och försöksakvarier för zebrafiskstudier.

Utförande

Zebrafisk köptes genom Djurhobby Uppsala och hölls under 1 månad på akvatiska avdelningen på institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU, Uppsala, för att säkerställa god fiskhälsa och god reproduktiv status innan försöksstart. Vid försöksstart könssorterades fiskarna baserat på fenotypiska karaktäristika genom okulär besiktning. Grupper om fem presumtiva honor och fem presumtiva hanar placerades sedan tillsammans i sammanlagt 12 plastpåsar för transport till Rimbo ARV. Påsarna med zebrafiskar placerades i försöksakvarierna för aklimatisering av fiskarna till rådande vattenförhållanden. Fiskarna exponerades därefter under sammanlagt tre veckor. Vid start av den tredje exponeringsveckan placerades zebrafiskarna i vardera akvarie i rostfria nätburar (18x20x20 cm) för studier av reproduktionsutfall. Under nätburarna placerades glasformar i passande storlek för att samla upp äggen som sjönk genom nätet vid reproduktion. Reproduktionsutfallet studerades dagligen under en vecka i alla akvarier

genom att skjuta den rostfria nätburen åt sidan och sifonera ut äggen från glasformen. Äggen placerades i 50-ml petriskålar av plast varefter de räknades och undersöktes i stereomikroskop (Leica). Äggen klassificerades sedan som befruktade eller obefruktade. Reproduktionsförsöket med zebrafisk utfördes med utgångspunkt från en standardiserad metod (OECD, 2012). Reproduktionsutfallet normaliserades och beräknades per antal ingående honor i varje försöksvattens replikat.

Beteendestudier och provtagning

Efter tre veckors exponering i försöksvatten videofilmades fiskarna för studier av simbeteende innan de provtogs. Beteendestudier utfördes genom att häva upp en fisk från vardera försöksvatten och placera dem enskilt i 400-mL glasbägare innehållande tempererat kranvatten. Glasbägarnas sidor hade svarta manschetter för att förhindra påverkan av yttre faktorer på beteende hos fiskarna. Glasbägarna med fiskar placerades på ljust underlag och videofilmades under tio minuter med datoransluten webbkamera. Videofilmerna lagrades på dator. Beteendevärdering skedde med fisk från varje försöksvatten samtidigt, dvs fyra fiskar filmades samtidigt. Beteendestudier och påföljande provtagning skedde i ordning av replikat, dvs fisk från replikat 1 från alla försöksvatten provtogs först och därefter replikat 2 följt av replikat 3. Videofilmer av zebrafisk utvärderades avseende beteendeanalys av uppmätt simaktivitet, där total simdistans hos alla enskilda fiskar uppmättes under 10 minuter. Filmerna analyserades med mjukvaran Noldus DanioVision avsedd för utvärdering av simbeteende hos fisk (Noldus, Wageningen, Nederländerna).

Efter videofilmning sövdes fiskarna i separata bägare innehållande narkosmedel MS222 (Tricaine methanesulfonate-250 mg/l). Avlivning skedde sedan genom dekapitering och hjärndestruktion, varefter vikt och längd mättes. Kroppsindex (Body Condition Factor; BCF) beräknades som vikt (g)/(längd (cm)³) *100. Fiskarna klipptes därefter upp i buken och levern dissekerades fram under arbete i stereomikroskop (Leica EZ4D). Levern placerades i RNA-later (Invitrogen) för framtida analys av genuttryck. Resterande fiskkropp placerades i 2-ml Eppendorfrör innehållande vävnadsfixativ (4% formalin) för histologiska studier av gonader. Provtagningen skedde under två på följande dagar. Zebrafiskar fixerade i formalin genomgick rutinmässig upparbetning för histologiska studier. Fiskarna inbäddades i paraffin, paraffinblocken snittades med mikrotom och snitt innehållande representativ översikt av gonader färgades med hematoxylin-eosin (HE-färgning). Snitt av gonaderna undersöktes sedan genom ljusmikroskopi. Genom undersökningarna gjordes histologisk könsbestämning till hane eller hona. Gonaderna utvärderades avseende reproduktiv könsmognad enligt Örn et al. (2016). Testiklar graderades subjektivt efter mängden innehåll av spermier, där avsaknad av spermier, låg andel spermier och hög andel spermier klassificerades som omogen, under utmognad respektive fullmogen. För honor graderades mognadsgraden baserat på ovariets innehåll av andel ägg med inkorporering av vitellogenin-vesiklar enligt standardiserad metod av Selman et al. (1993). Ovarier med avsaknad av ägg innehållande vitellogenin-vesiklar, samt låg och hög andel ägg med vitellogenin-vesiklar klassificerades som omogen, under utmognad respektive fullmogen.

Dammsnäcka

Försöksdesign och utförande

Reproduktionsförsöket med snäckor utfördes med utgångspunkt från en standardiserad metod (OECD TG 243) med vuxna snäckor av arten stor dammsnäcka (*Lymnaea stagnalis*). Snäckorna kom från en laboratoriepopulation som hållits i flera generationer på institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU. I varje av 20 glasburkar (IKEA; 1,1 l) borrades ett 6 mm hål i sidan så burkarna höll en vattenvolym på 0,7 l och resterande vatten kunde rinna ut. Vatten pumpades kontinuerligt in i burkarna med en peristaltisk slangpump (Ismatec) med 20 separata slangar (en slang till vardera burk) från de respektive fördelningstunnorna. Pumphastigheten var 0,2 l/timme vilket motsvarar ca 6 byten av totala vattenvolymen i burkarna varje dygn. För varje exponeringsgrupp (KV, UT, OZ och GAC) pumpades vatten till fem burkar (**Figur 20**). Fem snäckor fördelades slumpvis till varje burk. Under försöket matades snäckorna med ekologisk bladsallad.



Figur 20 Försöksupställning för dammsnäcka.

Reproduktion och provtagning

Snäckorna exponerades för de olika försöksvattnen under tre veckor. Dag 7, 14 och 21 samlades alla äggkokonger in i Petriskålar. Antal äggkokonger i varje burk samt antal bra och defekta ägg i varje äggkokong räknades med hjälp av en stereolupp. Reproduktionsutfallet normaliserades och uttrycktes per antal levande individer vid lektillfället. Förekomst av döda snäckor kontrollerades regelbundet och plockades bort från försöket snarast. Vid dag 21 sövdes snäckorna i MS222 varpå de vägdes och mättes. Kroppsindex (Body Condition Factor; BCF) beräknades som vikt (mg)/(längd (cm)³) *100. Snäckorna dissekerades och de översta 4 mm av levern (ca 30-40 mg) klipptes bort och sparades i RNA-later enligt tillverkarens anvisningar för vidare genuttrycksanalyser.

Mätning av genuttryck hos zebrafisk och dammsnäcka

RNA isolerades från leverprover med olika metoder för fisk och snäckor. På prover från snäckor användes NucleoSpin® RNA Plus-kit (Macherey Nagel) enligt tillverkarens protokoll. Efter RNA-isolering behandlades proverna med rDNase (Macherey Nagel) följt av NucleoSpin RNA Clean up XS (Macherey Nagel) kit. En total volym på 30 µl RNA-lösning erhöles och sparades i -80°C-frys. På prover från fisk löstes leverprovet först upp i Trizol/kloroform innan användning av NucleoSpin® RNA Plus-kit (Macherey Nagel) enligt tillverkarens protokoll. En total volym på 60 µl RNA-lösning erhöles och sparades i -80°C-frys. Från RNA-lösningarna togs 2 µl för att bestämma RNA-

integritet (RIN) och koncentration genom RNA ScreenTape-analys (Agilent Technologies, USA). Prover som valts ut för studien hade ett RIN-värde mellan 8,1 och 9,9.

För en-steps RTqPCR användes QuantiTect SYBR® Green PCR-kit (Qiagen) enligt tillverkarens anvisningar till en total volym av 20 µl. Prover preparerades på 96-hålsplattor (BioRad) med 5 µl RNA utspätt till 1 ng/µl per brunn och hölls på is. Alla prover analyserades i duplikat. qPCR-reaktionerna utfördes på BioRad CFX Opus 96 (BioRad) enligt följande protokoll: omvänd transkription 50°C (30 min), denaturering 95°C (15 min) och 37 cykler av omväxlande 94°C (15s), 54°-60°C beroende på primer (30s) och 72°C (30s). Vid slutet av varje körning utfördes en slutlig bestämning av smältkurvor för varje PCR-produkt för att säkerställa specifik produktamplifiering och kontrollera primer-dimerbildning. De genuttryck som undersöktes finns beskrivna i **Tabell 21**. Uttrycken för varje gen beräknades enligt Pfaffl (2001) som relativt KV-gruppens medelvärde.

Tabell 21 Gener som analyserades på zebrafiskar och snäckor samt de fysiologiska mekanismer som dessa är involverade i.

Fysiologi	Mekanism	Gen zebrafisk	Gen snäcka
Oxidativ stress	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	Nrf2	
	Katalas		Cat
	Glutationperoxidase		Gpx
Hormonreceptorer	Nuclear hormone receptor		Nr3d
	Androgenreceptor	Ar	
	Östrogenreceptor	Era	
Fas-1 metabolism	Cytochrome p450 1	Cyp1a1	
	Cytochrome p450 3	Cyp3a65	Cyp3a
Äggprotein	Vitellogenin	Vtg1	
	Yolk ferritin		YF
Metallmetabolism	Metallothionein	MT	MT
Referensgener	Ribosomal Protein L13a	Rpl13a	
	Elongation factor		EF

Statistiska analyser

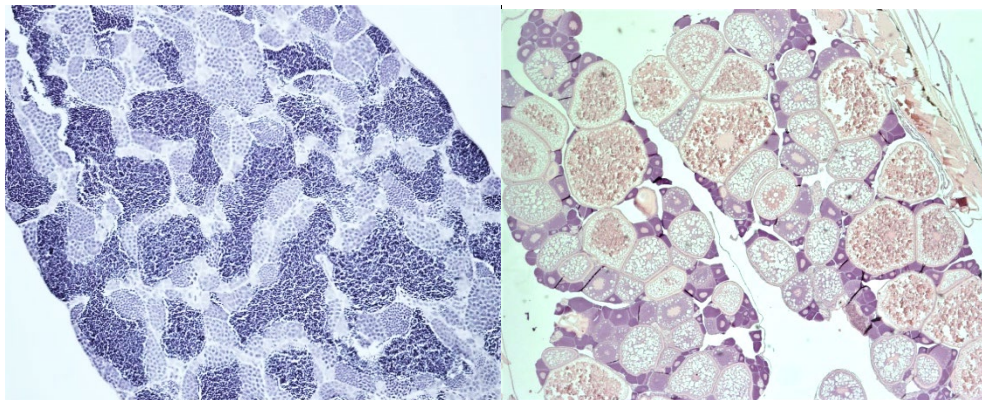
Statistiska uträkningar gjordes med programmet Minitab® version 19.2. I de flesta fall användes funktionen "general linear model" (GLM). För snäckorna testades varje mätrespon mot faktorn "behandling" (KV, UT, OZ och GAC) och för reproduktionen även faktorn "vecka" samt interaktionen "behandling*vecka". För de flesta mätresponserna på fiskarna testades könen separat för varje mätrespon mot faktorn "behandling". För genuttrycken i fiskarna testades varje respon mot faktorerna "behandling" och "kön" samt även interaktionen däremellan: "behandling*kön". Signifikansnivån sattes till $p < 0,05$ och i de fall där signifikans erhöles i faktorn "behandling" användes Fisher LSD-metoden som post-hoc test för att avgöra vilka behandlingar som skilde sig mot varandra. Fishers exact test användes för att utvärdera lekutfall samt totalantal befruktade kontra obefruktade ägg hos zebrafisk.

Resultat

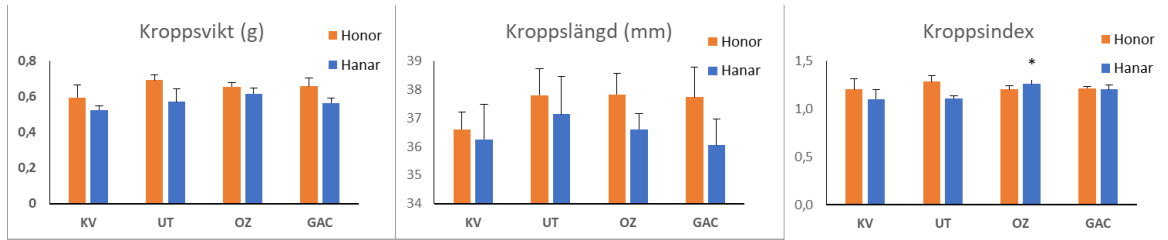
Uppmätta vattenkemiska parametrar under försöksperioden för zebrafisk och dammsnäckor visas i **Appendix B – Tabell B:1**. Utetemperaturens medelvärde varierade under försökets genomförande 19 april-10 maj 2022 mellan +2 och +12°C.

Zebrafisk

Ingen mortalitet av zebrafiskar förekom under exponeringsperioden (**Appendix B- TabellB:2**). Histologiska undersökningar av gonader visade att alla hanar och honor var fullt köns mogna, dvs hanar uppvisade hög förekomst av spermier i testiklar och honor hög förekomst av fullmogna ägg (**Figur 21**). Den histologiska könsbestämningen visade sammanlagt 65 honor och 55 hanar, dvs fem honor fler än vad som okulärt valdes från start. Förändrade könskvoter mot planerad försöksdesign återfanns i alla försöksvatten, med två fler honor i KV och en i vardera UT, OZ och GAC. Ingen statistisk skillnad förelåg mellan de fyra försöksvattnen gällande uppmätt kroppsvikt, kroppslängd eller kroppsindex för honor (**Figur 22**). För hanar var kroppsindex högre i hanar i OZ jämfört med UT och KV, men inga skillnader förelåg för kroppsvikt eller kroppslängd (**Figur 22**).

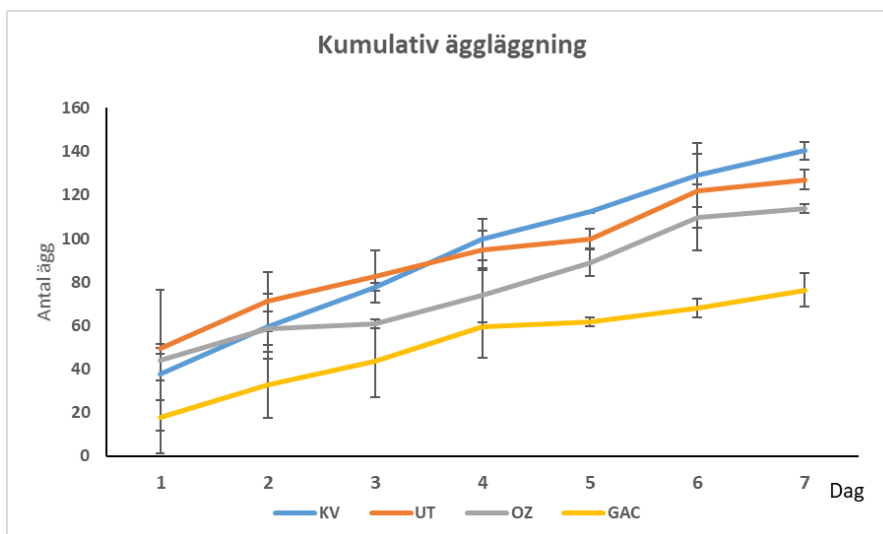


Figur 21 Ljurmikroskopiska foton av histologiska snitt visande representativ testikelvävnad från hane (vänster) innehållande fullmogna spermier (mörkblå områden), samt ovarie från hona (höger) innehållande ägg i olika mognadsgrad inklusive fullmogna ägg (rosafärgade). Haematoxylin-eosin-färgning (HE).

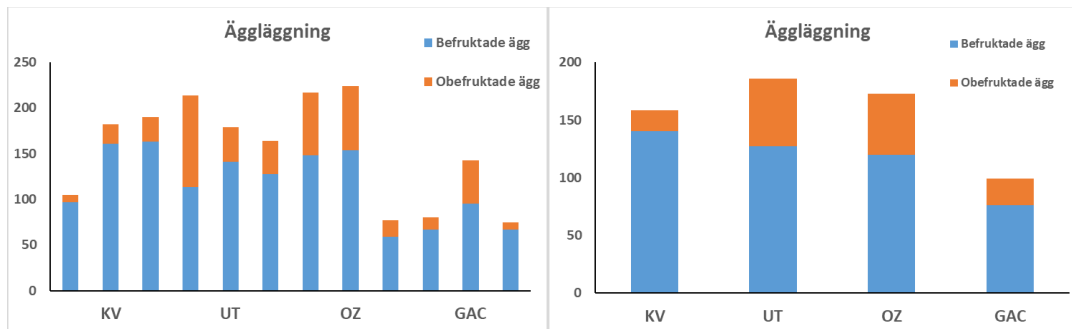


Figur 22 Kroppslängd, kroppsvikt och kroppsindex hos zebrafisk kontinuerligt exponerade för olika försöksvatten under tre veckor. Data visar medelvärde + standardavvikelse av tre replikat per försöksvatten. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol.

Studier av reproduktionsutfall under tredje exponeringsveckan visade ingen skillnad i antal dagar med äggläggning för de olika försöksvattnen (**Appendix B-TabellB:2**). Av 21 möjliga dagar för reproduktion (3 replikat a' 7 dagar) skedde äggläggning hos KV vid sammanlagt 21 dagar, UT 19 dagar, OZ 20 dagar, samt GAC 19 dagar. Antal lagda ägg per dag per hona uppvisade stor variation oavsett försöksvatten och replikat och varierade mellan 0 och 90 ägg. I genomsnitt lades 21-23 ägg per hona och dag i KV, UT och OZ, men i GAC var genomsnittet per dag lägre med 14 lagda ägg per hona. Den kumulativa äggläggningen visade att GAC producerade färre ägg än KV, UT och OZ, men utan statistisk skillnad (**Figur 23 & Figur 24**). Befruktningsfrekvensen var relativt lika i alla försöksvatten och inga skillnader uppmättes.

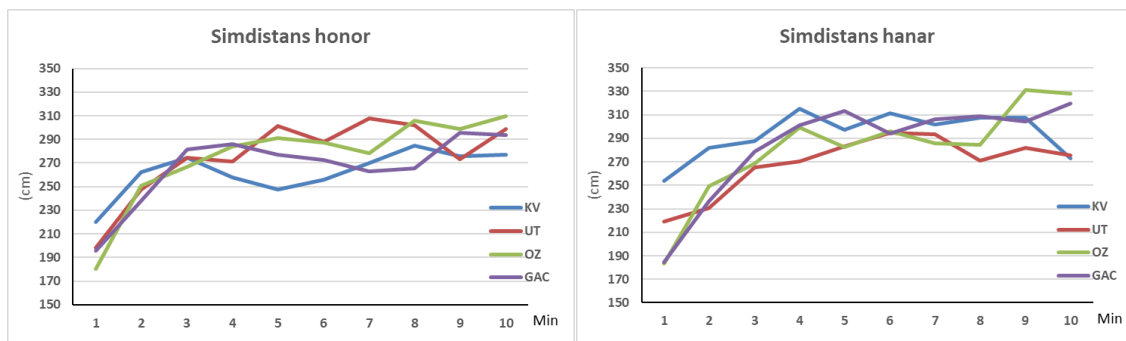


Figur 23 Kumulativ äggläggning av befruktade ägg hos zebrafisk kontinuerligt exponerade för olika försöksvatten under tre veckor. Data visar medelvärde + standardavvikelse av kumulativt befruktade ägg per hona hos tre replikat av varje försöksvatten över sju dagars reproduktion. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol.



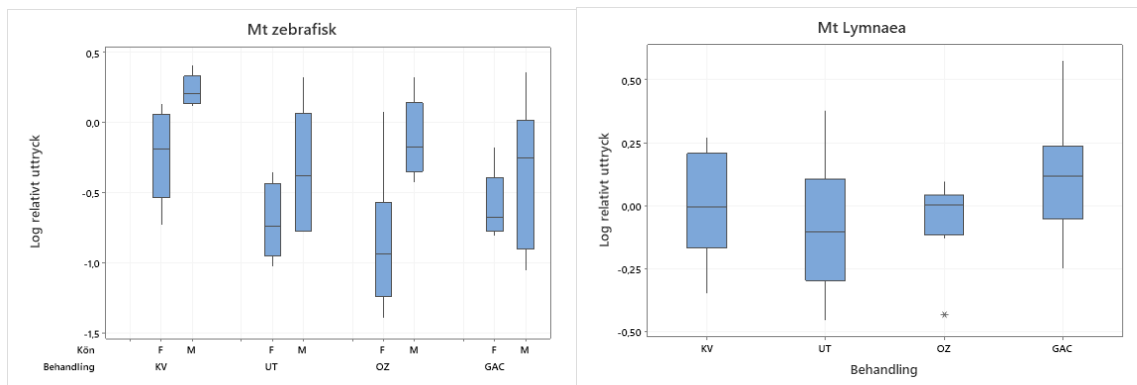
Figur 24 Äggläggning hos zebrafisk kontinuerligt exponerade för olika försöksvatten under tre veckor. Data visar antal befruktade och obefruktade ägg hos de tre replikaten av försöksvatten (vänster), samt medelvärde hos olika försöksvattnen (höger), beräknat per antal ingående honor under sammanlagt sju dagars reproduktion. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol.

Ingen skillnad förelåg mellan försöksvatten i uppmätt total simdistans under försökets tio minuter, vare sig för honor eller hanar (**Figur 25**). Den totala simdistansen hos både honor och hanar i alla försöksvatten var relativt lika där genomsnittlig total simdistans under tio minuter varierade mellan 27-29 meter. Statistisk analys av riktningskoefficienten (k-värdet), dvs förändring av simaktiviteten över tid, visade ingen skillnad mellan försöksvattnen. Både honor och hanar uppvisade generellt låg simaktivitet vid beteendeförsökets start, vilken sedan kontinuerligt ökade under de första minuterna för att sedan nå en relativt jämn simdistans över tid hos alla försöksvatten (**Figur 25**).



Figur 25 Simbeteende hos honor (vänster) och hanar (höger) av zebrafisk exponerade för olika försöksvatten. Data visar uppmätt simdistans under tio minuter efter tre veckors kontinuerlig exponering. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol.

Totalt analyserades genuttryck från två hanar och två honor per replikat, dvs sex hanar och sex honor per försöksvatten. För alla genuttryck utom Ar samt referensgenen Rpl13 förelåg en skillnad mellan honor och hanar. Det var få skillnader i genuttryck efter försöksvattenexponering, både hos hanar och honor. Ett undantag var uttrycket av metallotionein (MT), där KV hade högre uttryck i jämförelse med de andra försöksgrupperna, både för honor och hanar (**Figur 26, Appendix B-Tabell B:3**). Dessutom var det lägre uttryck av Ar i GAC-gruppen jämfört med UT- och KV-grupperna, dock ej jämfört med OZ-gruppen (**Figur 26**).

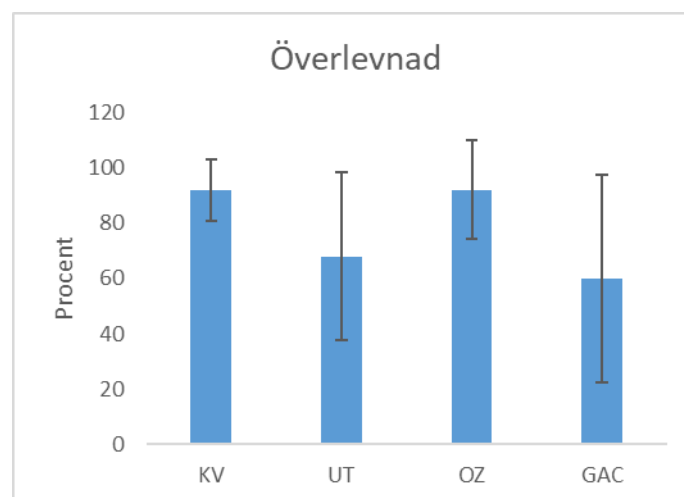


Figur 26 Genuttryck relativt medelvärdet för respektive kontrollgrupp för zebrafisk respektive dammsnäckor exponerade för de olika försöksvattnen (KV, UT, OZ och GAC). Till vänster: Zebrafisk, metallothionein (Mt) i honor (F) och hanar (M). Till höger dammsnäckor, metallothionein (Mt). Skalan för genuttryck är logaritmerad.

Dammsnäckor

Temperaturerna på vattnet i burkarna med snäckor höll sig i stort på samma temperatur som i ineluften i containern. Detta innebär att temperaturerna i vattnet påverkades till viss del av den varierande temperaturen utomhus. Medeltemperaturerna i snäckornas vatten var dock relativt lika mellan veckorna: 20,0; 19,8 och 20,7 °C under respektive vecka 1, 2 och 3. Temperaturerna mellan de olika försöksvattnen var lika.

Det förekom mortalitet i alla exponeringsgrupper (Figur 27). Även om UT- och GAC-grupperna hade färre överlevande än de andra var detta ingen statistiskt säkerställd skillnad. Totalt överlevde 60% av snäckorna i GAC-gruppen medan 92% överlevde i KV- och OZ-grupperna. Överlevnaden i UT-gruppen låg på 68%.

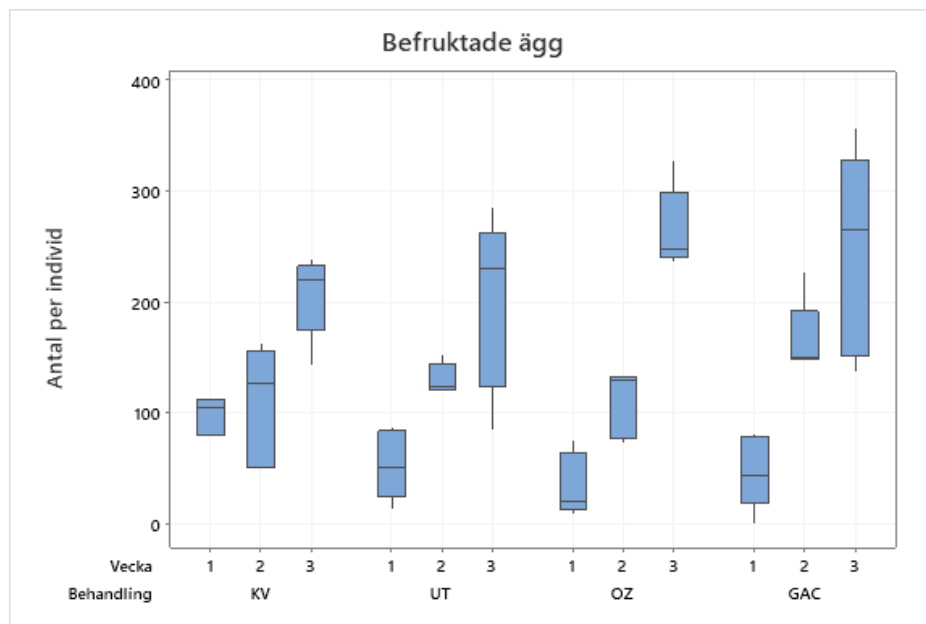


Figur 27 Överlevnaden hos dammsnäckor kontinuerligt exponerade för olika försöksvattnen under tre veckor. Data visar medel och standardavvikelse av överlevnaden i fem replikat av vardera behandlingsgrupp. KV=kranvattnet, UT=utgående avloppsvattnet, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol.

Ingen skillnad förekom i vikt, längd eller BCF mellan de överlevande snäckorna i de olika vattnen (**Appendix B-Tabell B:4**).

Äggproduktionen visade generellt stor spridning. Det var inga skillnader i antalet lagda ägg, antal befruktade ägg (**Figur 28**) eller antalet lagda kokonger mellan grupperna. Det var heller ingen skillnad i andel defekta ägg mellan de olika grupperna. Däremot ökade äggläggningen generellt ju längre försöket pågick.

Ingen av de undersökta genuttrycken uppvisade någon skillnad mellan snäckor från de olika vattnen (**Appendix B-Tabell B:4**).



Figur 28 Antal befruktade ägg/individ per vecka hos dammsnäckor under tre veckors kontinuerlig exponering för olika försöksvatten. Data visar spridningen inom fem replikat av vardera behandlingsgrupp. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol.

Humanceller

Vid undersökningar med humanceller av vattenprover tagna under försöksperioden för fisk och snäckor detekterades generellt låga nivåer av samtliga aktiviteter i utgående vatten (UT). I OZ uppmättes ingen cellaktivitet och i GAC enbart låga aktiviteter av ER och AhR. Inget av proverna uppvisade AR-aktivitet. För KV uppmättes aktivitet för Nrf2 och anti-AR i liknande aktiviteter som i UT, samt även viss aktivitet av AhR.

Tabell 22 Uppmätta aktiviteter i humana celltester av olika försöksvatten.

Provpunkt	Nrf2-aktivitet (ug/L)	Anti-AR aktivitet (ng/L)	AR-aktivitet (ng/L)	ER-aktivitet (ng/L)	AhR-aktivitet (ng/L)
KV	11,3	105	<LOD	<LOD	0,15
UT	8,59	121	<LOD	0,67	0,73
OZ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
GAC	<LOD	<LOD	<LOD	0,13	0,12

Ekotoxikologiska riskkvoter med OZ och GAC

Enligt samma metod som i avsnittet "Ekotoxikologiska riskkvoter" beräknades kvoten PEC/PNEC, likt **Tabell 19**, men med kompensation för den avskiljning av läkemedel som noterats vid jämförelse av läkemedelskoncentrationer i utgående samt efter extra behandling med OZ och GAC (**Tabell 23**). Reningsgraderna erhöles från Björleinius (in prep.) pilotstudie av olika reningsalternativ. Observera att tabellen endast inkluderar de substanser där en reduktionsgrad har rapporterats. Reduktion rapporterades inte för paracetamol och ciprofloxacin. Av resultaten framgår att beräknade riskkvoter efter rening inte visar "hög risk" för någon substans för båda reningsmetoderna. Endast citalopram (OZ och GAC) och oxazepam (OZ) visar måttlig risk, övriga substanser visar låg risk efter applicerad rening på utgående avloppsvatten från Rimbo ARV. Samtliga substanser som hade måttlig eller hög risk med den konventionella reningen fick en lägre riskklassning med OZ eller GAC. Citalopram sjönk från hög till måttlig risk. Diklofenak, furosemid, sertralin och sulfametoxazol (endast Vallbyån) sjönk från måttlig till låg. Oxazepam sjönk från hög risk till måttlig risk med OZ och till låg risk med GAC.

Tabell 23 Beräknade riskkvoter för nedströms i Vallbyån (Vallbyån N) och Kundbysjön för respektive substans (PEC/PNEC), med hänsyn till reduktion av utgående koncentrationer från Rimbo efter rening med ozon (O3) samt aktivt kol (GAC). KONV (konventionell) redovisar riskkvot utan extra rening, alltså samma siffror som i Tabell 19. Grön färgkodning tolkas som låg risk, gul som måttlig risk och orange som hög risk. Beräkningarna utgår från samma PNEC-värden som redovisas i Tabell 19.

Substans	OZ			GAC			KONV	
	Renings-grad (%)	PEC/PNEC Vallbyån N	PEC/PNEC Kundbysjön	Renings-grad (%)	PEC/PNEC Vallbyån N	PEC/PNEC Kundbysjön	PEC/PNEC Vallbyån N	PEC/PNEC Kundbysjön
Atenolol	97,0	0,0000023	0,0000018	97,0	0,0000023	0,0000018	0,000076	0,000061
Karbamazepin	98	0,00015	0,00014	98	0,00015	0,00014	0,0024	0,002
Citalopram	99,3	0,49	0,39	99,3	0,49	0,39	70	56
Klaritromycin	89	0,0062	0,0049	89	0,0062	0,0049	0,056	0,044
Diklofenak	99,3	0,051	0,051	99,8	0,048	0,048	0,68	0,55
Erytromycin	-	-	-	58	0,01	0,0083	0,025	0,02
Flukonazol	71	0,000086	0,000068	98	0,0000065	0,0000052	0,00029	0,00023
Furosemid	99	0,0031	0,0025	99	0,0031	0,0025	0,27	0,21
Ibuprofen	68	0,00017	0,00013	97	0,00002	0,000017	0,00051	0,00041
Losartan	97	0,00058	0,00054	95	0,00068	0,00061	0,0071	0,0057
Metoprolol	98	0,0010	0,00097	100	0,00078	0,00077	0,017	0,014
Naproxen	97,3	0,00015	0,00014	96,5	0,00017	0,00015	0,002	0,0016
Oxazepam	85,0	0,20	0,16	99,7	0,0046	0,0036	1,4	1,1
Propranolol	98	0,00019	0,00015	98	0,00019	0,00015	0,0099	0,0079
Sertralin	96,2	0,0047	0,0038	96,0	0,005	0,004	0,12	0,098
Sulfametoxazol	99	0,016	0,016	94	0,023	0,021	0,15	0,12
Tramadol	98,76	0,00000075	0,00000059	98,86	0,00000069	0,00000054	0,00006	0,000048
Trimetoprim	99	0,00051	0,00050	99	0,00051	0,00050	0,0052	0,0042
Venlafaxin	99,5	0,00034	0,00034	99,6	0,00034	0,00033	0,0052	0,0042

Diskussion

Syftet med denna studie var främst att utvärdera om avancerad avloppsrening baserat på ozonering eller kolfiltrering jämfört med konventionell rening förbättrar biologiska funktioner i de valda testorganismerna fisk och snäcka. Kranvattnet (KV) ska ses som en referens till att metodiken fungerar optimalt snarare än som en traditionell kontrollgrupp. Generellt sågs inte några betydande negativa effekter av utgående avloppsvatten i någon av testorganismerna. Med mer omfattande negativ påverkan av UT hade förändringar av de uppmätta hälsoparametrarna troligen kunnat observeras tydligare efter avancerad rening med OZ och GAC.

Efter tre veckors kontinuerlig exponering sågs inga betydande skillnader i kroppslängd, kroppsvikt eller kroppsvikt (BCF) vare sig hos zebrafisk eller dammsnäcka. Undantaget var kroppsvikt hos hanar exponerade för OZ där något högre kroppsvikt uppmättes jämfört med KV och UT, men ej jämfört med GAC. Resultaten indikerar en något förbättrad tillväxt av hanar under försöksperioden i OZ, vilket kan bero på olika faktorer, ex. bättre närings- och kemisk hälsostatus i OZ. Sammantaget visar de morfologiska måtten hos fisk och snäckor att försöksdesign och vattenkemin i de olika försöksvattnen hade tillräckligt god status för att inte

orsaka en negativ påverkan på tillväxt. Överlevnaden hos zebrafiskar var 100% där ingen av de 120 fiskar som ingick i studien dog. För dammsnäckorna observerades en sämre överlevnad i GAC än i KV. Det var dock ingen statistisk skillnad mellan de tre olika avloppsvattengrupperna UT, OZ, och GAC, även om överlevnaden hos GAC var lägst. Samtidigt som överlevnaden i GAC var relativt låg så var alla andra kroppsmått hos dammsnäckorna opåverkade i jämförelse med alla andra grupper. När snäckor dör försämras vattenkvaliteten i burken ganska snabbt om inte den döda snäckan tas bort. Sannolikt påverkas vattnet mer negativt i de olika avloppsvattengrupperna i jämförelse med det helt rena kranvattnet och detta skulle kunna förklara skillnaden i överlevnad mellan KV och GAC. Möjligen skulle detta ha kunnat avhjälpas med ett högre genomflöde av exponeringsvattnet.

Reproduktion

Reproduktion är en viktig endpoint för att studera eventuell påverkan både på den enskilda organismen och på populationsnivå. I avloppsvattnet finns uppskattningsvis många tusen olika kemikalier. Många av dessa kan ha en direkt påverkan på hormonella system hos djur, så kallade endokrinstörande kemikalier, och därmed påverka både könsutveckling och könsmognad hos individen och därmed även reproduktion. Andra kemikalier i avloppsvattnet kan genom negativ hälsopåverkan indirekt påverka reproduktionen eller avkommans kvalitet. I denna studie skedde lek med äggläggning hos zebrafiskar i stort sett alla dagar hos alla ingående försöksvattnets replikat. Reproduktionen hos GAC beräknat på total äggläggning per hona över hela försöksperioden var ca. 40% lägre hos honor i GAC jämfört med UT, men ingen statistisk skillnad förelåg. Äggläggningen per dag varierade stort och stor variation förekom även mellan olika replikat, varför statistiska skillnader är svåra att påvisa. I en tidigare studie vid Lindholmens reningsverk (Norrtälje) med samma försöksupplägg som i denna studie sågs att OZ och GAC lade sammanlagt fler ägg än UT (NVAA, 2022). Även i en liknande studie från Knivsta reningsverk observerades förhöjd äggläggning i OZ jämfört med KV och UT (GAC utvärderades ej) (Pohl et al., 2018). Resultaten från denna studie med färre lagda ägg hos GAC överensstämmer därför inte med tidigare studier. En minskad äggproduktion kan vara svar på en försämrad vattenkvalitet och därmed försämrad levnadsmiljö för fiskarna. Resultaten efter avancerad rening med GAC i denna studie kan bero på en relativ suboptimal miljö för fisken, vilken resulterar i en försämrad reproduktion, jämfört med mer optimal vattenmiljö i de andra försöksvattnen. I studierna med dammsnäckor sågs inga skillnader i reproduktionsframgång mellan de olika grupperna. En effekt som noterades var att snäckorna i alla grupper reproducerade sig bättre och bättre för varje vecka. Möjligen kan detta till viss del bero på att vattentemperaturen var något högre den sista veckan, vilket skulle kunna påverka denna typ av respons.

Simbeteende zebrafisk

I denna studie observerades inga skillnader i uppmätt simdistans eller simbeteende hos fiskar i de olika försöksvattnen. I tidigare studier från Lindholmens reningsverk (NVAA, 2022) uppvisade både honor och hanar hos zebrafisk exponerade för OZ påverkan på simaktivitet. Honor och hanar skiljde sig i beteende över tid, där hanar genom hela analysperioden simmade kortare sträcka per tid än de andra försöksvattnen. Honor simmade kortare i början av perioden för att sedan simma längre vid slutet av perioden. Liknande effekter observerades även i zebrafisk exponerad för OZ vid studie som utfördes vid Knivsta reningsverk, där fiskar simmade kortare i början av försöksperioden (Pohl et al., 2018). Orsaken till det avvikande simbeteendet efter OZ-behandling i de två tidigare studierna är okänd. I denna studie uppvisade inte fisk i OZ någon skillnad i simbeteende jämfört med de andra försöksvattnen. Många kemikalier som finns i avloppsvattnet,

inklusive läkemedel, har i labförsök enskilt visat sig påverka beteende hos fisk. I huvudsak observeras dessa beteendeeffekter vid högre koncentrationer än de som är uppmätta för läkemedel i denna studie. I ett avloppsvatten förekommer däremot kemikalier samtidigt i en blandning varför den totala summan av alla ingående kemikalier skulle kunna påverka beteendet. I denna studie uppmättes en medelnedbrytning av analyserade läkemedel till ca. 95% för OZ, jämfört med ca. 70% för OZ vid studien från Lindholmens reningsverk och 77% vid Knivsta reningsverk. Vid jämförelse av totalhalt läkemedel efter OZ-behandling uppmättes i Rimbo 120 ng/L jämfört med 1421 ng/L i Knivsta- och 2858 ng/L i Lindholmen-studien. Ozon bygger på sönderbrytning av kemikalier till skillnad från uppfångst av kemikalier som GAC. Vid sönderbrytning av enstaka kemikalier kan det skapas nedbrytningsprodukter som är mer toxiska än själva modersubstansen. Kemiska analyser visar minskningen av modersubstansen men säger inget om vilka nedbrytningsprodukter som bildas. I OZ-behandlat vatten finns troligen rester av nedbrytningsprodukter av kemikalier, där det även finns risk för att vissa av dessa är giftiga och därmed skulle kunna påverka beteende hos organismer. Vår forskargrupp har i tidigare labförsök visat att giftigheten av läkemedlet karbamazepin ökar efter ozonbehandling beroende på bildning av specifika nedbrytningsprodukter av modersubstansen (Pohl et al., 2019). Den effektivare nedbrytningen av modersubstanser och dess nedbrytningsprodukter, samt den lägre uppmätta totalhalten av läkemedel i OZ i denna studie jämfört med de två tidigare studierna vid Lindholmen och Knivsta är en trolig förklaring till skillnaden i påverkan på beteende hos zebrafisk mellan studierna. Kemisk karakterisering av nedbrytningsprodukter vid ozon-behandling av vatten är viktigt för att säkerställa en icke-giftig miljö i recipienten till reningsverk. Framtida labförsök bör undersöka effekten av ozonering på både vanligt förekommande kemikalier i avloppsvatten och även ozon i sig, för att utröna ozonering som reningsmetod av kemikalier och därmed möjlig orsak till beteendeförändringar och även för dess möjliga miljöpåverkan.

Genuttryck zebrafisk och dammsnäcka

Mätning av genuttryck är en relativt effektiv metod som kan ge god förståelse för hur organismernas fysiologi har påverkats av en viss behandling. Metoden innebär att mätningar av ett stort antal fysiologiska mekanismer kan fås från varje individ och av ett väldigt litet vävnadsprov. Användandet av genuttryck förutsätter dock att metoden är ordentligt utprovad så att man säkerställer att det är rätt produkt som mäts och att mätningen av denna kan kopplas till en fysiologisk mekanism. Zebrafisken är en mycket vanlig testorganism inom forskningsvärlden och dess genuppsättning är helt kartlagd (sekvenserad). Vidare har ett mycket stort antal gener relevanta för toxisk påverkan undersökts både i zebrafisk och i närbesläktade arter. Detta gör att vi kan anse att resultaten för genuttryck på zebrafisk i denna rapport kan vara trovärdiga och kan ge en bra vägledning om eventuell påverkan. Dammsnäckorna har inte samma bakomliggande förutsättningar. Flera av generna i undersökningen är tidigare relativt etablerade medan andra har tagits fram för denna undersökning baserat på jämförelser av likheter med andra närbesläktade arter. Alla de undersökta generna har klarat de grundläggande kriterierna för säkerställande vid utveckling av denna typ av metod. Däremot är inte kunskapen om fysiologin lika välstuderad hos denna art. Det är därmed svårare att säkert bedöma betydelsen dessa mätningar har i denna studie. Alltför stor vikt ska därför inte fästas i eventuella skillnader i genuttryck mellan snäckorna i de olika vattengrupperna utan de ska ses som en indikation på att en förändring skett.

Vad gäller zebrafiskarna i denna studie så var det skillnader i uttryck mellan honor och hanar för alla de undersökta generna utom för Ar och referensgenen Rpl13. Detta är inte konstigt då fysiologin mellan könen skiljer sig. Exempelvis sågs ca 5 000 gånger högre uttryck av vtg1 i honor jämfört med hanar i KV-gruppen. Det är vanligt att man ser stora könsskillnader i vtg1, eller motsvarande protein vitellogenin, då detta behövs för normal äggproduktion och därmed inte

normalt finns i stora mängder hos hanar. Det var däremot inga skillnader i uttryck av de flesta analyserade genuttryck i jämförelser mellan fiskarna från de olika vattengrupperna. Detta ger en bild av att alla de olika avloppsvattnen har en bra kvalitet för fiskhälsa. Det enda genuttryck där skillnader sågs mellan de testade behandlade avloppsvattnen var för androgenreceptorn (Ar) där uttrycket var lägre i GAC-gruppen i jämförelse med UT- och KV-grupperna, dock inte jämfört med OZ gruppen. Denna effekt är svår att förklara och relatera till uppmätta läkemedelshalter, speciellt då KV har lägre halter och UT har högre halter än GAC i denna studie. Ett annat genuttryck där statistiska skillnader sågs var för metallothionein (MT), som var högre uttryckt i KV-gruppen jämfört med de andra grupperna. Detta har ingen påverkan i tolkningen av kvaliteten i de olika avloppsvattnen men ger upphov till funderingar för innehållet av metaller i kranvattnet. MT är ett protein som är inblandat i regleringen av metaller i kroppen. I regel kan man se högre koncentrationer av detta protein eller ett högre uttryck av genen för detta, MT, vid exponering av höga koncentrationer metaller. Vi har i en liknande studie med motsvarande experimentell design i Lindholmens reningsverk också sett detta mönster med högre uttryck av MT i fiskar som exponerats för kranvatten (NVAA, 2022). För snäckorna sågs inga skillnader i uttryck mellan vattengrupperna. Vi kunde således inte se samma höga uttryck av MT hos snäckorna i KV-gruppen som sågs hos zebrafiskarna. Det var heller inga skillnader i uttrycket av EF mellan snäckor i de olika vattengrupperna och därmed kunde det visas att denna gen var lämplig som referensgen.

Sammanfattande bedömning

För miljöriskbedömning avseende eventuell påverkan av läkemedel på vattenlevande organismer i recipienten förekommer flera olika bedömningsmetoder. Dessa grundas i huvudsak på uppmätta eller beräknade halter för enskilda ämnen i recipienten i relation till rapporterad toxicitet, t ex riskkvoter där uppmätt halt divideras med den uppsatta gränsvärden för ämnet eller den uppskattade nolleffekt-koncentrationen (PNEC). Olika aktörer använder olika modeller för prioriteringar inom miljöriskbedömning av läkemedel. Inom EU:s Vattendirektiv finns ett fåtal läkemedel med föreslagna gränsvärden upptagna på bevakningslistan för övervakning. Bedömningsgrunderna enligt vattendirektivet som är införda i Havs- och vattenmyndighetens författningssamling (HVMFS 2019) har juridisk tyngd varför överskridande av halter kräver åtgärder. De läkemedel som är upptagna som särskilt förorenande ämnen (SFÄ) i nuvarande HVMFS (HVMFS, 2019) är antibiotikum ciprofloxacin och smärtstillande diklofenak, samt östrogenhormonerna 17- α -etinylostradiol (EE2) och 17- β -östradiol (E2). Gränsvärdena för ciprofloxacin och diklofenak i inlandsytvattnen är 100 ng/L. I denna studie uppmättes låga ng/L-halter för ciprofloxacin oavsett reningsmetod. För diklofenak uppmättes halter i UT vid en medelkoncentration av 373 ng/L. Inberäknat en utspädningsgrad av ca. 10-50 gånger till recipienten finns det risk att diklofenak kan överskrida gränsvärdet i recipienten och uppföljande analyser bör kontinuerligt göras för att säkerställa koncentrationen i utloppsvatten och recipient. I denna studie uppvisar både OZ och GAC hög reningseffektivitet av läkemedel (>95%) och endast ett fåtal läkemedel uppmättes i relativt låg halt efter avancerad rening. Inget av dessa läkemedel överskred föreslagna PNEC-värden (**Appendix B-Tabell B:1**). För vissa läkemedel uppmätta i UT i denna studie indikerar PNEC-värdet inberäknat utspädningsfaktorn att det kan föreligga en risk för negativ påverkan på organismer i recipienten, av ex. citalopram, diklofenak, furosemid, karbamazepin, sertralin, sulfametoxazol och venlafaxin. Flertalet av de läkemedel som uppmättes i denna studie tillhör samma terapeutiska ATC-grupp och har i vissa fall samma verkningsmekanism. Av de ovan nämnda läkemedlen är exempelvis citalopram, sertralin och venlafaxin alla s.k. antidepressiva SSRI-preparat (selective serotonin re-uptake inhibitors) som ökar halten av serotonin i hjärnan. Riskbedömning för recipienten bör då baseras på summa-koncentration av verkningslika substanser snarare än på halter av individuella läkemedel.

Sammantaget ses generellt vaga resultat avseende biologiska effekter i denna studie, både gällande negativa effekter av konventionell rening och positiva effekter av avancerad rening med OZ och GAC. Vid de tidigare studierna på Lindholmens och Knivsta reningsverk observerades effekter av ozon-behandlat avloppsvatten på simbeteende hos zebrafisk vilket inte gjordes i denna studie. Förklaringen är troligen den effektivare ozon-reningen och lägre totalhalten av läkemedel i OZ i denna studie. Totalhalten av läkemedel i OZ i denna studie var 10-20 gånger lägre än i Lindholmen och Knivsta under försöksperioden för fisk och snäckor. Även totalhalten av läkemedel i UT var lägre i Rimbo jämfört med Lindholmen och Knivsta, med uppmätta halter av respektive 3 000, 8 000 och 6 400 ng/L. Vid jämförelse av utförda humana cellaktivitetstester vid Rimbo och Lindholmens reningsverk visar resultaten att cellaktiviteter är generellt betydligt lägre i Rimbo. I vissa fall uppmättes 100 gånger högre cellaktivitet vid Lindholmen, vilket kan bero på de generellt högre koncentrationerna av läkemedel som uppmättes, samt även av andra ingående kemikalier i vattnen. Sammantaget är den effektiva reningen med lägre totalhalterna en trolig förklaring till att inga betydande biologiska effekter kunde påvisas i fisk och snäckor i denna studie, vilket även stöds av lägre aktivitet i de utförda celltesterna. Givet utspädningsfaktor till recipienten i Rimbo kan det antas att den akuta miljörisken för vattenlevande organismer är låg, med undantag för specifika läkemedel.

Med den kontinuerliga ökningen av läkemedelskonsumtion i samhället och därmed den kontinuerliga tillförseln av läkemedel till miljön är framförallt den kroniska exponeringen av hög betydelse. De kemiska analyserna under fisk- och snäckstudien baseras på mätning av 24 läkemedel av de mer än 1 000 aktiva läkemedelssubstanser som används i Sverige. I denna studie ges inga svar på långtidseffekter av kronisk exponering för blandningar av läkemedel och andra kemikalier i avloppsvatten. Populationer av vattenlevande organismer som lever hela eller delar av sitt liv i recipienten till reningsverk är kroniskt exponerade varför långtidseffekter är högst relevanta att studera. Vissa läkemedel och andra kemikalier kan dessutom bioackumuleras i vävnad hos organismer vilket kan ge negativa hälsoeffekter senare i livet. Återkommande studier av läkemedelsinnehåll, både i vatten och vattenlevande organismer, tillsammans med mätning av hälsoparametrar i vattenlevande organismer är av hög relevans. Detta är av speciell vikt vid införande av avancerade reningstekniker för läkemedelsreducering vid Rimbo ARV för att kunna följa upp vattenförbättrande åtgärder.

Slutsatser:

- De biologiska undersökningarna visade att både fiskar och snäckor hade god hälsa och normal reproduktion i UT och att detta inte förändrades med avancerad rening i form av OZ eller GAC. Det fanns dock indikationer på försämrad reproduktion hos zebrafiskar i GAC-behandlat utgående avloppsvatten.
- De uppmätta läkemedlen under försöksperioden med fisk och snäckor reduceras i stor grad av avancerad rening med både OZ och GAC.
- Hos zebrafisk påvisades ett högre uttryck av metallmetabolism i KV. Samma resultat erhöles vid studierna på Lindholmens reningsverk där samma ursprung av vatten används. Fortsatta undersökningar av kranvatten rekommenderas för att säkerställa orsaksämnen.
- För flertalet läkemedel uppmätta i nuvarande utgående avloppsvatten (UT) indikerar PNEC-värdet inberäknat utspädningsfaktorn att det kan föreligga risk för långsiktig negativ påverkan på vattenlevande organismer i recipienten. Denna risk minskar dock betydligt med tillägg av avancerad rening i form av OZ eller GAC.

Delstudie 3 – Läkemedelsexponering i Microcosmer

Inledning

Denna delstudie syftar till att studera upptag av några vanligt förekommande läkemedel och deras eventuella akuta effekter vid exponering för höga koncentrationer. Läkemedlen valdes för att få ett spektrum av de som oftast analyserats i utsläppet från Rimbo ARV och representerar olika typer av humana terapier. Karbamazepin (antiepileptisk), citalopram (antidepressiv), diklofenak (inflammationshämmande), metoprolol (blodtryckssänkande), sertralin (antidepressiv) och venflaxin (antidepressiv) doserades i två orealistiskt höga engångsdoser i olika kärl för att få en bild av hur olika läkemedel ackumuleras och påverkar de vattenlevande organismerna i ett akvatiskt system under en månad. I en sådan studie är det önskvärt att flera olika organismgrupper representerande olika delar av det akvatiska ekosystemet studeras. Djur som normalt finns i Vallbyån och sjöarna nedströms representerade ordningarna ringmask (*Tubifex*), insekter (fjädermygglarv), kräftdjur (hoppkräfta och sötvattengräsugga) och amfibie (yngel av vanlig groda) ingick i försöken. De variabler som studerades var överlevnad, beteendeförändringar och för kräftdjuren även en indikation på hur väl de två arterna reproducerat sig alternativt klonat sig i de olika lösningarna.

Metod

Följande akvatiska sötvattenorganismer representerande djurgrupper som finns i Vallbyån har nyttjats för studier av upptag och akuta effekter av sju olika läkemedel. Försöken har genomförts under 28 dygn. (Tabell 24).

Tabell 24 Undersökta organismer i microcosmsystem.

Organism	Födoval
Tubifex, släkte ringmask (<i>Oligochaeta</i>), art (<i>Tubifex</i> sp)	Rörbyggande vattenfiltrerare
Chironomid släkte fjädermygglarv (Chironomid) art (<i>Chironomus</i> sp)	Växtdelar och ej nedbrutet organiskt material (Herbivor/detrivor)
Snäcka (<i>Lymnea stagnalis</i>)	Herbivor/betare
Hoppkräfta (<i>Daphnia magna</i>)	Herbivor
Sötvattengräsugga (<i>Asellus aquaticus</i>)	Detrivor
Yngel av vanlig groda (<i>Rana temporaria</i>)	Herbivor/detrivor/carnivor
Husbyggande sländlarver (<i>Trichoptera</i> sp)	Carnivor

Insamling av grodyngel, vattengräsuggor, snäckor och sländlarver från bäckar och skogsvatten utan tillförsel av enskilda avlopp skedde 15-16/5 2022. Samarbetspartner GS Ekotox bistod med startkulturer av kräftdjur (*Daphnia magna*). *Tubifex* och chironomider köptes i zooaffär som levande foder för akvariefiskar.

Försöksuppställning

De olika organismerna fördelades på olika 3 liters glasbägare med spädvatten för kontroll innan försöksstart. Spädvattnet bestod av 50% naturvatten från den lokal djuren var insamlade vid och 50% av det spädmedium som används i ekotoxikologiska försök i enlighet med OECD guideline 229 (OECD, 2012). Försöken genomfördes i ett tempererat utrymme med 13 °C från start som succesivt höjdes till 19 °C efter 4 veckors exponering. För att efterlikna dagsljus nyttjades Grolux® och Flora® lysrör med 12:12 h ljusregim som ljuskällor. 20 små plantor av flytbladsväxten *Lemna minor* tillsattes till varje bägare för att ge betare som lever på fastsittande alger lite extra mat samt bidra till syresättningen och NH₄/NO₂/NO₃ reduktion. Växternas tillväxt ger även en indikation om någon fytotoxisk påverkan av läkemedel kan detekteras. Lösningarna luftades konstant via glaskapillärer och de abiotiska variablerna pH, NH₄ och NO₂ mättes regelbundet. När organismerna aklimatiserats under en vecka startade exponeringen för läkemedel i två bägare: Hög dos och Låg dos samt en kontroll som bestod av rent spädvatten med dimetylsulfoxid (DMSO) motsvarande den högsta totala koncentrationen tillsatt till varje bägare samt en kontroll med rent vatten. De exakta mängderna framgår av **Tabell 25**. Försöken startade den 30 maj och avslutades 27-28 juni 2022. De olika läkemedlen löstes i dimetylsulfoxid (DMSO) och doserades vid ett tillfälle till respektive glasbägare. Sammanlagt bestod försöksdesignen av 4 olika försöksbägare. DMSO bedöms vara det skonsammaste lösningsmedlet för akvatiska organismer.

Till varje glasbägare tillsattes 3 snäckor, 5 sländlarver, 15 grodyngel, 20 större exemplar av sötvattengråsuggor och 8 vuxna dafniehonor tillsammans med 20 nyfödda avkommor. För att få en viss reduktion av kvävehaltiga exkretionsprodukter från djuren tillsattes 10 plantor av flytbladsväxten liten andmat (*Lemna minor*) vilken även fungerar som en fytotoxisk indikator om läkemedel i de tillsatta koncentrationerna påverkar tillväxten hos en flytbladsväxt.

Organismerna påverkar varandra och en viss predation kan uppstå när så många djur vistas i en relativt liten volym som 3 liter. Grodynglen visade en god aptit på att konsumera både tubifex och chironomider, så grodynglen lyftes ur och placerades tillsammans i 4 egna mindre glasbägare med samma exponeringsförhållanden som tidigare. Grodynglen betade även på snäckornas skal och på husbyggarnas rörbyggen vilket skadade vissa individer.

Undersökta läkemedel

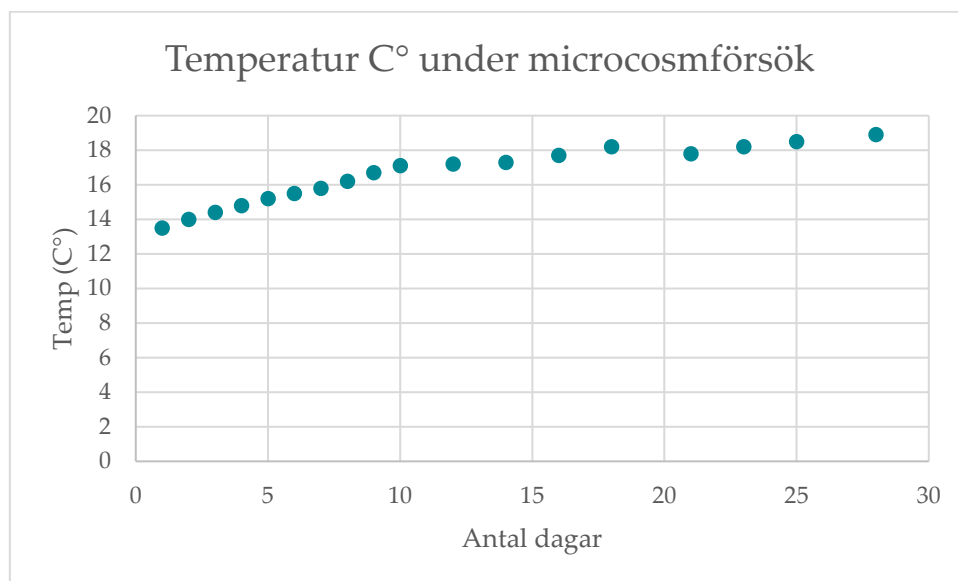
Stamlösningar bereddades genom att läkemedel av p.a. kvalitet tillsattes till koncentrerad DMSO. Doserna valdes med utgångspunkt från de koncentrationer som tidigare uppmätts i recipienten och räknades upp med 10 och 100 gånger. De orealistiskt höga doserna valdes för att erhålla en snabb kraftig bioackumulering och för att kompensera för den relativt korta exponeringstiden (28 dygn). Dosering av läkemedel skedde endast en gång för att få en indikation hur en engångsdos fördelas mellan olika organismer och möjlighet att bestämma bioackumuleringsfaktorn av en given mängd läkemedel.

Tabell 25 Undersökta läkemedel och de nominella koncentrationerna i bägarna vid försöksstart.

Substans	Stamlösning (µg/µl)	Låg dos (µg/L)	Hög dos (µg/L)	Tillsatt mängd, Låg (µg)	Tillsatt mängd, Hög (µg)
Karbamazepin	2,1	10	100	30	300
Citalopram	2,2	22	220	66	660
Diklofenak	4,1	150	1500	450	4500
Metoprolol	4,1	150	1500	540	5400
Sertralin	0,6	6	60	18	180
Venflaxin	0,64	19	190	57	570

Försöksbetingelser

Dagliga kontroller av djurens status och regelbundna mätningar av vattenkemi utfördes i de olika glasbägarna med läkemedel och kontroller. Temperaturen under försöksperioden framgår av **Figur 2931**. Glasbägarna genomluftades under försöksperioden där de uppmätta syrekoncentrationerna översteg 70% i alla bägare vid alla mättillfällen. Uppmätning av pH-värdet visade 7,6-7,8 vid försöksstart. På grund av koldioxiden som frigörs vid andningen sjunker pH-värdet sakta ned mot 5,8 som är kolsyrans pKa-värde där jämvikt sker. Ingen lösning uppvisade ett pH-värde under 7 vid någon mätning. Exkretionsprodukterna analyserat som NH₄ och NO₂ steg sakta under försökets gång. Under försökens 3 första veckor uppmättes 0,1-0,25 mg/l NH₄ i testlösningarna och NO₂ i intervallet 0,025-0,1 mg/l. I slutfasen av försöket steg NH₄ till 1,0 mg/l och NO₂ till 0,6 mg/l. Ingen dödlighet eller avvikande beteende registrerades hos någon försöksgrupp så organismerna tycks inte akut påverkade av de något förhöjda NH₄/NO₂-värdena.



Figur 29 Temperatur (C°) under försöket.

Resultat

Exponeringens påverkan på de akvatiska organismerna

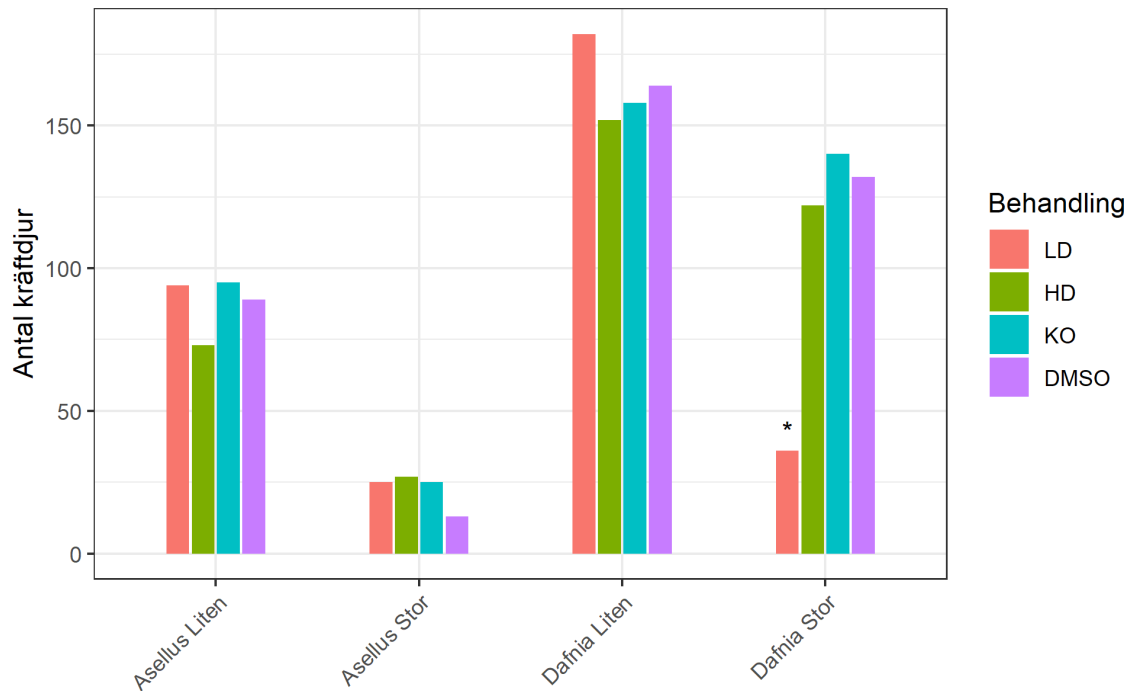
Ringmaskarna (Tubifex) utvecklades väl när de flyttats till egen glasbägare och slapp predation av grodyngel. Efter 28 dygn samlades de in och placerades omedelbart i frys. Detta gällde även fjädermygglarverna (Chironomider) vars numerär minskade rätt markant på grund av predation innan de flyttades till samma glasbägare som tubifex. Grodynglen växte och utvecklade benanlag under försökets gång. Alla tillsatta yngel överlevde 28 dagar och samlades in och lades i frys för de kommande analyserna. Ingen individ av grodyngel uppvisade någon avvikande morfologi eller beteendeförändring. Hoppkräftorna (Dafnia) tillväxte och förökade sig väl i alla undersökta doser. Djur för analys filtrerades av efter 14 och 28 dygn. Alla filtrerade dafnier räknades och samlades ihop till ett prov/koncentration som frystes ned omedelbart för kommande analyser. Sötvattengråsuggor (Asellus), uppvisade en positiv tillväxt liksom en god produktion av nauplier (avkomma) i alla glasbägare. Grodynglen prederade även på snäckor och rörbyggande sländlarver så vid försökens avslutande var det så få individer kvar att det var en otillräcklig mängd för analyser av läkemedel.

Reproduktion hos kräftdjur

I **Figur 30** redovisas antalet kräftdjur som räknats vid exponeringens slut. Dafnierna är uppdelade i två grupper med stora och små individer. De stora representerar avkomma från de första 20 individerna som tillsattes vid försöksstart, vilka benämns generation F1. Gruppen små dafnier representerar den andra generationen som betecknas F2 vilka fötts under försökets gång. I renvattenkontrollen och kontrollen med den högsta dosen DMSO producerades 140 respektive 132 ungar i generation F1. I högdosen med läkemedel producerades 122 ungar under försöket, vilket är i paritet med de undersökta kontrollerna. Det försöksfel som uppstod när en liten vattensalamander av misstag kom med i lågdosbägaren gör att reproduktionsvariabeln inte är relevant för jämförelser av antalet dafnieungar i lågdos.

Sötvattengråsuggorna växer inte lika fort som dafnier men de fortplantar sig relativt snabbt och de små representerar den första generationen (F1) som fötts under försöken. De har en längre generationscykel än dafnia så ingen andra generationens djur hade fötts vid försöken avslutande efter 28 dygn.

Av de 25 halvstora sötvattengråsuggorna som tillsattes till de olika bägarna vid försöksstart kunde i stort sett alla återfinnas vid brytningen av försöket. De producerade i snitt 81 avkomma per grupp där djur som exponerats för blandningar eller kontroller bedömdes producera likvärdiga antal avkommor.

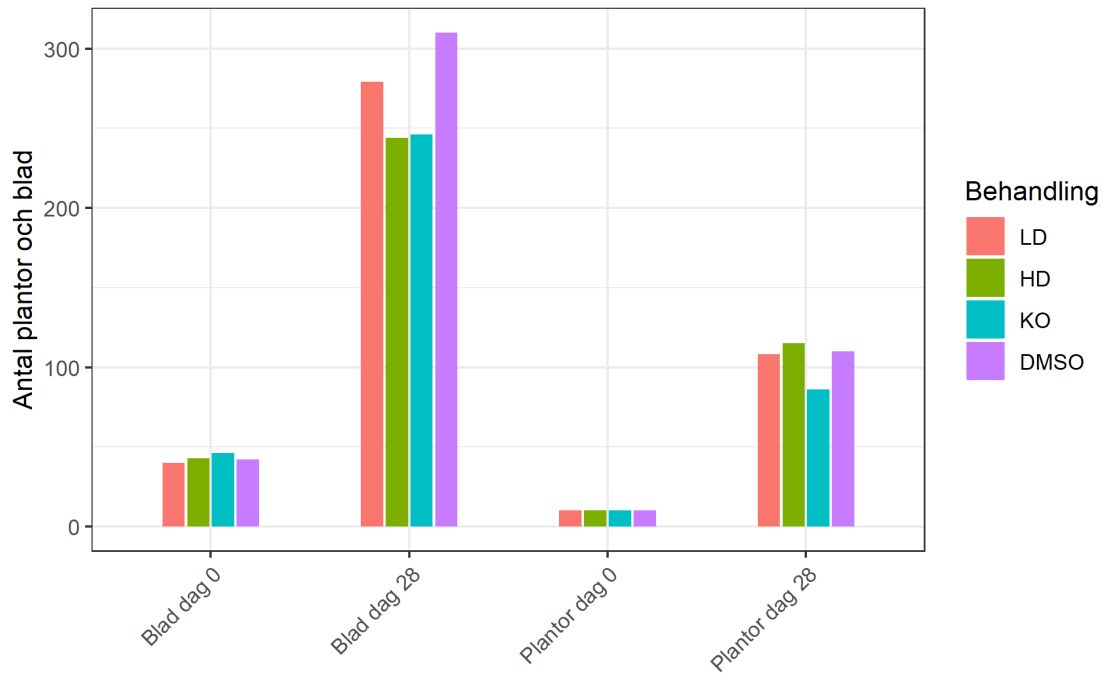


Figur 30 Antal kräftdjur vid exponeringens slut. HD=hög dos, LD=låg dos, DMSO=endast lösningsmedel, KO=kontroll. *lågt antal pga predation av vattensalamander.

Fytotoxicitet

Tillväxten hos de plantor av andmat (*Lemna minor*) som tillsattes vid försöksstarten framgår av **Figur 33**. Plantorna gör att mängden exkretionsprodukter, främst ammoniak, reduceras i systemen och minskar risken för försöksfel orsakade av abiotiska faktorer.

De 10 plantor som försöken startade med hade delat sig och i snitt utvecklade 105 plantor per bägare. Tillsatsen av lösningsmedlet DMSO med eller utan läkemedel stimulerade tillväxten och mellan 108-115 plantor nybildades mot 86 plantor i rent vatten. Antalet blad per bägare var i medeltal 43 vid försökstart. Vid försökens slut efter 28 dygn uppgick antalet i medeltal till 254 blad per bägare. Även för denna variabel stimulerades tillväxten av DMSO, och kontrollen och Hög dosen det lägsta antalet nybildade plantor och blad som räknas vid exponeringens slut.



Figur 31 Tillväxt hos Lemna minor. HD=hög dos, LD=låg dos. DMSO=endast lösningsmedel, KO=kontroll.

Analys av läkemedel

Grodorna uppvisade en jämn tillväxt, lågdosen (LD) avviker något från medelvärdet på 2,4 g (Tabell 26). Sötvattengräsuggorna uppvisar god tillväxt och endast i DMSO-kontrollen fanns färre djur. Med undantag för LD så var det god tillväxt på dafnierna och det syns även i avsnittet om reproduktion under försöksperioden. Tillväxten hos exponerad tubifex var god och nära nog likvärdig eller något bättre än för kontrollgruppen.

Tabell 26 Mängden organismer g vv /glasbägare (% av kontroll inom parentes) som samlades in för läkemedelsanalyser vid exponeringens slut efter 28 dygn. HD=hög dos, LD=låg dos, DMSO=endast lösningsmedel, KO=kontroll. KI= konfidensintervall, beräknat för medelvärdet.

Art	HD	LD	DMSO	KO	Medel (g)	95% KI
Groda	2,49 (104)	2,09 (87)	2,65 (111)	2,39	2,40	0,38
Asellus	2,15 (139)	1,57 (101)	0,85 (55)	1,55	1,53	0,85
Dafnia	0,69 (164)	(0,11)*	0,54 (129)	0,42	0,55	0,21
Tubifex	2,22 (88)	3,27 (129)	2,32 (92)	2,53	2,58	0,75

*av misstag samlades en liten vattensalamander in med de andra djuren. Denna individ gömde sig väldigt effektivt och upptäcktes först vid försökens avslutning. Salamandrar är väldigt förtjusta i zooplankton, vilket är förklaringen till de relativt få dafnier som kunde provtas från denna dos.

I **Tabell 27** och **Tabell 28** redovisas koncentrationen av läkemedel som analyserades i respektive organismgrupp efter 28 dygns exponering. De tillsatta mängderna till vattenfasen skiljer sig mellan läkemedlen, så mängderna visar mer på skillnaden i upptag av olika läkemedel i olika organismgrupper än skillnader mellan olika läkemedel.

Tabell 27 Analyserade koncentrationer (ng/g vv) av läkemedel i akvatiska organismer som vistats 28 dygn i Hög dos.

Art	Karbamazepin	Citalopram	Diklofenak	Metoprolol	Sertralin	Venlafaxin
Chironomid	256	1170	9920	464	1104	110
Tubifex	184	411	627	196	1960	104
Dafnia	285	3310	2450	3774	2527	649
Asellus	263	1050	1140	1315	1403	324
Groda	147	2480	930	4573	7674	775

Tabell 28 Analyserade koncentrationer (ng/g vv) av läkemedel i akvatiska organismer som vistats 28 dygn i Låg dos. Koncentrationen i lågdosen är en tiondel av den i högdosen.

Art	Karbamazepin	Citalopram	Diklofenak	Metoprolol	Sertralin	Venlafaxin
Chironomid	122	141	704	150	25	26
Tubifex	28	30	24	16	280	2,8
Dafnia	42	216	163	96	145	1,1
Asellus	106	327	120	448	240	142
Groda	55	930	71	2480	1162	302

Alla de undersökta läkemedlen kunde återfinnas i detekterbara koncentrationer i de olika akvatiska organismerna som exponerats för läkemedel i både hög och låg dos. Eftersom vattenkoncentrationen varierade för de studerade läkemedlen hänvisas till **Tabell 30** och **Tabell 31** där bioackumuleringsfaktorerna (BCF) för de olika läkemedlen redovisas.

Några läkemedel var detekterbara i väldigt låga koncentrationer i djuren som ingick i kontrollgruppen (**Tabell 29**). Citalopram och metoprolol detekteras i *Dafnia*, *Asellus* och grodyngel. De sistnämnda arterna är insamlade i naturen där spårämngder kan finnas i vattensamlingarna. De högsta detekterade mängderna av citalopram och metoprolol i grodyngel utgör 1,3 respektive 0,9% av mängden analyserad i djuren som vistats i lågdosgruppen. Inget tydligt samband eller mönster som indikerar bakgrundskontaminering syns för övriga läkemedel eller organismgrupper.

Tabell 29 Bakgrundskoncentrationer (ng/g våtvikt) av läkemedel analyserade i djuren som ingick i kontrollgruppen.

Art	Karbamazepin	Citalopram	Diklofenak	Metoprolol	Sertralin	Venlafaxin
Chironomid	<	<	<	<	<	<
Tubifex	<	<	<	<	4,6	<
Dafnia	<	6,7	3,3	5,9	<	1
Asellus	<	11	<	4,9	<	<
Groda	<	12	<	23	4,3	3,2

< ej detekterbara koncentrationer

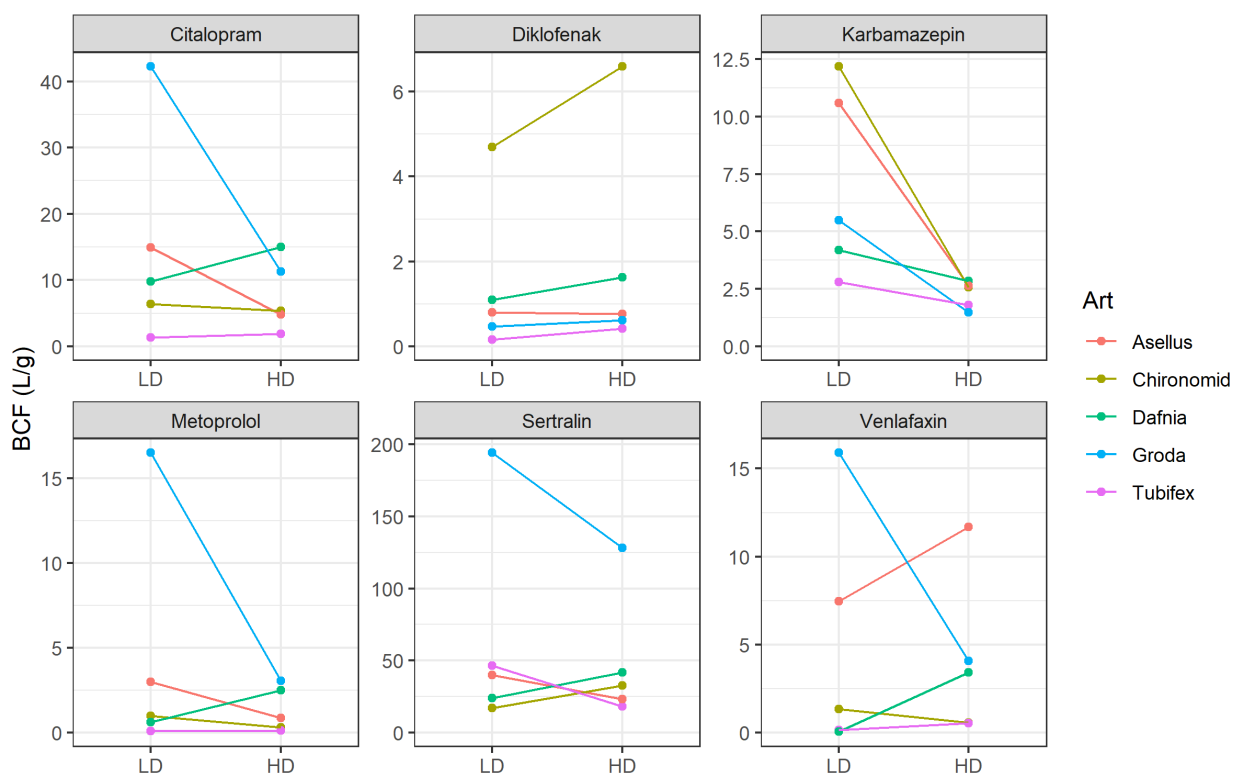
Biokoncentrationsfaktorer

Biokoncentrationsfaktorer för upptag av läkemedel i de olika organismerna exponerade för hög dos och låg dos beräknades på analyserad mängd i samlingsprov (ng/g vv) av respektive art dividerat med ursprungskoncentrationen tillsatt som engångsdos i vattenfasen (ng/L) (**Figur 32**).

Eftersom alla analyserade organismer exponerats under 28 dygn i samma glasbägare så är koncentrationen av läkemedel de utsatts för densamma för alla olika djur i försöket. Beroende på olika kemisk-fysikaliska egenskaper hos läkemedel anrikas de i olika mängd i de undersökta akvatiska organismerna. Den faktor som bedöms styra upptaget mest är fettlöslighet (lipofilitet) mätt som $\log K_{ow}$ (fördelningen mellan vatten/oktanol) av respektive läkemedel. Även pK_a -värdet kan vara av betydelse när det gäller substanser som är syror alternativt baser. Siffrorna till grund för **Figur 32** och $\log K_{ow}$ -värden finns i **Appendix C – Tabell C:1**.

Om man studerar ovanstående tabeller med utgångspunkt på specifika läkemedel så visar de två doserna av karbamazepin en spridning i BCF-värden på mellan 1.5 och 12 ggr högre koncentration i organismer jämfört med omgivande medium. Chironomider, Dafnia och Asellus uppvisar likvärdiga BCF-värden, i spannet 2,56-2,85 i högdosen. Spridningen är större i den lägre dosen där BCF på 12 respektive 10 beräknades för Asellus och Dafnia. Eftersom mängden dafnia som kunde analyseras var liten i förhållande till andra djurgrupper beroende på trolig predation av salamander bör värdet tolkas med försiktighet. Substansen har lågt $\log K_{ow}$ -värde vilket indikerar att den inte är speciellt fettlöslig och binds i mindre utsträckning till feta strukturer. Övriga egenskaper hos läkemedlet indikerar ett lågt upptag i de vattenlevande organismer som ingått i denna studie. Citalopram har betydligt högre $\log K_{ow}$ (3,74) och där biokoncentrationsfaktorn i kräftdjur och grodyngel i låg dos varierar mellan 1,8 för tubifex och 15 för dafnier. BCF i lågdosen visade på ett annat mönster med högre ackumulering i fyra av fem organismgrupper jämfört med högdosen, upp till 42 gånger för grodynglen jämfört med 11 i högdosen. I högdosen har troligen inte steady-state inträtt än pga den korta exponeringstiden. Detta läkemedel kan befaras anrikas i groddjur och kräftdjur om det utgående avloppsvattnet innehåller detekterbara koncentrationer. Diklofenak anrikas i mindre mängd i de olika organismerna och endast chironomider (fjädermygglarver) och kräftdjuret Dafnia uppvisar högre BCF-värden mellan 1,6 och 6,6. I resterande grupper beräknades BCF <1, dvs ingen bioackumulering sker. Eftersom diklofenak är en syra så är pH-värdet i recipienten en viktig faktor att mäta eftersom det avgör hur molekylen beter sig. Detta är jämförbart med ammonium/ammoniak jämvikten där jonformen avgör hur giftig molekylen är för det akvatiska livet. Metoprolol anrikas inte i tubifex (ringmaskar), chironomider eller i Aselleus (sötvattengräsugga) där lägre koncentration analyseras i djuren än i

omgivande medium. För övriga organismer dafnia och groda i högdosen och Asellus och groda i låg-dosen anrikas metoprolol i intermediär utsträckning mellan 2,5-3 gånger. Undantaget är grodynglen som vistats i låg dos där hela 16 gånger högre koncentration analyserades i organismerna jämfört med koncentrationen i vattenfasen. Sertralin som är en kraftigt lipofil substans anrikades i högst utsträckning av alla undersökta läkemedel. Detta var förväntat och här doserades låga doser till vattenfasen jämfört med tex. diklofenak och metoprolol. BCF-värden för tubifex, chironomider, dafnier och Asellus visade mellan 17-47 gångers anrikning i båda koncentrationerna. För grodynglen översteg BCF 100 gångers anrikning i båda testade läkemedelskoncentrationerna, med 128 och 194 gånger högre anrikning jämfört med omgivande medium. Venflaxin uppvisar en låg till intermediär anrikning i de akvatiska organismerna chironomid, tubifex och dafnia exponerade för låg dos. Grodyngel och Asellus i båda doserna ackumulerar mest substans och BCF-värden beräknades till mellan 4 och 16.



Figur 32 Beräknade biokonzentrationsfaktorer (BCF) baserat på den analyserade mängden i organismerna (ng/g våtvikt) dividerat med dosen läkemedel tillsatt till vattenfasen (ng/L), efter 28 dygns exponering för hög och låg dos.

Biokonzentrationsfaktorerna varierar en del mellan hög dos och låg dos. Generellt är biokonzentrationsfaktorn lägre än förväntat i högdosen eftersom läkemedelskoncentrationerna i vattenfasen är 10 gånger högre i denna dos. Detta kan ha flera förklaringar men troligt är att koncentrationen läkemedel sjunkit i försökskärnen under försöksperioden samt att ett stabilt jämviktsförhållande (Steady-state) inte har inträtt i högdosen efter den relativt korta exponeringstiden på 28 dygn.

I ett försök att bedöma vilka mängder läkemedel de undersökta organismerna anrikas, har en ranking genomförts för att få en bild av hur fördelningen ser ut mellan olika grupper (**Tabell 30**).

Tabell 30 Upptagsmönster hos de olika organismerna genom en ranking av BCF-värdena (Hög dos, HD och Låg dos, LD) där siffran 1 är den organism med lägsta anrikningen av aktuell substans och siffran 5 är den organism där högst koncentration har analyserats.

Art	Karbamazepin	Citalopram	Diklofenak	Metoprolol	Sertralin	Venlafaxin
Chironomid	HD=3, LD=3	HD=2, LD=2	HD=5, LD=4	HD=2, LD=2	HD=1, LD=1	HD=2, LD=3
Tubifex	HD=1, LD=1	HD=1, LD=1	HD=1, LD=1	HD=1, LD=1	HD=2, LD=2	HD=1, LD=1
Dafnia	HD=5, LD=5	HD=5, LD=4	HD=4, LD=5	HD=4, LD=3	HD=4, LD=4	HD=4, LD=2
Asellus	HD=4, LD=4	HD=3, LD=3	HD=3, LD=3	HD=3, LD=4	HD=3, LD=3	HD=3, LD=4
Groda	HD=2, LD=2	HD=4, LD=5	HD=2, LD=2	HD=5, LD=5	HD=5, LD=5	HD=5, LD=5

Ringmasken tubifex är den undersökta organism som anrikas minst läkemedel av de testade organismerna vilket gäller för båda doserna. Maskarna innehåller mest vatten och har lite feta strukturer. Chironomiderna (fjädermygglarver) uppvisar ett högre upptag av läkemedel jämfört med maskarna, framför allt diklofenak där den högsta eller näst högsta mängden kunde detekteras för den djurgruppen. För övriga läkemedel hamnar mängderna på en intermediär nivå för denna djurgrupp. De två undersökta kräftdjuren dafnia och sötvattengråsugga skiljer sig när man studerar rankingen av BCF-värdena. Asellus hamnar i snitt på 3,33 poäng jämfört med 4,08 för dafnia. Dafnian får den högsta poängen (5) vid fyra fall och det näst högsta poängen 4 i 6 fall. I grodynglen analyseras de högsta koncentrationerna av metoprolol, sertralin och venlafaxin, det gäller för de båda undersökta doserna. Även citalopram anrikas till höga koncentrationer i de båda undersökta doserna. Däremot karbamazepin och diklofenak koncentreras i betydligt lägre mängd än i tex. Dafnia och chironomider.

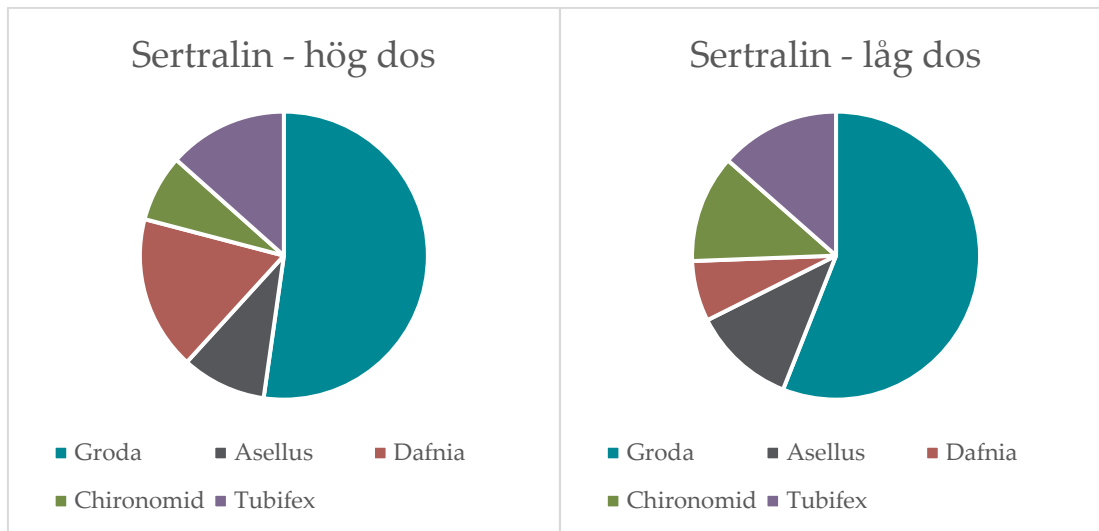
Doseringen av läkemedel skedde som en engångsdos till glasbägarna. Den ackumulerade mängden i djuren kan därmed jämföras med den totala mängden som tillsats av respektive läkemedel. I **Tabell 31** redovisas den procentuella fördelningen av de sex olika läkemedlen baserat på mängden återfunnen i respektive prov som analyserats.

Tabell 31 Upptag i organismer % av tillsatt mängd läkemedel i Hög dos under 28 dygn.

Substans	Dafnia	Tubifex	Groda	Asellus	Chironomid	Mängd μg	% av tillsatt dos
Karbamazepin	0,65	1,3	1,22	1,88	0,20	300	5,25
Citalopram	3,2	0,4	2,4	1,05	1,14	660	8,19
Diklofenak	1,93	0,5	0,73	0,88	0,72	4500	4,76
Metoprolol	2,8	0,14	3,41	0,96	0,34	4500	0,17
Sertralin	12,1	9,4	36,5	6,65	5,25	180	70
Venlafaxin	2,67	0,42	3,1	1,32	0,45	570	1,39

Mängden substans som ackumulerades i de olika organismerna i förhållande till tillsatt mängd varierade stort. Vissa läkemedel är vattenlösliga tex karbamazepin, diklofenak, metoprolol och

venflaxin vilket ger en låg bioackumuleringspotential. I detta försök kunde mellan 1,39-5,25 % av tillsatt mängd av de fyra läkemedlen återfinnas vid analys av organismerna. Sertralin som är fettlöslig har hög fördelningskoefficient (log Kow) och binds lätt till feta strukturer. För citalopram med en intermediär fettlöslighet analyserades 8,19% av tillsatt mängd i organismerna efter 28 dygns exponering. 70% av tillsatt mängd av den fettlösliga substansen sertralin kunde återfinnas i de olika organismerna. Vidare var groda den organismgrupp som tog upp mest sertralin (Figur 33). Detta gällde både i hög- och lågdos. Man bör ha i minnet att analyserna har genomförts för att spåra de ursprungliga läkemedelsmolekylerna och inte nedbrytnings- eller omvandlingsprodukter.



Figur 33 Fördelning av sertralin i olika akvatiska organismer exponerade i microcosm för hög och låg dos.

Sammanfattande diskussion och slutsatser

I recipienten till Rimbo ARV mättes mellan december 2021 och september 2022 ett antal mikroföroreningar i vatten och biota. Det genomfördes också effekttester för bland annat östrogen aktivitet, biologiska tester med zebrafisk och dammsnäcka, samt ett microcosmförsök där arter representerandes olika trofnivåer exponerades för en blandning av olika läkemedel.

Mätningar av koncentrationer i vatten, såväl i utgående renat avloppsvatten som recipientvatten i Vallbyån och Kundbysjön, visar tydligt att verket bidrar med en tillförsel av läkemedel, hormoner och PFAS, men samtidigt att det, särskilt för läkemedel och hormoner, är stor variation i hur höga koncentrationerna är i utgående vatten och i recipientvatten. I nedströms provpunkt varierade totalkoncentrationen av de 24 analyserade läkemedlen mellan 110 och 1500 ng/L. I Kundbysjön var motsvarande <LOD och 500 ng/L. Att variationen är stor är att förvänta i och med att koncentrationerna i utgående vatten av enskilda läkemedel kan variera åtminstone 10-faldigt mellan olika tillfällen, samtidigt som flödet i Vallbyån varierar ungefärligen mellan 0,2 – 1,0 m³/s mellan olika tider på året. Baserat på koncentrationer i utgående vatten uppskattades att Rimbo ARV årligen tillför totalt 6 500 gram av de läkemedel som analyserats. Störst del av detta utgörs av losartan (1 000 g), ibuprofen (990 g), furosemid (810 g) och metoprolol (810).

Tillförseln av PFAS var marginell, och koncentrationerna Σ PFAS₁₁ i recipientvattnet var med marginal under bedömningsgrunden på 90 ng/L. Medelkoncentrationen uppströms i Vallbyån var 8 ng/L. Nedströms var den 10 ng/L. Även koncentrationerna av fenoler var med marginal under gränsvärdet för kemisk ytvattenstatus. För ciprofloxacin och diklofenak, de två läkemedel som har bedömningsgrund enligt HVMFS (2019), var koncentrationerna under maximala tillåtna max- och medelkoncentrationer.

Koncentrationen av 17 β -östradiol var vid en mätning på 7 ng/L nedströms, men vid samma tillfälle 6 ng/L uppströms, vilket antyder att huvuddelen av det som uppmättes nedströms Rimbo ARV redan fanns uppströms om verket. I övrigt var koncentrationerna av denna substans lägre än eller omkring detektionsgränsen på 2 ng/L. I Kundbysjön var alla prover under detektionsgränsen vilket innebär att det inte går att uttala sig om huruvida bedömningsgrunden för årsmedelvärde på 0,4 ng/L överskrids, eftersom detektionsgränsen är högre än denna. Samma resonemang gäller för 17 α -etinylostradiol som var under detektionsgränsen på 2 ng/L vid alla mätningar i alla provpunkter, men där bedömningsgrunden ligger på 0,035 ng/L. I sammanhanget kan nämnas att det är vanligt förekommande att laboratoriernas detektionsgränser är högre än respektive bedömningsgrund.

Risk för hormonstörande effekt i recipient avseende östron och 17 β -östradiol skattades via ekotoxikologiska riskkvoter, utifrån uppmätta koncentrationer i utgående vatten. Resultaten visade på att risk för hormonstörande effekt finns i Vallbyån och Kundbysjön. Detta motsägs dock till viss del av de östrogena effekttest baserat på jästceller (YES) som genomfördes på recipientvatten. Vid ett av fyra mättillfällen nedströms Rimbo ARV var koncentrationen sådan att negativ påverkan kan föreligga, i övrigt var de under testets detektionsgräns på 0,1 ng/L östradiolekvivalenter/L. De två mätningarna i Kundbysjön visade på lägre effekt än detektionsgränsen. Möjligen skulle effekten kunna vara högre vid vinter- eller höstförhållanden – endast vår och sommar mättes. Utöver YES-testet genomfördes ett annat celltest av östrogen påverkan av Biocell Analytica. Det testet visade i snitt på högre östrogen aktivitet än YES-testet.

Det var dock fallet att resultaten blev likvärda i Kundbysjön och i referenssjön Syningen, samt i nedströms och uppströms i Vallbyån, vilket indikerar att Rimbo ARV inte nämnvärt ökar vattnets östrogena effekt. De kemiska mätningarna i utgående vatten visar dock att ett tillskott sker (17 β -östradiol mellan <2–16 ng/L i utgående), men det förefaller inte stort nog för att resultera i skillnader i östrogen effekt mellan referens- och recipientvatten.

Riskkvoter i recipientvatten beräknades även för läkemedel, både som skattade utifrån koncentrationer i utgående vatten och utifrån uppmätta koncentrationer i recipient. Resultaten visade på att risk för negativ påverkan på vattenlevande organismer från exponering av citalopram, oxazepam och diklofenak föreligger. Dessa risker reduceras dock avsevärt om verkets utgående vatten slutpoleras med antingen ozon eller GAC, vilket är att förvänta i och med att avskiljningen med dessa extra reningssteg för de flesta läkemedel är åtminstone 90%.

Mätningar genomfördes också i biota från recipient- och referensvatten. Mätningarna i fisk, här gädda, abborre och sarv, visade på förekomst av läkemedel, framförallt i gädda från Kundbysjön. Flest läkemedel detekterades i njure från denna art. De läkemedel som detekterades förekom i storleksordningen enstaka till något tiotal ng/g vv, vilket stämmer väl överens med tidigare mätningar i fisk från recipienter till reningsverk (Viktor et al., 2021). Däremot hittades inga mätningar i njure av gädda i litteraturen, vilket försvårar jämförelser. Halterna i fisk varierade också avsevärt mellan de olika provtagningstillfällena, vilket rimligtvis återspeglar att det även i vattnet i Kundbysjön förekom stora skillnader mellan de olika proverna. Exempelvis var diklofenak den substans som noterades i högst koncentrationer i gäddans njure vid fisket i februari (som mest 37 ng/g vv), samtidigt som diklofenak inte detekterades i gäddan fångad i maj (<0,1 ng/g vv). I fisk från Kundbysjön mätas också PFAS i muskel från gädda och abborre. Resultaten visade på generellt låga halter i relation till gränsvärdet för PFOS på 9,1 ng/g vv i biota (HVMFS, 2019) samt nyligen antagna artspecifika gränsvärden (European Commission, 2022). Halten PFOS i abborren och gäddan låg mellan 0,84-0,85 ng/g vv. Gränsvärdet för abborre ligger dock högt, på 35 ng/g vv PFOS, vilket gör att det i denna typ av utredningar inte anses som ett relevant jämförvärde för att utröna vilka halter som är höga respektive låga. I gädda ligger gränsen på 7,0 ng/g vv PFOS. Läkemedels- och PFAS-analys i signalkräfta från Vallbyån genomfördes också. Ingen läkemedelssubstans kunde detekteras i kräftans hepatopancreas och PFOS halten i dess stjärtmuskel var 0,19-0,23 ng/g vv. Gränsvärdet ligger på 3,0 ng/g vv (European Commission, 2022). Sammantaget visar genomförda mätningar av läkemedel i biota att njure av gädda är en lämplig matris för undersökning av läkemedel. Denna slutsats försvagas dock av att endast ett prov av sarv respektive abborre analyserats och det inte hittats litteraturvärden som bekräftar eller falsifierar detta. Resultaten pekar också mot att halter av läkemedel i kräfta kan förväntas vara under vanligt förekommande detektionsgränser även om de levit i en recipient till ett reningsverk med endast måttlig utspädning av det utgående vattnet.

Det microcosmförsök som genomfördes, där ett antal organismer exponerades för två olika doser av sex utvalda läkemedelssubstanser visade inte på några akuta toxiska effekter i form av påverkan på reproduktion och tillväxt. Försöket visade dock att olika organismer kan ha en stor skillnad i upptag av läkemedel från omgivande vatten, samt att vissa läkemedel tenderar att tas upp i olika omfattning. Det bör nämnas att koncentrationerna i det vatten som försöksorganismerna exponerats för var betydligt högre jämfört med vad som anses ekologiskt relevant. Lågdosen hade koncentrationer i storleksordningen 6-150 μ g/L, och högdosen 10 gånger högre än det. Även i försöket med sebrafisk och dammsnäcka, som exponerats för utgående avloppsvatten samt utgående behandlat med GAC och ozon, noterades inga tydliga negativa effekter på tillväxt, reproduktion eller genuttryck hos de organismer som exponerats för det utgående vattnet.

Vid jämförelse mellan genomförda delstudier framträder en bild med i viss mån motstridiga resultat, där beräknade riskkvoter visade att risk för negativa effekter på akvatiska organismer i recipienten kan förekomma på grund av förhöjda koncentrationer av östrogena hormoner och läkemedel, medan de genomförda akvarieförsöken inte gav stöd för att negativa effekter förekommer. Inte heller de östrogena effekttester som genomfördes gav stöd för att det förekommer skillnader i östrogen effekt mellan referens- och recipientvatten. Att riskkvoterna, som utgår från *predicted no effect concentration* (PNEC), skiljer i förhållande till utförda tester med exempelvis zebrafisk eller bottenlevande fauna är dock i sig inte förvånande. Framtagandet av PNEC (Ågerstrand, 2019) baseras på studier av olika typer av akvatiska organismer som beräknat *no observed effect concentration* (NOEC). PNEC beräknas sedan utifrån NOEC och en sammanvägd osäkerhetsfaktor (vanligtvis mellan 10-1000) som leder till att PNEC ofta blir betydligt lägre än ett NOEC från en enskild studie. I sin tur betyder det att även om negativa effekter inte noterats i en studie vid koncentration X av läkemedel Y på en akvatisk organism så kan PNEC för just det läkemedlet ändå vara flera tiopotenser under koncentrationen där inga negativa effekter noterades. De akvarieförsök som genomförts till grund för denna rapport är dessutom korttidsstudier undersökande akut toxicitet, medan de studier som föredras vid beräkning av PNEC är långtidsstudier undersökande kronisk toxicitet.

Slutsatser:

- De provtagningar som genomfördes mellan december 2021 och september 2022 visar att organismer i Vallbyån och Kundbysjön exponeras för flertalet läkemedel, i nivåer varierande mellan <LOD och några hundratal ng/L. Sådana nivåer bedöms vara vanligt förekommande i recipienter till ARVs med låg till måttlig spädning.
- Mätningarna av läkemedel i biota visade på ett varierande upptag. Det förekom stor skillnad mellan olika arter, olika tidpunkter och olika organ. Underlaget var inte stort nog för några mer genomgående statistiska analyser, men det framkom en indikation av att njure av gädda är en lämplig matris för att undersöka förekomst av läkemedel i biota. I signalkräfta detekterades inga läkemedel, vilket indikerar att detta inte är en lämplig organism för att undersöka förekomst av läkemedel i biota.
- Tillskottet av fenoler och PFAS från Rimbo ARV till recipienten bedöms som lågt eller måttligt. PFAS-halter i fisk och kräfta ligger långt under gällande saluföringsgränsvärden.
- De ekotoxikologiska riskkvoter som beräknades visar på att det förekommer risk för negativ påverkan på organismer i recipienten från ett antal läkemedel. Denna risk reduceras med tillägg av avancerad rening i form av antingen ozon eller granulerat aktiverat kol (GAC).
- Det akvarieförsök som genomfördes med zebrafisk och dammsnäcka visade inte på negativ påverkan på de exponerade organismerna. Detta visar att ekotoxikologiska riskkvoter baserade på koncentrationer i utgående vatten och akvarietester med samma utgående vatten kan ge olika resultat, vilket förefaller rimligt utifrån hur de olika metoderna är konstruerade.
- Det microcosmförsök som genomfördes visade på stor variation i upptag av läkemedel i olika organismgrupper och av olika läkemedel.

- Viss risk för hormonstörande effekt i recipient kan förekomma i recipienten, baserat på de tre sätt att mäta detta som användes: kemisk analys av östrogena hormoner, samt effekttester YES och ER-aktivitet. Bilden är dock inte på något sätt entydig, då de östrogena hormonerna och den östrogena effekten i flera fall var likartad i referens- och recipientvatten.
- I relation till effekttester av östrogen effekt framstår kemisk analys som ett trubbigt instrument, på grund av att detektionsgränserna ofta är högre än både bedömningsgrunder och vanligt förekommande koncentrationer, vilket är känt sedan tidigare. Effekttesterna å andra sidan visade på i viss mån olika resultat, med högre östrogen effekt i ER-test jämfört med YES-test.
- Den uppsättning effekttester baserade på humanceller som användes (däribland ER-aktivitet) är en relativt ny och obeprövad metod som bedöms bidra med användbar information vid utvärdering av ett vattens potentiellt negativa effekter på akvatiska organismer.
- Sammantaget ger utförda undersökningar och biologiska tester svagt stöd för att det är motiverat att införa mer avancerad rening vid Rimbo ARV avseende studerade mikroföroreningar. Den begränsade miljönyttan med att införa avancerad rening vid Rimbo ARV som resultaten pekar mot bör även vägas mot annan miljö- och klimatpåverkan som implementering och drift av den avancerade reningen medför.
- Inom EU föreslås ett nytt så kallat avloppsvattendirektiv, vilket kommer att ställa strängare krav än vad som hittills gällt avseende på avskiljning av läkemedelsrester och andra mikroföroreningar. Det är därför viktigt att fler utredningar genomförs som kastar ljus över mikroföroreningars eventuella ekologiska betydelse. Det försöksupplägg som här använts, med upprepad provtagning över en längre tidsperiod både uppströms och nedströms reningsverket, samt nyttjande av konventionella kemiska mätningar, biologiska tester och effekttester, bör vara användbart i framtida studier.

Referenser

- Álvarez-Muñoz, D., Rodríguez-Mozaz, S., Maulvault, A. L., Tediosi, A., Fernández-Tejedor, M., Van den Heuvel, F., Kotterman, M., Marques, A., & Barceló, D. (2015). Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environmental research*, 143, 56-64.
- Augustsson, A., Lennqvist, T., Osbeck, C. M., Tibblin, P., Glynn, A., Nguyen, M., Westberg, E., & Vestergren, R. (2021). Consumption of freshwater fish: A variable but significant risk factor for PFOS exposure. *Environmental research*, 192, 110284.
- Barthel Svedén, J., & Olsson, T. (2021). Miljögifter i fisk från Vänern, Vättern och Mälaren 2021 – utökad miljöövervakning i de Stora sjöarna. *Vänerns vattenvårdsförbunds rapport 135, Vätternvårdsförbundets rapport 152, Mälarens vattenvårdsförbunds rapport 2022:2*.
- Björlenius, B., Ripszám, M., Haglund, P., Lindberg, R. H., Tysklind, M., & Fick, J. (2018). Pharmaceutical residues are widespread in Baltic Sea coastal and offshore waters—Screening for pharmaceuticals and modelling of environmental concentrations of carbamazepine. *Science of The Total Environment*, 633, 1496-1509.
- Brodin, T., Fick, J., Jonsson, M., & Klaminder, J. (2013). Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*, 339(6121), 814-815.
- Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A., Banks, K. E., Johnson, R. D., & Lewis, R. J. (2005). Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(2), 464-469.
- Du, B., Haddad, S. P., Luek, A., Scott, W. C., Saari, G. N., Kristofco, L. A., Connors, K. A., Rash, C., Rasmussen, J. B., & Chambliss, C. K. (2014). Bioaccumulation and trophic dilution of human pharmaceuticals across trophic positions of an effluent-dependent Wadeable stream. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), 20140058.
- EFSA. (2020). Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Efsa Journal*, 18(9), e06223.
- European Commission. (2022). COMMISSION REGULATION (EU) 2022/2388 of 7 December 2022 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of perfluoroalkyl substances in certain foodstuffs.
- Folmar, L., Denslow, N., Kroll, K., Orlando, E., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C., & Guillet Jr, L. (2001). Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40(3), 392-398.
- Folmar, L. C., Denslow, N. D., Rao, V., Chow, M., Crain, D. A., Enblom, J., Marcino, J., & Guillet Jr, L. J. (1996). Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives*, 104(10), 1096-1101.
- FORMAS. (2022). Svenskt kommunalt avloppsvatten och dess påverkan på vattenlevande organismer. *Formas, Rapport F1:2022. ISBN: 978-91-540-6162-4*.
- Holm, G., & Önnby, L. (2022). Effektbaserade analyser för att utvärdera reningseffektivitet och miljörisker i avloppsvatten - Lärdomar från sex avloppsreningsverk med konventionell respektive avancerad rening. *SWECO*
- Huerta, B., Rodríguez-Mozaz, S., Lazorchak, J., Barcelo, D., Batt, A., Wathen, J., & Stahl, L. (2018). Presence of pharmaceuticals in fish collected from urban rivers in the US EPA 2008–2009 National Rivers and Streams Assessment. *Science of The Total Environment*, 634, 542-549.
- HVMFS. (2019). *HVMFS 2019:25*. In Swedish: Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om klassificering och miljö kvalitetsnormer avseende ytvatten. Swedish Agency for Marine and Water Management.
- Jobling, S., Burn, R. W., Thorpe, K., Williams, R., & Tyler, C. (2009). Statistical modeling suggests that antiandrogens in effluents from wastewater treatment works contribute to widespread sexual disruption in fish living in English rivers. *Environmental Health Perspectives*, 117(5), 797-802.
- Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J., Kime, D., Van Look, K., McAllister, B., Beresford, N., Henshaw, A., Brighty, G., & Tyler, C. (2002). Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biology of reproduction*, 67(2), 515-524.

- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G., & Sumpter, J. P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental science & technology*, 32(17), 2498-2506.
- Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C. R., van Aerle, R., Santos, E., & Brighty, G. (2006). Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives*, 114(Suppl 1), 32-39.
- Karlsson, M., & Viktor, T. (2014). Miljöstörande ämnen i fisk från Stockholmsregionen 2013. *IVL rapport B2214*.
- Katsiadaki, I., Sanders, M. B., Henrys, P. A., Scott, A. P., Matthiessen, P., & Pottinger, T. G. (2012). Field surveys reveal the presence of anti-androgens in an effluent-receiving river using stickleback-specific biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 122, 75-85.
- Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., & Flick, R. W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(21), 8897-8901.
- Klaminder, J., Hellström, G., Fahlman, J., Jonsson, M., Fick, J., Lagesson, A., Bergman, E., & Brodin, T. (2016). Drug-induced behavioral changes: using laboratory observations to predict field observations. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 81.
- Lindqvist, U. (2022). Recipientkontroll för avloppsreningsverk i Norrtälje kommun år 2021. *Naturvatten i Roslagen AB, Rapport 2022:12*.
- Neale, P., Leusch, F., & Escher, B. (2021). *Bioanalytical tools in water quality assessment*. IWA publishing.
- NORMAN network, & Water Europe. (2019). Contaminants of Emerging Concern in Urban Wastewater - Joint NORMAN and Water Europe Position Paper. *Final version 10 sept 2019*.
- Norrsvatten. (2022). *Nytt gränsvärde för PFAS*. Retrieved 2022-12-02 from
- NVAA. (2022). Förstudie läkemedelsrening vid Lindholmens avloppsreningsverk i Norrtälje. Slutrapport Norrtälje vatten och avfall AB Oktober 2022.
- Näslund, J., Fick, J., Asker, N., Ekman, E., Larsson, D. J., & Norrgren, L. (2017). Diclofenac affects kidney histology in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) at low µg/L concentrations. *Aquatic Toxicology*, 189, 87-96.
- OECD. (2012). *OECD Guidelines for the testing of chemicals Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay*.
- Pettersson, M. (2022). PFAS i konsumtionsfisk från Stockholms sjöar och vikar. *Stockholms stad, Miljöförvaltningen, Dnr: 2022-10772*.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pohl, J., Ahrens, L., Carlsson, G., Golovko, O., Norrgren, L., Weiss, J., & Örn, S. (2019). Embryotoxicity of ozonated diclofenac, carbamazepine, and oxazepam in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 225, 191-199.
- Pohl, J., Björleinius, B., Brodin, T., Carlsson, G., Fick, J., Larsson, D. J., Norrgren, L., & Örn, S. (2018). Effects of ozonated sewage effluent on reproduction and behavioral endpoints in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 200, 93-101.
- Ramirez, A. J., Mottaleb, M. A., Brooks, B. W., & Chambliss, C. K. (2007). Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 79(8), 3155-3163.
- Robitaille, J., Denslow, N. D., Escher, B. I., Kurita-Oyamada, H. G., Marlatt, V., Martyniuk, C. J., Navarro-Martín, L., Prosser, R., Sanderson, T., & Yargeau, V. (2022). Towards regulation of Endocrine Disrupting chemicals (EDCs) in water resources using bioassays—A guide to developing a testing strategy. *Environmental research*, 205, 112483.
- Schultz, M. M., Furlong, E. T., Kolpin, D. W., Werner, S. L., Schoenfuss, H. L., Barber, L. B., Blazer, V. S., Norris, D. O., & Vajda, A. M. (2010). Antidepressant pharmaceuticals in two US effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environmental science & technology*, 44(6), 1918-1925.
- Sehlén, R., Malmberg, J., Baresel, C., Ek, M., Magnér, J., Allard, A.-S., & Yang, J. (2015). Pilotanläggning för ozonoxidation av läkemedelsrester i avloppsvatten. *IVL Svenska Miljöinstitutet, Rapport B2218*.
- Selman, K., Wallace, R. A., Sarka, A., & Qi, X. (1993). Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of morphology*, 218(2), 203-224.
- Socialstyrelsen. (2022). *Bilaga – Tabeller – Statistik om läkemedel 2021 – Uppdaterad 2022-08-10*.
- Svenson, A., Allard, A.-S., & Ek, M. (2003). Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water research*, 37(18), 4433-4443.

- Van Aerle, R., Nolanusan, M., Jobling, S., Christiansen, L. B., Sumpter, J. P., & Tyler, C. R. (2001). Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(12), 2841-2847.
- Vieno, N., Hallgren, P., Wallberg, P., Pyhälä, M., Zandaryaa, S., & Commission, B. M. E. P. (2017). *Pharmaceuticals in the aquatic environment of the Baltic Sea region: a status report* (Vol. 1). UNESCO Publishing.
- Viktor, T., Andersson, L., Adeoye Bello, M., Esfahane, B., Waldetoft, H., & Karlsson, M. (2021). Läkemedel i Vistån - Undersökning av koncentrationer i recipient och fiskförsök med avloppsvatten från Fors reningsverk. *IVL Svenska Miljöinstitutet, Rapport C578*.
- Waldetoft, H., Esfahane, B., & Karlsson, M. (2021). Läkemedelsrester i fisk från Vänern, Vättern och Mälaren. *Mälarens vattenvårdsförbund rapport 2021:2, Vänerens vattenvårdsförbund rapport 122, Vätternvårdsförbundets rapport 141*.
- Ågerstrand, M. (2019). Derivation of PNECs for 39 pharmaceutical substances. *Department of Environmental Science and Analytical Chemistry (ACES) Stockholm University, ACES report 36*.
- Örn, S., Holbech, H., & Norrgren, L. (2016). Sexual disruption in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to mixtures of 17 α -ethinylestradiol and 17 β -trenbolone. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 41, 225-231.

Appendix A

Detta appendix redovisar kompletterande information till Delstudie 1.

Tabell A:1 Läkemedelskoncentrationer (ng/L) vid uppströms provtagningspunkt i Vallbyån. Två mätningar genomfördes i februari (8e och 14e).

	dec 2021	feb 2022 A	feb 2022 B	mar 2022	apr 2022	maj 2022	juni 2022	sep 2022
Atenolol	<3	<2	<2	<1	<5	<5	<5	<1
Karbamazepin	<14	<23	<23	<21	<17	<17	<20	1-3
Ciprofloxacin	---	<20	<20	--	--	---	--	<5
Citalopram	<2	<4	<4	<1	<3	<10	<10	<1
Klaritromycin	<1	<2	<2	<2	<10	<10	<10	<3
Diklofenak	<6	4-14	4-14	1-2	<5	<3	<5	<5
Erytromycin	<4	<10	<10	<0.3	<10	<10	<10	<1
Flukonazol	<7	<6	<6	<7	<8	<9	<9	<1
Furosemid	<44	<12	<12	<13	<20	<9	<4	<12
Ibuprofen	<22	<40	<40	3	<29	<4	<16	<13
Ketokonazol	---	<30	<30	--	--	---	--	---
Losartan	<7	<4	4-14	<4	<10	6-19	<10	1-2
Metotrexat	---	<4	<4	<2	<2	<2	<10	<1
Metoprolol	<6	4-12	4-12	<4	<3	<3	<5	<2
Naproxen	1-6	2-7	2-7	<3	<8	<2	<5	<7
Oxazepam	<9	<8	<8	<2	<3	<5	<5	<1
Paracetamol	<26	<13	<13	<11	<7	<7	<5	<3
Propranolol	<2	<0.5	<0.5	<5	<5	<5	<5	<1
Sertralin	<2	<1	<1	<1	<1	<4	<3	<1
Sulfametoxazol	<28	<26	<26	<5	<5	7-23	<10	<13
Tramadol	<10	<15	<15	<15	<11	<11	<18	---
Trimetoprim	<3	1-3	1-3	<2	<5	<5	<2	<1
Venlafaxin	<4	3-11	<3	<3	<3	<3	<4	1-2
Zolpidem	<2	<1	<1	<3	<5	<5	<5	<1

Tabell A:2 Läkemedelskoncentrationer (ng/L) vid nedströms provtagningspunkt i Vallbyån. Två mätningar genomfördes i februari (8e och 14e).

	dec 2021	feb 2022 A	feb 2022 B	mar 2022	apr 2022	maj 2022	juni 2022	sep 2022
Atenolol	<3	10	2-7	1-4	<5	<5	<5	8
Karbamazepin	<14	<23	<23	<21	<17	<17	<20	26
Ciprofloxacin	---	<23	<23	--	--	---	--	<5
Citalopram	8	21	19	4	<3	<10	<10	16
Klaritromycin	1-3	14	15	2-5	<10	<10	<10	3-10
Diklofenak	48	210	160	23	5-18	14	5-20	47
Erytromycin	<4	<10	<10	<0.3	<10	<10	<10	1-3
Flukonazol	<7	6-19	<6	<7	<8	<9	<9	21
Furosemid	<44	60	46	<13	20-60	35	39	260
Ibuprofen	<22	580	610	17	<29	<4	16-54	<13
Ketokonazol	---	<30	<30	--	--	---	--	---
Losartan	47	110	97	27	10-34	36	97	330
Metotrexat	---	<4	<4	<2	<2	<2	<10	<1
Metoprolol	49	150	170	34	13	24	<5	170
Naproxen	32	88	72	54	8-28	11	26	50
Oxazepam	9-30	47	36	7	3-11	5-16	5-18	23
Paracetamol	<26	59	13-44	<11	<7	<7	<10	<3
Propranolol	<2	10	8	<5	<5	<5	<5	4
Sertralin	<2	3	4	<1	1-2	<4	<3	1-4
Sulfametoxazol	<28	26-86	130	<5	<5	<7	10-33	43
Tramadol	<10	15-49	15-49	<15	<11	<11	<18	---
Trimetoprim	<3	7	10	2-6	<5	<5	<2	3
Venlafaxin	4-20	45	38	3-10	<3	3-10	<4	110
Zolpidem	<2	<1	<1	<3	<5	<5	<5	<1

Tabell A:3 Läkemedelskoncentrationer (ng/L) i Rimbo ARVs utgående vatten. Triplikat av samma veckoprov i december.

	dec 2021 A	dec 2021 B	dec 2021 C	feb 2022	mar 2022	apr 2022	juni 2022	sept 2022
Atenolol	99	85	99	96	66	13	22	60
Karbamazepin	160	150	150	110	150	17-58	210	180
Ciprofloxacin	---	---	---	220	--	--	--	43
Citalopram	300	280	240	200	110	56	29	88
Klaritromycin	25	26	29	100	47	<10	36	110
Diklofenak	1700	1700	1800	1400	580	120	400	340
Erytromycin	77	63	65	<10	<0.3	2	<10	1-3
Flukonazol	100	100	110	61	65	8-27	200	180
Furosemid	1900	2100	2100	690	370	150	1000	1800
Ibuprofen	2300	2100	2100	4500	370	29-96	370	13-44

Ketokonazol	---	---	---	30-120	--	--	--	---
Losartan	1400	1300	1400	850	890	250	1700	2500^
Metotrexat	---	---	---	<4	<2	<2	<10	1-3
Metoprolol	1500	1600	1600	1400	840	270	510	1500
Naproxen	960	870	1100	590	1600	180	540	170
Oxazepam	640	550	540	470	200	70	340	300
Paracetamol	200	220	220	<13	11-36	<7	33	<3
Propranolol	110	130	110	75	70	5-20	5-20	38
Sertralin	53	52	44	50	28	22	3-9	11
Sulfametoxazol	730	710	690	560	200	69	270	400
Tramadol	340	370	340	210	260	81	320	---
Trimetoprim	79	71	82	84	97	27	23	33
Venlafaxin	440	580	460	320	180	77	210	980
Zolpidem	2-5	2-5	2-5	1-4	<3	<5	<5	1-2

Tabell A:4 Läkemedelskoncentrationer (ng/L) i Syningen.

	feb 2022	maj 2022	juni 2022
Atenolol	<2	<5	<5
Karbamazepin	<23	<17	<20
Ciprofloxacin	<20	---	--
Citalopram	<4	<10	<10
Klaritromycin	<2	<10	<10
Diklofenak	<4	<3	<5
Erytromycin	<10	<10	<10
Flukonazol	<6	<9	<9
Furosemid	<12	<9	<4
Ibuprofen	<40	<4	<16
Ketokonazol	<30	---	--
Losartan	<4	<6	<10
Metotrexat	<4	<2	<10
Metoprolol	<4	<3	<5
Naproxen	<2	<2	<5
Oxazepam	<8	<5	<5
Paracetamol	<13	<7	<10
Propranolol	<1	<5	<5
Sertralin	<1	<4	<3
Sulfametoxazol	<26	<7	<10
Tramadol	<15	<11	<18
Trimetoprim	1-3	<5	<2
Venlafaxin	<3	<3	<4
Zolpidem	<1	<5	<5

Tabell A:5 Läkemedelskoncentrationer (ng/L) i Kundbysjön.

	December (2021)	Februari	Maj	Juni
Atenolol	<3	<2	<5	<5
Karbamazepin	<14	<23	<17	<20
Ciprofloxacin	---	<20	---	--
Citalopram	9	<4	<10	<10
Klaritromycin	1-3	<2	<10	<10
Diklofenak	83	<4	3-11	<5
Erytromycin	<4	<10	10-40	<10
Flukonazol	<7	<6	<9	<9
Furosemid	<44	<12	<9	<4
Ibuprofen	100	<40	<4	16- 54
Ketokonazol	---	<30	---	--
Losartan	73	<4	25	45
Metotrexat	---	<4	<2	<10
Metoprolol	84	<4	28	<5
Naproxen	54	<2	2-8	5-20
Oxazepam	9-30	<8	5-16	5-18
Paracetamol	26-30	<13	<7	<10
Propranolol	2-6	<0.5	<5	<5
Sertralin	<2	<1	<4	<3
Sulfametoxazol	<28	<26	<7	<10
Tramadol	10-42	<15	<11	<18
Trimetoprim	<3	<1	<5	<2
Venlafaxin	4-20	<3	3-10	<4
Zolpidem	<2	<1	<5	<5

Tabell A:6 Läkemedel (ng/g vv) i muskel i fisk från Syningen och Kundbysjön. Fångad den 14-15 februari 2022. *halt under detektionsgräns (LOD). **halten är mellan detektionsgränsen och kvantifieringsgränsen (LOQ).

Substans	Syningen Gädda 1 Muskel	Syningen Gädda 2 Muskel	Kundby Gädda 1 Muskel	Kundby Gädda 2 Muskel	Syningen Gädda 3 Muskel	Kundby Abborre 1 Muskel	LOD	LOQ
Atenolol	*	*	9.2	9.2	**	**	1	3
Karbamazepin	*	*	*	*	*	*	13	44
Citalopram	*	*	*	*	*	*	5	16
Klaritromycin	*	*	*	*	*	*	2	7
Diklofenak	*	*	*	*	*	*	3	9
Erytromycin	*	*	*	*	*	*	7	22
Fluconazol	*	*	*	*	*	*	4	15
Furosemid	*	*	*	*	*	*	1	3
Ibuprofen	*	*	*	*	*	*	1	4
Losartan	*	*	*	*	*	*	8	26
Metotrexat	*	*	*	*	*	*	5	16
Metoprolol	*	*	*	*	*	*	2	7
Naproxen	**	*	*	*	*	*	0	1
Oxazepam	*	*	*	*	*	*	3	10
Paracetamol	*	*	**	26	*	*	6	19
Propranolol	*	*	*	*	*	*	1	3
Sertralin	*	*	*	*	*	*	4	14
Sulfametoxazol	*	*	*	*	*	*	4	13
Tramadol	*	*	*	*	*	*	8	27
Trimetoprim	*	*	*	*	*	*	1	4
Venlafaxin	*	*	*	*	*	*	2	7
Zolpidem	*	*	*	*	*	*	1	4

Tabell A:7 Läkemedel (ng/g vv) i lever i fisk från Syningen och Kundbysjön. Fångad den 14-15 februari 2022. *halt under detektionsgräns (LOD). **halten är mellan detektionsgränsen och kvantifieringsgränsen (LOQ).

Substans	Syningen Gädda 3 Lever	Syningen Gädda 2 Lever	Kundby Gädda 1 Lever	Kundby Abborre 1 Lever	LOD	LOQ
Atenolol	**	**	**	**	1	3
Karbamazepin	*	*	*	*	13	44
Citalopram	*	*	*	*	5	16
Klaritromycin	*	*	*	*	2	7
Diklofenak	*	*	*	*	3	9
Erytromycin	*	*	*	*	7	22
Fluconazol	*	*	*	*	4	15
Furosemid	*	*	*	*	1	3
Ibuprofen	*	*	*	*	1	4
Losartan	*	*	*	*	8	26
Metotrexat	*	*	*	*	5	16
Metoprolol	*	*	*	*	2	7
Naproxen	*	*	*	*	0	1
Oxazepam	*	*	*	*	3	10
Paracetamol	*	*	*	*	6	19
Propranolol	*	*	*	*	1	3
Sertralin	*	*	*	*	4	14
Sulfametoxazol	*	*	*	*	4	13
Tramadol	*	*	*	*	8	27
Trimetoprim	*	*	*	*	1	4
Venlafaxin	*	*	*	*	2	7
Zolpidem	*	*	*	*	1	4

Tabell A:8 Läkemedel (ng/g vv) i njure i fisk från Syningen och Kundbysjön. Fångad den 14-15 februari 2022. *halt under detektionsgräns (LOD). **halten är mellan detektionsgränsen och kvantifieringsgränsen (LOQ).

Substans	Syningen Gädda 2 Njure	Syningen Gädda 3 Njure	Kundby Gädda 1 Njure	Kundby Gädda 2 Njure	Kundby Abborre 1 Njure	LOD	LOQ
Atenolol	*	*	*	*	*	1	3
Karbamazepin	*	*	*	*	*	13	44
Citalopram	*	*	*	*	*	5	16
Klaritromycin	*	*	*	*	*	2	7
Diklofenak	18	14	37	33	*	3	9
Erytromycin	*	*	*	*	*	7	22
Fluconazol	*	*	*	*	*	4	15
Furosemid	*	*	*	4.3	*	1	3
Ibuprofen	**	4.5	**	12	*	1	4
Losartan	*	*	*	**	*	8	26
Metotrexat	*	*	*	*	*	5	16
Metoprolol	*	*	**	**	*	2	7
Naproxen	*	**	**	1.1	*	0	1
Oxazepam	*	*	*	*	*	3	10
Paracetamol	*	*	*	*	*	6	19
Propranolol	*	*	**	**	*	1	3
Sertralin	*	*	**	**	*	4	14
Sulfametoxazol	*	*	*	*	*	4	13
Tramadol	*	*	*	*	*	8	27
Trimetoprim	*	*	*	*	*	1	4
Venlafaxin	*	*	*	*	*	2	7
Zolpidem	*	*	*	*	*	1	4

Tabell A:9 Läkemedel (ng/g vv) i galla i fisk från Syningen och Kundbysjön. Fångad den 14-15 februari 2022. *halt under detektionsgräns (LOD). **halten är mellan detektionsgränsen och kvantifieringsgränsen (LOQ).

Substans	Kundby Gädda 1 galla	Syningen Gädda 2 galla	Kundby abborre 1 galla	Syningen gädda 3 galla	LOD	LOQ
Atenolol	**	**	*	*	1	3
Karbamazepin	*	*	*	*	13	44
Citalopram	*	*	*	*	5	16
Klaritromycin	*	*	*	*	2	7
Diklofenak	*	*	*	*	3	9
Erytromycin	*	*	*	*	7	22
Fluconazol	*	*	*	*	4	15
Furosemid	*	*	*	*	1	3
Ibuprofen	*	*	*	*	1	4
Losartan	*	*	*	*	8	26
Metotrexat	*	*	*	*	5	16
Metoprolol	*	*	*	*	2	7
Naproxen	*	*	*	*	0	1
Oxazepam	*	*	*	*	3	10
Paracetamol	*	*	*	*	6	19
Propranolol	*	*	*	*	1	3
Sertralin	*	*	*	*	4	14
Sulfametoxazol	*	*	*	*	4	13
Tramadol	*	*	*	*	8	27
Trimetoprim	*	*	*	*	1	4
Venlafaxin	*	*	*	*	2	7
Zolpidem	*	*	*	*	1	4

Tabell A:10 Läkemedel (ng/g vv) i gädda från Syningen, gädda och sarv från Kundbysjön och samlingsprov (4-5 individer) av hepatopankreas i kräfta från Vallbyån. Ett prov uppströms och två nedströms.

	Syningen gädda njure	Kundby Gädda njure	Kundby Sarv njure	Upp Kräfta (hepato)	Ned A Kräfta (hepato)	Ned B Kräfta (hepato)	LOD	LOQ
Atenolol	*	*	*	*	*	*	0,2	0,5
Karbamazepin	*	*	*	*	*	*	0,2	0,7
Citalopram	*	*	*	*	*	*	0,3	1,1
Klaritromycin	**	5,7	*	*	*	*	0,3	1,0
Diklofenak	*	*	*	*	*	*	0,3	1,1
Erytromycin	*	*	*	*	*	*	0,1	0,3
Fluconazol	*	*	*	*	*	*	0,1	0,3
Furosemid	*	*	*	*	*	*	0,2	0,5
Ibuprofen	*	*	*	*	*	*	0,5	1,5
Losartan	*	*	*	*	*	*	1,1	3,6
Metotrexat	---	---	---	---	---	---	---	---
Metoprolol	*	*	*	*	*	*	0,2	0,8
Naproxen	*	*	*	*	*	*	0,3	1,0
Oxazepam	*	8,7	*	*	*	*	0,5	1,7
Paracetamol	*	*	*	*	*	*	0,3	1,0
Propranolol	*	*	*	*	*	*	0,2	0,7
Sertralin	*	*	*	*	*	*	0,4	1,3
Sulfametoxazol	*	20,0	*	*	*	*	1,5	5,0
Tramadol	*	**	*	*	*	*	0,3	1,0
Trimetoprim	*	*	*	*	*	*	0,3	1,0
Venlafaxin	*	1,0	1,0	*	*	*	0,3	0,9
Zolpidem	*	*	*	*	*	*	0,2	0,5
Venlafaxine	**	1,1	**	*	*	*	0,1	0,3
Zolpidem	*	*	*	*	*	*	0,2	0,5

Tabell A:11 PFAS i stjärtmuskel av kräfta i Vallbyån, ett prov uppströms och ett prov nedströms, samt i muskel av abborre och gädda från Kundbysjön. Abborren är samlingsprov av tre individer. *Halt lägre än detektionsgränsen (LOD).

Substans	Kräfta uppströms	Kräfta nedströms (A)	Kräfta nedströms (B)	Kundby abborre	Kundby gädda	LOD	LOQ
PFPeS	*	*		*	*	0,02	0,06
PFHxS	*	0,16	0,09	*	*	0,03	0,11
PFHpS	*	*	*	*	*	0,06	0,19
PFOS	0,10	0,34	0,23	0,85	0,84	0,02	0,06
PFNS	*	*	*	*	*	0,04	0,12
PFDS	*	*	*	*	*	0,11	0,38
PFUnDS	*	*	*	*	*	0,02	0,06
PFDoDS	*	*	*	*	*	0,07	0,23
6:2 FTS	*	*	*	*	*	0,04	0,15
8:2 FTS	*	*	*	*	*	0,09	0,29
PFOSA	*	*	*	*	0,35	0,01	0,04
PFHxA	*	*	*	*	*	0,05	0,18
PFHpA	*	*	*	*	*	0,07	0,23
PFOA	*	*	*	*	*	0,13	0,44
PFNA	0,09	0,05	*	0,05	*	0,04	0,14
PFDA	0,09	0,23	0,14	0,33	0,26	0,08	0,27
PFUnDA	0,18	0,16	0,19	0,17	0,12	0,03	0,10
PFDoDA	*	*	0,17	*	*	0,04	0,14
PFTTrDA	*	*	*	*	*	0,03	0,10
PFTeDA	*	*	*	*	*	0,03	0,09

Appendix B

Detta appendix redovisar kompletterande information till Delstudie 2.

Tabell B:1 Vattenkemiska parametrar och läkemedelshalter uppmätta under försöksperioden. Uppskattade nolleffektkoncentrationer (PNEC) baseras på rekommenderade värden för sötvattensrecipient. För kustnära recipient bör tio gånger lägre PNEC-värden beaktas.

Vattenkemi	Enhet	KV	UT	OZ	GAC		
		Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD		
Temperatur	°C	26,4±1,0	25,9±0,2	26,4±0,7	26,6±0,4		
Zebrafisk							
Temperatur	°C	20,2±0,51	20,2±0,51	20,2±0,38	20,2±0,38		
Dammsnäcka							
Surhet	pH	8,18±0,07	7,85±0,1	7,90±0,0	7,82±0,13		
Konduktivitet	µS/cm	282±2,3	749±38	745±31	737±31		
TOC (Totalt organiskt kol)	mg C/L	4,3*	8,1±3,0	8,5±0,6	7,4±5,8		
Läkemedel						PNEC**	PNEC***
Atenolol	ng/l	<5	29±5,4	<5	<5	32000	150000
Ciprofloxacin	ng/l	<10	-	-	-	64	89
Citalopram	ng/l	<5	120±14	<3	<3	0,075	16000
Diklofenak	ng/l	<10	373±101	<5	<5	50	50
Erytromycin	ng/l	<20	2,4±1,1	<10	<10	20	200
Flukonazol	ng/l	<1	70±24	<8	<8		
Furosemid	ng/l	-	303±116	<20	<20	156	
Ibuprofen	ng/l	-	8,6±4,5	7,9±4,3	4,4±3,1	102000	
Karbamazepin	ng/l	4	125±28	<17	<17		50
Ketoconazol	ng/l	<10	-	-	-		
Klaritromycin	ng/l	<1	<30	<10	<10		120
Losartan	ng/l	<5	597±120	19±4,5	26±10,8		78000

Metoprolol	ng/l	<5	463±76	8,3±2,6	1,5±1,4	2590	8600
Metotrexat	ng/l	-	1,3±0,5	0,6± 0,2	0,9±0,2		
Naproxen	ng/l	-	137±82	2,6±1,7	4,2±2,1	15000	1700
Oxazepam	ng/l	<5	223±66	27±11,7	<3	10	
Paracetamol	ng/l	<10	1,5±0,2	<7	<7	46000	134000
Propranolol	ng/l	<50	45±9	<5	<5	228	410
Sertralin	ng/l	<10	18±6,8	<3	<3	9,4	91
Sulfametoxazol	ng/l	<5	164±85	<5	<5	118	600
Tramadol	ng/l	8	157±37	<11	<11		
Trimetoprim	ng/l	1	102±26	<5	<5	500	100000
Venlafaxin	ng/l	<0,5	110±22	<3	<3		38, 42000
Zolpidem	ng/l	<0,5	<10	<5	<5		
Summa läkemedel	ng/L	90	3067	120	61		
Reningsgrad****	%			95	97		

*Data från Norrvatten

** Rekommenderade PNEC-värden Ågerstrand 2019

*** NORMAN Ecotoxicology Database – Lowest PNECs based on experimental data

****Medelreningsgrad beräknat per enskilt ämne

Tabell B:2 Resultat för zebrafisk exponerad under tre veckor för olika försöksvatten. För mätresponser där skillnader finns mellan grupper visas detta genom att grupper där data ej skiljer sig delar samma bokstav (A, B).

Respon	Enhet	KV	UT	OZ	GAC
		Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD
Storlek/överlevnad					
Överlevnad	%	100	100	100	100
Vikt honor	mg	595 ±72	693 ±27	655 ±24	657 ±47
Vikt hanar	mg	525 ±22	571 ±75	617 ±33	565 ±26
Längd honor	mm	36,6 ±0,6	37,8 ±0,9	37,8 ±0,7	37,8 ±1,0
Längd hanar	mm	36,3 ±1,2	37,1 ±1,3	36,6 ±0,5	36,0 ±0,9
BCF honor	g*cm ⁻³ *100	1,20 ±0,11	1,29 ±0,06	1,20 ±0,04	1,22 ±0,02
BCF hanar	g*cm ⁻³ *100	1,10 ^A ±0,06	1,11 ^A ±0,10	1,26 ^B ±0,11	1,20 ^{AB} ±0,08
Reproduktion					
Lektillfällen	Antal/21 lekdagar	21	19	20	19
Äggläggning dag	Antal ägg/hona/dag	22 ±9	23 ±16	21 ±18	14 ±5
Äggläggning vecka -Total	Antal ägg/hona/vecka	151 ±41	159 ±38	145 ±34	95 ±27
-Befruktade ägg	Antal ägg/hona/vecka	140 ±37	127 ±28	114 ±27	76 ±21
-Obefruktade ägg	Antal ägg/hona/vecka	11 ±4	32 ±10	31 ±8	19 ±7
Simbeteende					
Simdistans honor	m/10min	27 ±10	28 ±7	28 ±5	27 ±11
Simbeteende honor	k-värde	4,3 ±4,7	8,0 ±6,4	10,1 ±14,0	6,9 ±1,4
Simdistans hanar	m/10min	29 ±9	27 ±9	28 ±11	28 ±10
Simbeteende hanar	k-värde	2,5 ±5,5	5,9 ±3,2	11,7 ±7,0	11,1 ±6,7

Tabell B:3 Resultat för genuttryck hos honor och hanar av zebrafisk exponerade för olika försöksvatten. För mätresponser där skillnader finns mellan grupper visas detta genom att grupper där data ej skiljer sig delar samma bokstav (^{A, B}).

Log rel. genuttryck	KV	UT	OZ	GAC
	Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD
<i>Honor</i>				
Rpl13a	-0,057±0,35	0,056±0,26	0,012±0,27	0,12±0,090
Nrf2	-0,16±0,21	-0,25±0,15	-0,066±0,21	-0,11±0,14
Ar	-0,093±0,42 ^A	-0,14±0,28 ^A	-0,37±0,19 ^{AB}	-0,36±0,24 ^B
Era	1,0±0,15	0,95±0,24	0,75±0,34	0,87±0,38
Cyp1a1	-0,20±0,20	-0,21±0,23	-0,21±0,22	-0,22±0,16
Cyp3a65	-0,40±0,12	-0,66±0,41	-0,55±0,39	-0,97±0,54
Vtg1	1,7±0,21	1,8±0,18	1,6±0,14	1,63±0,11
Mt	-0,23±0,34 ^A	-0,70±0,26 ^B	-0,86±0,51 ^B	-0,60±0,25 ^B
<i>Hanar</i>				
Rpl13a	0,057±0,16	0,12±0,18	0,083±0,070	-0,011±0,22
Nrf2	0,18±0,21	0,14±0,10	0,15±0,12	0,034±0,28
Ar	-0,18±0,34 ^A	-0,10±0,18 ^A	0,34±0,22 ^{AB}	-0,56±0,56 ^B
Era	-0,77±0,13	-0,97±0,24	-0,75±0,11	-0,84±0,29
Cyp1a1	0,20±0,19	0,18±0,22	0,16±0,24	0,008±0,31
Cyp3a65	0,38±0,24	0,34±0,16	0,20±0,23	0,32±0,44
Vtg1	-2,0±0,96	-1,9±0,45	-1,8±0,57	-1,6±0,11
Mt	0,23±0,11 ^A	-0,33±0,47 ^B	-0,12±0,28 ^B	-0,36±0,52 ^B

Tabell B:4 Resultat för dammsnäckor exponerad under tre veckor för olika försöksvatten. För mätresponser där skillnader finns mellan grupper visas detta genom att grupper där data ej skiljer sig delar samma bokstav (^{A, B}).

Respons	Enhet	KV	UT	OZ	GAC
		Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD
Storlek/överlevnad					
Överlevnad	%	92±11	68±30	92±18	60±37
Vikt	g	2,08±0,11	2,10±0,29	2,10±0,29	1,86±0,19
Längd	mm	30,9±1,1	32,2±0,44	32,6±1,7	31,0±1,1
BCF	g*cm ⁻³ *100	7,22±1,02	6,41±0,81	6,17±0,94	6,26±0,72
Reproduktion					
Kokonger					
Vecka 1 ^A	Antal/individ	1,8±0,20	0,80±0,40	0,64±0,43	0,87±0,56
Vecka 2 ^B	Antal/individ	1,4±0,69	1,9±0,23	1,5±0,51	2,4±0,57
Vecka 3 ^C	Antal/individ	2,9±0,67	2,9±0,95	3,6±0,53	3,6±1,1
Ägg					
Vecka 1 ^A	Antal/individ	98,1±17	53,3±31	35,0±28	47,7±33
Vecka 2 ^B	Antal/individ	108±54	131±14	110±30	166±34
Vecka 3 ^C	Antal/individ	207±38	200±78	265±37	245±92
Dåliga ägg					
Vecka 1	Antal/individ	0,66±0,27	0,16±0,17	0,20±0,20	0,21±0,24
Vecka 2	Antal/individ	0,27±0,31	0,24±0,17	0,16±0,36	1,5±2,6
Vecka 3	Antal/individ	0,73±0,50	0,27±0,36	0,39±0,19	0,32±0,35
Log rel. genuttryck					
EF		0±0,24	0,014±0,31	0,016±0,20	0,031±0,34
Cat		0±0,11	0,010±0,12	0,076±0,13	0,14±0,19
Gpx		0,011±0,30	-0,021±0,29	0,14±0,23	0,051±0,26
Nr3d		0,0022±0,11	0,11±0,088	0,11±0,13	0,048±0,17
Cyp3a		0,023±0,91	0,18±0,81	0,24±0,85	0,48±0,70
YF		0±0,20	-0,013±0,12	-0,027±0,12	-0,0006±0,12
MT		0±0,22	-0,081±0,26	-0,059±0,16	0,11±0,24

Appendix C

Kompletterande tabell till Delstudie 3.

Tabell C:1 Beräknade biokonzentrationsfaktorer baserat på dosen läkemedel tillsatt till vattenfasen (ng/L) dividerat med den analyserade mängden i organismerna (ng/g våtvikt) efter 28 dygns exponering för hög och låg dos. Fördelningskoefficienten mellan oktanol/vatten (Log Kow) anges som jämförelse.

Art	Dos	Karbamazepin	Citalopram	Diklofenak	Metoprolol	Sertralin	Venlafaxin
Chironomid	Hög	2,56	5.32	6.6	0.31	32.7	0.58
Tubifex		1.8	1.87	0.42	0.13	18.4	0.55
Dafnia		2.85	15	1.63	2.52	42	3.42
Asellus		2.63	4.77	0.76	0.88	23.4	11.7
Groda		1.47	11.3	0.62	3.05	128	4.08
Chironomid	Låg	12,2	6.41	4.69	1	17	1.35
Tubifex		2.8	1.36	0.16	0.11	46.7	0.15
Dafnia		4.2	9.82	1.09	0.64	24.2	0.06
Asellus		10.6	14.9	0.8	2.99	40	7.47
Groda		5.5	42.3	0.47	16.5	194	15.9
Log Kow		2.45	3.74	4.51	1.88	5.51	3.20



IVL Svenska Miljöinstitutet AB // Box 210 60 // 100 31 Stockholm
Tel 010-788 65 00 // www.ivl.se