

Utvärdering av avancerad läkemedelsrening med biologiska tester vid Lindholmens reningsverk, Norrtälje



Stefan Örn, Gunnar Carlsson, Johan Lundqvist
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF)
Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Uppsala

Innehåll

Introduktion	3
Material & metoder	3
Zebrafisk	4
Försöksdesign	4
Utförande	4
Beteendestudier och provtagning	5
Dammsnäcka	5
Försöksdesign och utförande	5
Reproduktion och provtagning	6
Mätning av genuttryck hos zebrafisk och dammsnäcka	6
Celltester	7
Statistiska analyser	8
Resultat	8
Zebrafisk	8
Dammsnäckor	11
Celltester	12
Diskussion	13
Reproduktion	13
Simbeteende zebrafisk	13
Genuttryck zebrafisk och dammsnäcka	14
Celltester	15
Slutdiskussion	16
Slutsatser	17
Referenser	17

Introduktion

De flesta läkemedel vi använder utsöndras via urin och avföring i oförändrad form eller som metaboliter och hamnar till slut i avloppet. Läkemedelsresterna kan sedan nå våra vattendrag efter att ha passerat genom avloppsreningsverken eftersom dagens reningsverk inte är byggda för att rena bort läkemedel. Läkemedel är framtagna för att vara kemiskt stabila och att påverka biologiska processer inom human- och veterinärmedicin. Många av läkemedlen 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., 1996, 2001; Jobling et al., 1998, 2002; Van Aerle et al., 2001). Senare studier sammankopplar, förutom östrogener, även dessa könsutvecklingsstörningar till exponering för anti-androgena kemikalier i avloppsvatten (Jobling et al., 2006, 2009; 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. Andra är långlivade och kan transporteras långa sträckor, som exempelvis antiepilektiska läkemedlet karbamazepin som har påvisats i alla delar av Östersjön (Björlenius et al., 2018).

Med undantag för antibiotika ökar läkemedelsanvändning för varje år (Socialstyrelsen 2022), varför även utsläppen av läkemedelsrester från reningsverket ökar. 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.

Syftet med denna studie var att med biologiska tester utvärdera två olika reningsmetoder för läkemedelsrening vid Lindholmens reningsverk, Norrtälje. 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, samt ett batteri av cellbaserade in vitro-tester som detekterar specifika biologiska receptorbindningsaktiviteter. 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 Lindholmens reningsverk i en labutrustad försökscontainer och cell-testerna utfördes på lab vid Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap (BVF), SLU, Uppsala.

Material & 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 Lindholmens reningsverk (UT); UT-vatten behandlat med granulerat aktivt kol (GAC), respektive UT-vatten behandlat med ozon + sandfiltrering (OZ), samt aktivkolfiltrerat kranvatten (KV) som utgjorde kontrollvatten. För celltesterna analyserades även UT-vatten behandlat med pulvriserat aktivt kol (PAC) Alla försöksvatten tillfördes var sin 100-L fördelningstunna som fungerade som utjämningstankar i containern (Fig. 1). Luft tillfördes de behandlade vattnen i fördelningstunnorna för att dels driva av eventuell

restozon och övermättnad av syrgas, dels för att lufta upp utgående respektive kolfiltrerat 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 december 2021. Sammanlagt bestod försöksupställningen 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 försöksupställningen 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 5.8.18-00819/2017).



Fig. 1. 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 Lindholmen reningsverk, Norrtälje. Påsarna med zebrafiskar placerades därefter i försöksakvarierna för akklimatisering av fiskarna till rådande temperaturförhållanden. Fiskarna exponerades 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 TG 229).

Beteendestudier och provtagning

Efter tre veckors exponering i försöksvatten videofilmades fiskarna för studier av simbeteende innan de provtogs. Beteendestudier utfördes genom att håva upp en fisk från vardera försöksvatten och placera dem 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 försöksvattens 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. Body Condition Factor (BCF) beräknades som $\text{vikt (g)} / (\text{längd (cm)}^3) * 100$. 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 könsbestämning till hane eller hona av alla ingående fiskar i försöket. 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 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. 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 0,1 l/timme vilket motsvarar ca 3 byten av totala vattenvolymen i burkarna varje dygn. För varje exponeringsgrupp (KV, UT, OZ och GAC) pumpades vatten till fem burkar (Fig. 2). Fem snäckor fördelades slumpvis till varje burk. Under försöket matades snäckorna med ekologisk bladsallad.



Fig. 2. *Försöksuppställning för dammsnäcka.*

Reproduktion och provtagning

Snäckorna exponerades för de olika vattnen 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. Body Condition Factor (BCF) beräknades som $\text{vikt (g)} / (\text{längd (cm)}^3) * 100$. 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 utspädd 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 1. Uttrycken för varje gen beräknades enligt Pfaffl (2001) som relativt KV-gruppens medelvärde.

Tabell 1. Gener som analyserades på zebrafiskar och snäckor samt de aktiviteter som analyserades i celltesterna och de fysiologiska mekanismer som dessa kan kopplas till.

Mekanism		Gen zebrafisk	Gen snäcka	Aktivitet celltest
Oxidativ stress	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	Nrf2		Nrf2
	Katalas		Cat	
	Glutationperoxidas		Gpx	
Hormonreceptorer	Nuclear hormone receptor		Nr3d	
	Androgenreceptor	Ar		AR/ anti-AR
	Östrogenreceptor	Era		ER

Fas-1 metabolism	Cytochrome p450 1	Cyp1a1		AhR
	Cytochrome p450 3	Cyp3a65	Cyp3a	
Äggprotein	Vitellogenin	Vtg1		
	Yolk ferritin		YF	
Metallmetabolism	Metallothionein	MT	MT	
Referensgener	Transmembrane protein 50 A	Tmem50a		
	Elongation factor		EF	

Celltester

De fyra försöksvattnen KV, UT, OZ och GAC, samt även PAC analyserades med effektbaserade metoder baserade på odlade celler som modifierats så att specifika toxiska effekter kan mätas. I denna studie studerades förekomsten av ämnen som kan aktivera östrogenreceptorn (ER), androgenreceptorn (AR), arylhydrokarbonreceptorn (AhR) samt orsaka oxidativ stress (Nrf2). För androgenreceptorn mättes även antagonistisk aktivitet (anti-AR).

Försöksvattnen samlades in som flödesmässiga dygnsprov och blandades till ett veckoprov under perioden för fisk- och snäckförsökens tredje vecka till en totalvolym av 1 liter. Extra prover togs för KV och UT vid senare provtagning för vidare undersökning av resultat framkomna framförallt i KV. Försöksvattnen koncentrerades 5000 gånger med hjälp av fastfasextraktion och späddes sedan 100 gånger eller mer med cellmedium under den effektbaserade analysen. Den slutliga koncentrationsfaktor som testats var alltså som högst 50 gånger högre än ett okoncentrerat vattenprov. Provet har initialt testats för cytotoxicitet, för att utesluta koncentrationer som kan orsaka akut och ospecifik toxicitet som påverkar cellerna på ett så negativt sätt så att det inte går att mäta specifika toxiska effekter. Provet analyserades därefter i spädningsserier om minst fyra koncentrationer för respektive analys. Resultaten användes för att beräkna bioekvivalenta koncentrationer (bioequivalent concentrations, BEQ). BEQ-värdet beskriver den observerade effekten uttryckt som en koncentration av en referenskemikalie, som är analyserad samtidigt. Om ett vattenprov har ett BEQ-värde om 10 pg/L betyder det alltså att den biologiska aktiviteten i provet motsvarar den aktivitet som 10 pg/L av referenskemikalie skulle orsaka. BEQ-värdet beräknas för att kunna jämföra aktiviteten mellan prover och mellan studier.

Referenskemikalierna som användes var 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) för att mäta AhR-aktivitet, 17 β -estradiol (E2) för ER-aktivitet, dihydrotestosteron (DHT) för AR-aktivitet, hydroxyflutamid (OHF) för anti-AR-aktivitet och tertiär butylhydrokinon (tBHQ) för Nrf2 (oxidativ stress) (Tabell 2). För att avgöra om ett prov innehåller kemiska ämnen som kan aktivera en viss toxisk effekt analyserade vi först om någon av de analyserade koncentrationerna orsakade en aktivitet som var högre än en på förhand definierad detektionsgräns. Prover som uppvisade en aktivitet över denna detektionsgräns klassades som aktiva och BEQ-värden beräknades för dessa prover.

Tabell 2. Översikt av effektbaserade cellmetoder

Endpoint	Detektionsmetod	Tillkommande exponering	Cellinje	Referenssubstans	Definition av aktivt prov
Aktivering östrogenreceptor	Luciferase	-	T47D-ER	Östradiol	>20% av den maximal effekten av östradiol
Aktivering av androgenreceptorn	Luciferase	-	AREcoScreen	Dihydrotestosteron	>20% av den maximal effekten av dihydrotestosteron
Blockering av androgenreceptorn	Luciferase	Dihydrotestosteron	AREcoScreen	Flutamid	>30% reduction av den dihydrotestosteron-inducerade aktiviteten

Oxidativ stress (Nrf2-aktivitet)	Luciferase	-	AREc32	tBHQ	1,5-gångar högre aktivitet jämfört med vehikelkontroll
Aktivering av Ah- receptorn	Luciferase	-	DR EcoScreen	2,3,7,8-TCDD	>10% av den maximal effekten av 2,3,7,8-TCDD

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 mätrespons 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 mätrespons mot faktorn "behandling". För genuttrycken i fiskarna testades varje respons 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 hos zebrafisk.

Resultat

Uppmätta vattenkemiska parametrar under försöksperioden för zebrafisk och dammsnäckor visas i Tabell 3. Utetemperaturen varierade relativt mycket under försökets genomförande 22 november-15 december, med temperaturer mellan +9 och -18°C.

Zebrafisk

Ingen mortalitet av zebrafiskar förekom under exponeringsperioden (Tabell 4). Histologiska undersökningar av gonader visade att alla hanar och honor var fullt könsmogna, dvs hanar uppvisade hög förekomst av spermier i testiklar och honor hög förekomst av fullmogna ägg (Fig. 3). Den histologiska könsbestämningen visade sammanlagt 63 honor och 57 hanar, dvs tre honor fler än vad som okulärt valdes från start. Förändrade könskvoter mot planerad försöksdesign återfanns i KV3, UT3 och OZ2, där könskvoterna var 6 honor och 4 hanar jämfört med 5:5 i alla andra replikat. Ingen statistisk skillnad förelåg mellan de fyra försöksvattnen gällande uppmätt kroppsvikt, kroppslängd eller BCF, vare sig för honor eller hanar (Fig. 4, Tabell 4).

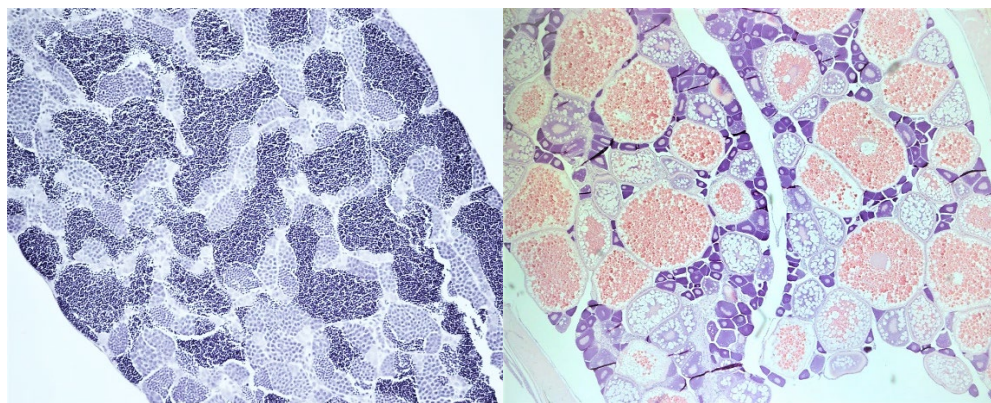


Fig. 3. Ljuskroskopiska foton av histologiska snitt visande representativ testikelvävnad från hane (vänster) innehållande fullmogna spermier (mörkblå områden), samt ovarie från hona (höger) innehållande ägg i olika mognadsgrad inklusive fullmogna ägg (rosafärgade). Haematoxylin-eosin-färgning (HE).

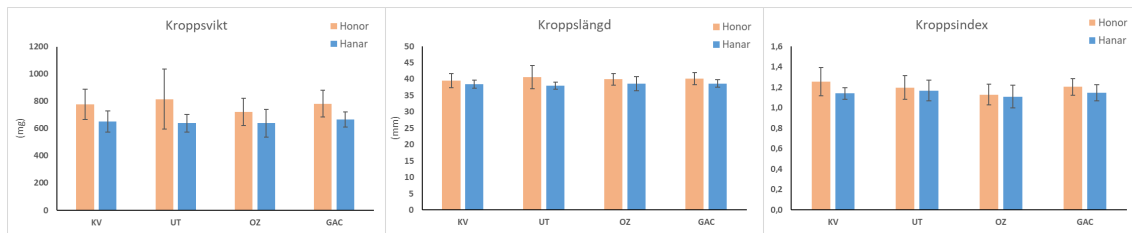


Fig. 4. Kroppslängd, kroppsvikt och kroppsindex (BCF) hos zebrafisk kontinuerligt exponerade för olika försöksvatten under tre veckor. Data visar medelvärde + standardavvikelse av tre replikat per försöksvatten. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol.

Studier av reproduktionsutfall under tredje exponeringsveckan visade att äggläggning för KV skedde vid färre antal dagar jämfört med OZ och GAC (Tabell 4). Av 21 möjliga dagar för reproduktion (3 replikat a' 7 dagar) skedde äggläggning hos KV sammanlagt 16 dagar, UT 19 dagar, samt OZ och GAC 21 dagar. Ingen skillnad förekom mellan UT och grupperna OZ och GAC. Antal lagda ägg per dag uppvisade stor variation oavsett försöksvatten och replikat och varierade mellan 0 och 130 ägg per hona. Den kumulativa äggläggningen visade att OZ och GAC lade sammanlagt fler ägg per hona än KV och UT, men utan statistisk skillnad (Fig. 5 & 6). Befruktningsfrekvensen var relativt lika i alla försöksvatten och inga skillnader uppmättes.

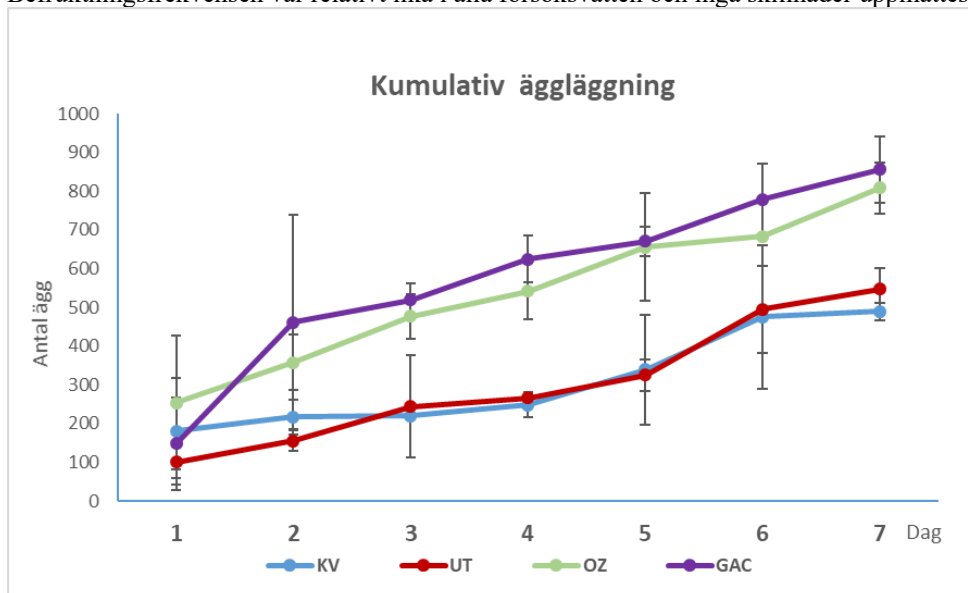


Fig. 5. Kumulativ äggläggning av befruktade ägg hos zebrafisk kontinuerligt exponerade för olika försöksvatten under tre veckor. Data visar medelvärde + standardavvikelse av kumulativ äggläggning hos tre replikat per försöksvatten över sju dagars reproduktion.. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol.

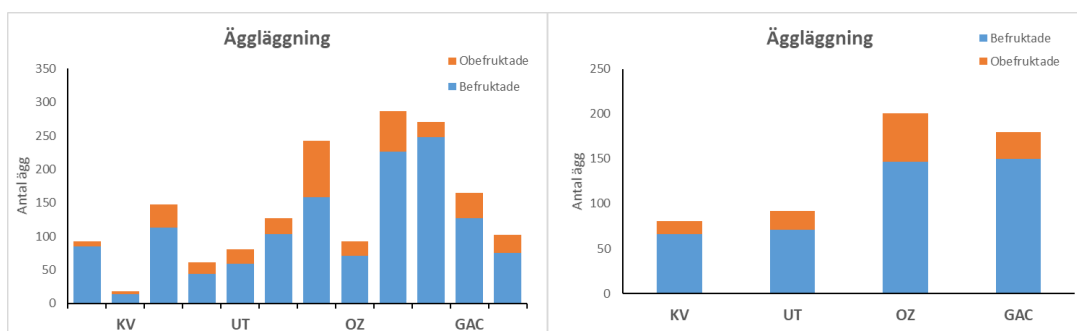


Fig 6. Äggläggning hos zebrafisk kontinuerligt exponerade för olika försöksvatten under tre veckor. Data visar antal befruktade och obefruktade ägg hos de tre replikaten av försöksvatten (vänster), samt medelvärde hos olika försöksvattnen (höger), beräknat per antal ingående honor under sammanlagt sju 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 9 minuter, vare sig för honor eller hanar (Tabell 4). Den totala simdistansen varierade stort mellan försöksvatten och replikatakvare. Hanar simmade i medel 87 meter i KV, 77 meter i UT, 61 meter i OZ, samt 92 meter i GAC. Honor simmade i medel 64 meter i KV, 61 meter i UT, 77 meter i OZ, samt 67 meter i GAC. Statistisk analys av riktningkoefficienten (k-värdet), dvs förändring av simaktiviteten över tid, visade skillnad mellan OZ och de andra försöksvattnen. Både honor och hanar i OZ har en låg simaktivitet i försökets start relativt de andra försöksgrupperna. Mönstret i simaktivitet skiljer sedan för könen, där hanar uppvisar en låg simaktivitet under försöksperioden, medan honor uppvisar en kontinuerligt ökande simaktivitet jämfört med de andra försöksvattnen (Fig. 7).

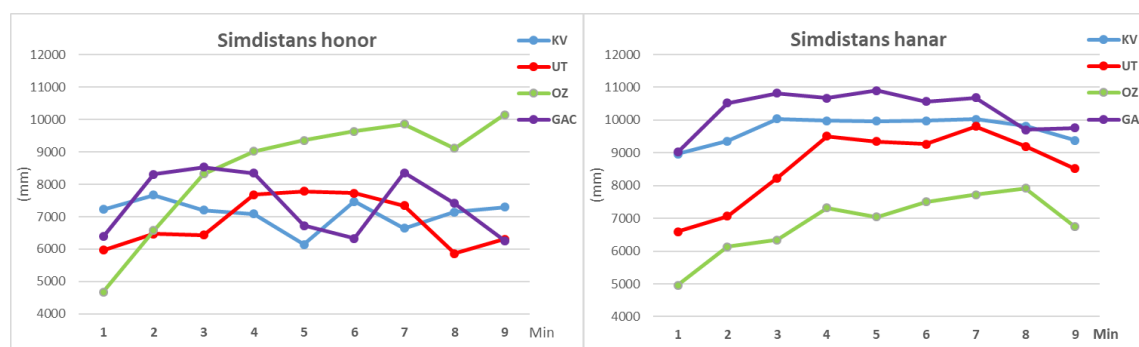


Fig. 7. Simbeteende hos honor (vänster) och hanar (höger) av zebrafisk exponerade för olika försöksvattnen. Data visar medelvärden av simdistans (punkter) under nio minuters beteendestudie efter tre veckors kontinuerlig exponering. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT 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 förelåg en skillnad mellan honor och hanar. Ingen skillnad i något genuttryck uppmättes efter försöksvattenexponering, varken hos hanar eller honor. Undantaget var uttrycket av metallothionein (MT), där KV hade högre uttryck i jämförelse med de andra försöksgrupperna, både för honor och hanar (Fig. 8, Tabell 5).

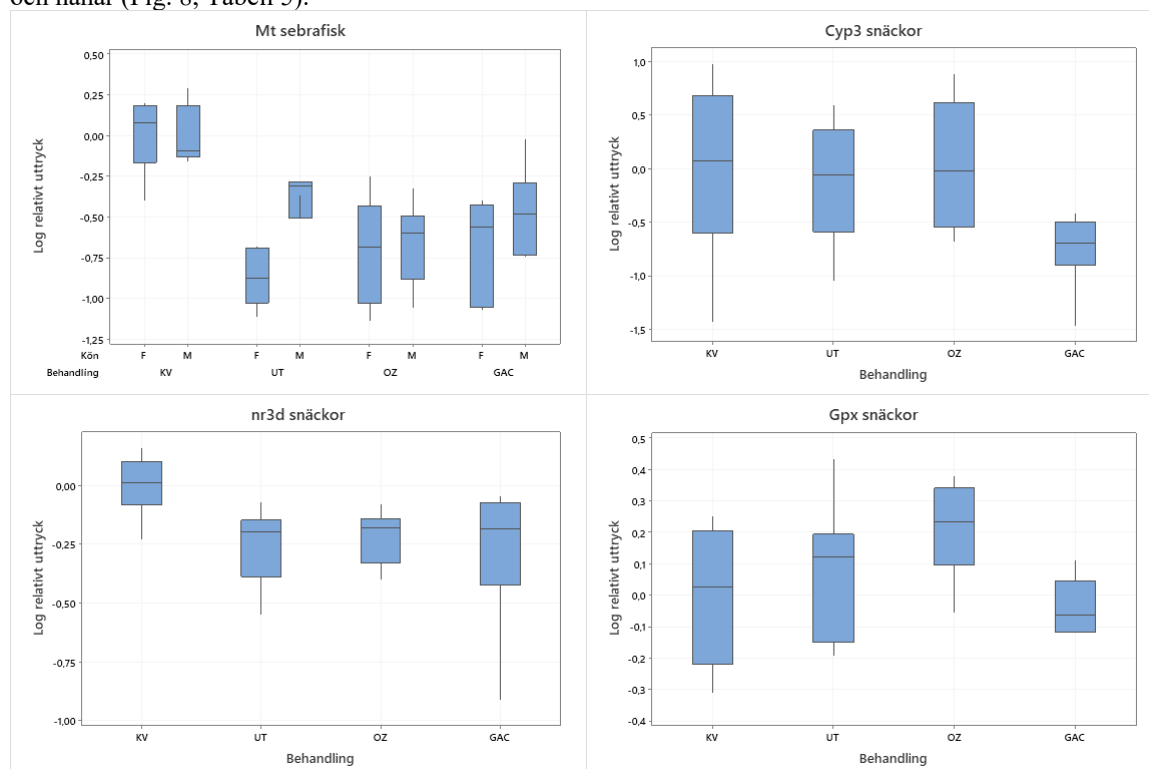


Fig. 8. Genuttryck relativt medelvärdet för respektive kontrollgrupp för djur exponerade för de olika försöksvattnen (KV, UT, OZ och GAC). Överst till vänster: Zebrafisk, metallothionein (Mt) i honor (F) och

hanar (M). Övriga dammsnäckor *Cyp3* (Överst till höger), *nr3d* (Nederst till vänster) och *Gpx* (Nederst till höger). 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 innebar att temperaturerna i vattnet påverkades till viss del av den varierande temperaturen utomhus, vilket kännetecknades av något varmare temperatur de sista dagarna (24,5 °C). Medeltemperaturerna i snäckornas vatten var dock relativt lika mellan veckorna: 22,1; 20,9 och 22,0 °C under respektive vecka 1, 2 och 3. Temperaturerna i de olika behandlingarna var dock alltid densamma.

Det förekom mortalitet i alla exponeringsgrupper (Fig. 9). Denna var dock statistiskt högre i GAC-gruppen jämfört med i kranvattengruppen, dock ej i jämförelse med de andra avloppsvattengrupperna. Totalt överlevde endast 32% av snäckorna i GAC-gruppen medan 84% överlevde i KV-gruppen. Överlevnaden i UT- och OZ-grupperna låg på 60 respektive 68%.

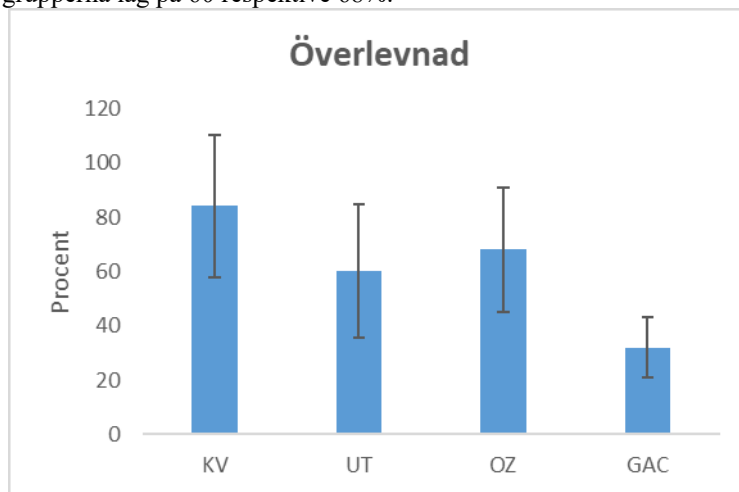


Fig. 9. Överlevnaden hos dammsnäckor kontinuerligt exponerade för olika försöksvatten under tre veckor. Data visar medel och standardavvikelse av överlevnaden i fem replikat av vardera behandlingsgrupperna. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol

Ingen skillnad förekom i vikt, längd eller BCF mellan de överlevande snäckorna i de olika vattnen (Tabell 6). Äggproduktionen visade generellt stor spridning. Det var inga skillnader i antalet lagda ägg, antal befruktade ägg (Fig. 10) 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.

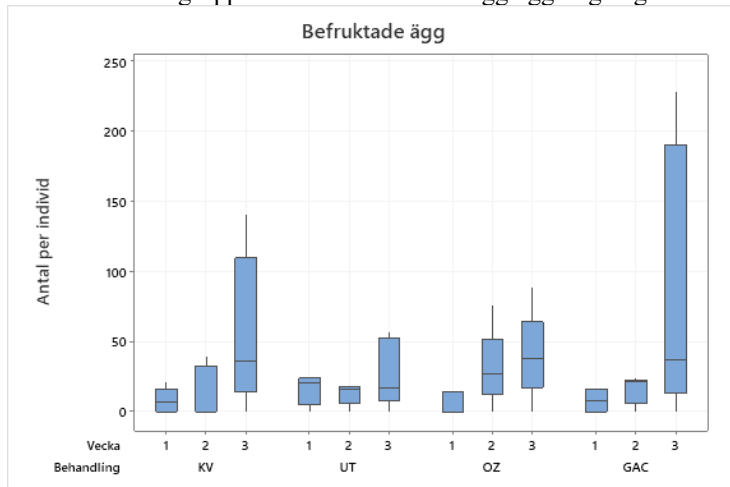


Fig. 10. Antal befruktade ägg/individ per vecka hos dammsnäckor under tre veckors kontinuerlig exponering för olika försöksvatten. Data visar spridningen inom fem replikat av vardera behandlingsgrupperna. KV=kranvatten, UT=utgående avloppsvatten, OZ=ozonbehandlat UT, GAC= UT filtrerat genom granulerat aktivt kol.

Cyp3a som indikerar avgiftningsmetabolism var signifikant lägre uttryckt i GAC-gruppen jämfört med de andra grupperna (Tabell 6). Nr3d som indikerar uttryck för en hormonreceptor var lägre uttryckt i alla de olika avloppsvattnen jämfört med i kranvattengruppen. Gpx som är ett enzym som är involverat vid oxidativ stress hade högre uttryck i snäckor i OZ-gruppen än i GAC-gruppen. Däremot skiljde de sig inte från snäckor i KV- eller UT-grupperna. De övriga genuttrycken visade inte några skillnader mellan grupperna. Det var heller inga skillnader i uttrycket av EF mellan snäckor i de olika vattengrupperna och därmed kunde EF anses vara relevant som referensgen.

Celltester

Vid undersökningar av vattenprover tagna under försöksperioden för fisk och snäckor uppmättes relativt hög AR-aktivitet i samtliga prover utom KV, och de olika behandlingarna av vattnet verkade inte påverka AR-aktiviteten (Tabell 7). Inget av proverna uppvisade AR-aktivitet. Blockering av androgenreceptorn (anti-AR-aktivitet) uppmättes endast i UT vid den upprepade provtagningen och då mycket nära detektionsgränsen. För östrogen aktivitet (ER-aktivitet) uppmättes relativt låga aktiviteter vid första provtagningen, medan upprepat prov av UT hade en högre ER-aktivitet om 1810 pg östradiolekvivalenter per liter. Nrf2-aktivitet (oxidativ stress) uppmättes i samtliga prover, förutom efter GAC-behandling. Aktivering av Ah-receptorn uppmättes i samtliga prover i relativt hög omfattning.

Diskussion

Syftet med denna studie var främst att utvärdera om utökat avancerad avloppsrening med hjälp av ozon eller kolfiltrering förbättrar biologiska funktioner i de valda testmodellerna.. Generellt sågs inte några betydande negativa effekter av utgående avloppsvatten i någon av de tre olika biologiska modellerna som användes, med undantag för AhR-aktiviteten i celltesterna som var relativt hög jämfört med andra studier (Neale et al. 2020). Med mer omfattande negativ påverkan av UT hade förändringar av de uppmätta hälsoparametrarna troligen kunnat observeras tydligare efter avancerad rening med OZ och GAC. Resultaten visar i vissa fall skillnader mellan kranvattnet (KV) och en eller flera av de andra försöksvattnen. Detta kan tolkas som att de andra vattnen är av sämre kvalitet än kranvattnet. Det ska dock förtydligas att den huvudsakliga frågeställningen i denna undersökning var om de avancerade reningsstegen (OZ och GAC) förändrar vattenkvaliteten i jämförelse med det ordinarie utsläppsvattnet (UT). I detta fall ska kranvattnet snarare ses som en referens till att metodiken fungerar optimalt snarare än som en traditionell kontrollgrupp.

Efter tre veckors kontinuerlig exponering sågs inga skillnader i kroppslängd, kroppsvikt eller kroppsindex (BCF) vare sig hos zebrafisk eller dammsnäckor. Detta indikerar 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-GAC, även om överlevnaden hos GAC var lägst. Samtidigt som GAC-gruppens överlevnad var relativt låg så var alla andra kropps mått hos dammsnäckorna opåverkade i jämförelse med alla andra grupper. När snäckor dör försämrar vattenkvaliteten i burken ganska snabbt om inte den döda snäckan tas bort. Om dödsfallet inträffar på eftermiddagen så innebär det en ganska lång tid innan någon upptäcker detta vid den dagliga tillsynen och då kan vattenkvaliteten vara betydligt försämrad så att fler snäckor hinner påverkas negativt. 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 hos den enskilda organismen men även på populationsnivå. I avloppsvatten finns uppskattningsvis många tusen olika kemikalier. Många av dessa kan ha en direkt påverkan på hormonella system hos djur, såsom endokrin störande kemikalier, och därmed påverka både könsutveckling och könsmognad hos individen och därmed även reproduktion. Andra kemikalier i avloppsvatten kan genom negativ hälsopåverkan indirekt påverka reproduktionen eller avkommans kvalitet. I denna studie sågs att zebrafiskar i KV reproducerade sig färre gånger än i de andra försöksvattnen. Förklaringen kan bero på att kranvattnet inte är en optimal vattenmiljö för fiskar, eftersom vattnet kan sakna en stabil grund av etablerade mikroorganismer och möjlig brist på spårämnen. Sammantaget reproducerade sig OZ och GAC mer än UT och lade samman taget även betydligt fler ägg än UT, även om skillnaden inte kunde påvisas statistiskt. Liknande resultat sågs vid våra tidigare studier i Knivsta (Pohl et al. 2018) där OZ lade dubbelt fler ägg än KV och UT (GAC utvärderades ej). En ökad äggproduktion kan därför vara svar på en förbättrad vattenkvalitet och därmed levnadsmiljö för fiskarna. Resultaten efter avancerad rening, i denna studie genom OZ och GAC, kan bero på en relativt optimal miljö för fisken, vilken resulterar i en förbättrad reproduktion, jämfört med suboptimal vattenmiljö i KV och UT. Sammantaget kan resultatet från reproduktionsundersökningar förklaras av att OZ och GAC antingen uppvisar en ökning i reproduktiv framgång eller en normal nivå av reproduktion. 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 den tredje veckan i jämförelse med de två första veckorna. Sannolikt beror detta på att temperaturen i containern och därmed också vattentemperaturen var högre de sista dagarna mot slutet av försöket, vilket skulle kunna påverka denna typ av respons. Temperaturerna var dock densamma i alla exponeringsgrupper varpå denna effekt kunde ses i alla exponeringsgrupper.

Simbeteende zebrafisk

I denna studie uppvisade både honor och hanar hos zebrafisk exponerade för OZ påverkan på simaktivitet. Honor och hanar skilde 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 sågs i zebrafisk exponerad för OZ vid studie som utfördes vid Knivsta ARV (Pohl et al. 2018). I studien av Pohl et al. (2018) särskiljdes inte könen avseende simaktivitet, men fisk från OZ simmade kortare första minuterna för att sedan normaliseras mot de andra försöksvattnen mot slutet av

perioden. Detta kan ses även i denna studie om resultaten från både honor och hanar slås samman. Skillnader mellan könen avseende simbeteende kan bero på skillnad i fysiologi och därmed skillnad i känslighet för innehållet av olika ämnen i vattnet. Detta är troligen en effekt som inte skulle påverka vattenlevande organismer i en recipient inberäknat utspädningsfaktorn. Orsaken till det avvikande simbeteendet är okänd. Avvikande simbeteende hos både hanar och honor i OZ kan bero på påverkan från individuella kemikalier eller blandningar av dessa i OZ. Många kemikalier som finns i avloppsvatten, inklusive läkemedel, har i labbförsök 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. 70%, men vissa läkemedel bryts ner sämre än andra. Ozon bygger på sönderbrytning av kemikalier till skillnad från uppfångst av kemikalier som GAC. Vid sönderbrytning av enstaka kemikalier kan det skapas nedbrytningsprodukter av dessa som är mer giftiga än själva modersubstansen. Den kemiska analysen som användes visar minskning av modersubstansen men säger inget om vilka nedbrytningsprodukter som bildas. I OZ 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, såsom zebrafisk i denna studie. Vi har i tidigare labbförsök visat att giftigheten av läkemedlet karbamazepin ökar efter ozonbehandling beroende på bildning av specifika nedbrytningsprodukter av modersubstansen (Pohl et al. 2019). Kemisk karakterisering av nedbrytningsprodukter vid ozon-behandling av vatten, både gällande avlopps- och dricksvatten, är därför viktigt för att säkerställa en icke-giftig miljö i recipienten till reningsverk, samt även som livsmedel till djur och människor. En ytterligare orsak till det avvikande simbeteendet kan bero på överskott av gaser i fiskens blod och vävnader vilket kan orsaka s.k. gasblåsesjuka. Detta kan bero på gasöversättning orsakad av ozonrester i vattnet, överskott av syre eller en kombination av dessa samt andra gaser i vattnet. Både uppsamlingstunnorna utanför och inne i container för OZ luftades varför överskott av ozon eller syrgas inte är troligt. Den okulära besiktningen av fisk under försöket visade inte på tecken på vanliga kliniska effekter av gasblåsesjuka, t.ex. utsvällda ögon, gasblåsor i skinnet etc, varför gasblåsesjuka är mindre troligt. Framtida labbförsök bör undersöka effekten av ozonering på både vanligt förekommande kemikalier i avloppsvatten och även ozon i sig, för att utröna ozonering som reningsmetod 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 i 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 deras 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 den 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 referensgenen Tmem50a. Detta är inte konstigt då fysiologin mellan könen skiljer sig. Exempelvis sågs ca 4000 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 genuttrycket 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 ett annat reningsverk också sett detta mönster med högre uttryck av MT i fiskar som exponerats för kranvatten (opublicerade data).

För snäckorna sågs fler skillnader i uttryck mellan vattengrupperna. Nr3d som indikerar uttryck för en hormonreceptor var lägre uttryckt i alla de olika avloppsvattnen jämfört med i kranvattengruppen. Här kunde dock inga förändrade effekter noteras i jämförelsen mellan de olika behandlingarna av avloppsvatten. Gpx (glutathionperoxidas) som är ett enzym som är involverat vid oxidativ stress hade signifikant högre uttryck i snäckor i OZ-gruppen i jämförelse med GAC-gruppen. Däremot skiljde de sig inte från snäckor i KV- eller UT-grupperna. Man kan alltså inte dra slutsatsen att Ozon eller GAC förändrar vattenkvaliten i jämförelse med UT-vattnet baserat på denna mätning. Cyp3a som indikerar en typ av avgiftningsmetabolism var signifikant lägre uttryckt i GAC-gruppen jämfört med alla de andra grupperna. Uttrycket av Cyp3 var ca 5 gånger lägre i GAC-gruppen jämfört med KV-gruppen. Cyp3 är ofta inblandat i metabolism av läkemedel och en tolkning av denna nedgång i GAC-gruppen skulle kunna vara att det är mindre halter av läkemedel i denna grupp jämfört med de andra. De uppmätta halterna av läkemedel visar visserligen att UT och OZ innehåller högre halter av läkemedel än GAC men samtidigt har KV betydligt lägre halter (Tabell 3). Detta resultat var också annorlunda än vad som sågs vid analys av motsvarande gen hos zebrafiskar (Cyp3a65), där vi inte hade skillnader mellan grupperna. De övriga genuttrycken visade inte några skillnader mellan grupperna. 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.

Celltester

Resultaten för fler av de effektparametrar som studerats med cellbaserade in vitro-metoder visar begränsad effektivitet för de studerade reningsmetoderna OZ och GAC. Det gäller både för AR och ER. Detta är i viss mån förvånande, då ozonering och GAC-filtrering ofta, men inte alltid, minskar denna typ av aktivitet i vattnen. ER-aktiviteten i proverna var dock genomgående låga och det gick inte att se något tydligt mönster i reningseffektivitet för de studerade metoderna. Aktiviteten av AhR och Nrf2 visade dock på en förbättring i de renade vattnen. En relativt hög aktivering av Ah-receptorn uppmättes i samtliga analyserade prover, förutom KV vid den upprepade provtagningen. Anledningen till den upprepade analysen var framförallt AH-receptoraktiviteten som bedömdes osedvanligt hög vid analys av kranvatten taget under försöksperioden. De upprepade analyserna visade betydligt lägre AhR-aktivitet i KV.

Det finns en grad av osäkerhet i tolkningen mellan effekter framtagna in vitro och in vivo. Trots detta kan resultaten från de cellbaserade metoderna sättas i ett perspektiv sett till toxiciteten på vattenlevande djur t. ex. fisk för att lättare belysa innebörden. Cellmetoderna indikerar att de olika avloppsvattnen hade aktivitet på AR motsvarande 1053 (UT) och 1929 (PAC) pg/l DHT. Detta innebär att jämförelser kan göras med vilka androgena effekter som sker med vattenlevande djur då de exponeras för ca 2000 pg/L (2 ng/l) DHT i ett vatten. Tydliga hormonstörande effekter på fisk orsakade av exponering av DHT har visats vid 100 ng/l (Baumann et al. 2013). De cellbaserade metoderna tyder därmed på att koncentrationen i PAC vattnet ligger ca 50 gånger lägre än vad som orsakar en tydlig androgen effekt på fisk. Den uppmätta androgena effekten i utgående avloppsvatten är i samma storleksordning som tidigare publicerade studier (Neale et al. 2020).

Generellt kan sägas att de uppmätta ER-aktiviteterna i avloppsvattenproverna ligger i samma storleksordning som tidigare studier med effektbaserade in vitro-metoder, snarast i det lägre intervallet (Neale et al. 2020, Lundqvist et al. 2019) Den högsta aktiviteten av ER i celltesterna påvisades i PAC och detta motsvarar ungefär den aktivitet som 0,5 ng/l E2 orsakar. Hormonstörande effekter av E2 i fisk kan påvisas vid en exponering högre än 24 ng/l då könskvoten i en fiskpopulation blir tydligt påverkad mot fler honor (Holbech et al 2006). Detta innebär att PAC hade en ER-aktivitet som ligger mer än 50 gånger lägre än vad som orsakar en östrogen effekt på fisk. Vidare kan östrogeniciteten i proverna jämföras med föreslagen effektbaserad åtgärdsgräns, vilket anger nivån under vilken effekten kan anses vara acceptabel för vattenlevande organismer. Bedömningsgrunden för kustnära vatten avseende 17 β -östradiol (E2) är satt till 80 pg/l (HVMFS 2019). Analyserna i denna studie indikerar, medräknat utspädningsfaktor till recipienten på ca. 10-600 gånger beroende på säsong, att östrogeniciteten i UT kan överskrida den uppsatta bedömningsnivån (UT – 1810 pg/l). Vattenlevande organismer i recipienten bedöms som mer utsatta för exponering av östrogena ämnen än människor. Som jämförelse uppfördes nyligen 17 β -östradiol (E2) på bevakningslistan i EU:s dricksvattendirektiv med ett riktvärde på 1000 pg/l (EU 2020/2184). De två dricksvattenprover som analyserats i denna studie ligger under detta riktvärde. Någon anti-AR aktivitet kunde inte detekteras i något vatten. Även om dessa mätningar indikerar avsaknad av könshormonpåverkan av de olika avloppsvattnen är det noterbart att både den östrogena och androgena aktiviteten är något högre i de vatten som genomgått avancerad rening i jämförelse med det ordinarie utsläppsvattnet (UT).

Som referenskemikalie för oxidativ stress/Nrf2-aktivitet användes tertiär butylhydrokinon (tBHQ). Toxiciteten av tBHQ på fisk har rapporterats att vara 150 µg/l (LC50) (Cope et al. 1997), vilket skulle innebära att UT har en aktivitet som motsvarar ca 10 gånger lägre koncentration än vad som orsakar toxicitet. Den högsta aktiviteten av Nrf2 mättes upp i KV-vattnet i den första provtagningsomgången. Detta prov uppvisade också en viss cytotoxicitet i den högsta testade koncentrationen, så värdet bör tolkas med viss försiktighet. Vid upprepade provtagningar var Nrf2-aktiviteten något lägre i KV än i UT. PAC och GAC visade en tydlig sänkning av Nrf2-aktiviteten jämfört med UT. De uppmätta värdena för oxidativ stress i avloppsvatten (efter såväl konventionell som avancerad behandling) är i samma storleksordning som tidigare och pågående studier (Lundqvist et al 2019 + opublicerade data). UT hade den högsta AhR-aktiviteten med motsvarande ca 12 ng/L av referenskemikalien 2,3,7,8-tetraklordibenso-p-dioxin (TCDD). Om denna aktivitet skulle jämföras med ett scenario där exponeringen kommer från TCDD kan man konstatera att detta är i samma storleksordning som vad som är visat kan orsaka toxiska effekter på fisk (King Heiden et al. 2009). Dessa effekter kunde inte ses i fiskförsöket och detta tyder på att resultaten för AhR-aktivitet bör tolkas med försiktighet. Aktiviteten som uppmäts i de celltesterna baseras på effekten av alla ingående kemiska ämnen som finns i vattenproverna, där var och en av kemikalierna kan ha olika toxiska egenskaper. En direkt översättning mellan eventuell toxicitet och uppmätt aktivitet från de använda referenskemikalierna i celltesterna är därför osäker.

Analyserna av genuttryck i fiskar och snäckor verkar inte tydligt motsvara resultatet av aktiviteter i cellmetoderna. Zebrafiskarna visade inte någon skillnad mellan vattengrupperna i de genuttryck som motsvarades av aktiviteter i cellmetoderna. Vissa av generna för snäckor visade visserligen några skillnader mellan vattengrupperna, men inte liknande mönster som för aktiviteterna i celltesterna. Tittar man på de uppmätta halterna av läkemedel är det heller inte troligt att dessa i sig skulle vara tillräckligt höga för att orsaka varken en påfallande förändring i genuttryck eller direkta toxiska effekter på de båda modellorganismerna. Det är dock viktigt att komma ihåg att det finns väldigt många andra ämnen än läkemedel närvarande i avloppsvatten som kan ge toxisk påverkan i både cellmetoden och i akvatiska djur.

Slutdiskussion:

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 nolleffektkoncentrationen (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. Reningseffektiviteten visar att både OZ och GAC reducerar läkemedelshalterna, men bättre rening ses med GAC jämfört med OZ. 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 -etinylöstradiol (EE2) och 17- β -östradiol (E2). På kandidatlistan har även diskuterats sulfametoxazol, trimetoprim, venlafaxin och flukonazol som alla mättes under försöksperioden för zebrafisk och dammsnäckor (Tabell 3). Reningsgraden av individuella läkemedel i denna studie varierar stort, där sämst rening ses för OZ avseende venlafaxin (50% reduktion) och flukonazol (20% reduktion). Gränsvärdena för ciprofloxacin och diklofenak i ytvatten i kustnära recipienter är 100 respektive 10 ng/L. I denna studie uppmättes låga ng/L-halter för ciprofloxacin oavsett reningsmetod. För diklofenak uppmättes högst halter i UT, med en medelkoncentration av 247 ng/L. Inberäknat en utspädningsgrad av 10-600 gånger till recipienten kan ciprofloxacin inte anses överskrida uppsatt gränsvärde för ytvatten, men för diklofenak överskrids gränsvärdet och uppföljande analyser bör göras för att säkerställa koncentrationen i recipienten. Kemiska analyser av läkemedel i recipienten bör även relateras till PNEC-värden (Tabell 3) för att skattas gällande akut miljörisk. För flertalet läkemedel uppmätta i UT i denna studie indikerar PNEC-värdet inberäknat utspädningsfaktor att det kan föreligga en risk för negativ påverkan på organismer, ex. citalopram, diklofenak, karbamazepin, klaritromycin, metoprolol, oxazepam, sulfametoxazol och venlafaxin.

Sammantaget ses generellt vara resultat avseende biologiska effekter i denna studie, både gällande negativa och positiva effekter. Givet den relativt höga variationen i utspädningsfaktor till recipienten kan det antas att den akuta miljörisken för vattenlevande organismer är låg, med undantag för vissa 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. 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 reningsverket är kroniskt exponerade varför långtidseffekter är högst relevanta. 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 Lindholmens reningsverk för att kunna följa upp vattenförbättrande åtgärder.

Slutsatser:

- De biologiska undersökningarna visade i stort 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 tendenser till förhöjd reproduktion hos zebrafiskar både i OZ- och GAC-grupperna.
- Hos zebrafisk exponerade för OZ observerades påverkan på simbeteende hos både honor och hanar. Orsaken är okänd. Givet utspädningsfaktorn till recipienten är det troligt att detta inte kommer att påverka organismer i recipienten.
- Med celltesterna kunde ingen tydlig förbättring påvisas av avancerad rening av UT, snarare tvärtom gällande östrogen- och androgen aktivitet. De uppmätta läkemedlen reduceras med avancerad rening varför orsaken till detta troligen är andra icke-analyserade ämnen.
- Hos zebrafisk påvisades ett högre uttryck av metallmetabolism i KV. Även celltesterna påvisade att kranvattnet innehåller östrogena-, dioxinliknande-, samt reaktiva ämnen. Fortsatta undersökningar av kranvatten rekommenderas för att säkerställa orsaksämnena.
- För flertalet läkemedel uppmätta i nuvarande utgående avloppsvatten (UT) indikerar PNEC-värdet inberäknat utspädningsfaktorn att det kan föreligga risk för negativ påverkan på vattenlevande organismer i recipienten.

Referenser

- Bandow C., Weltje L. 2012. Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Sci Total Environ* 435–436, 90–95
- Baumann L., Holbech H., Keiter S., Kinnberg K.L., Knörr S., Nagel T., Braunbeck T. 2013. The maturity index as a tool to facilitate the interpretation of changes in vitellogenin production and sex ratio in the Fish Sexual Development Test. *Aquat Toxicol.* 128-129:34-42
- Björleinius B, M Ripszám, P Haglund, R H Lindberg, M Tysklind, J Fick (2018) Pharmaceutical residues are widespread in Baltic Sea coastal and offshore waters - Screening for pharmaceuticals and modelling of environmental concentrations of carbamazepine. *Sci Total Environ.* 15;633:1496-1509
- Brion F, C R Tyler, X Palazzi, B Laillet, J M Porcher, J Garric, P Flammarion (2004) Impacts of 17beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 24;68(3):193-217.
- Brodin T., Fick, J., Jonsson, M., Klaminder, J., 2013. Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* 339, 814–815.
- Cope W.G. Bartsch, M.R. Marking L.L. 1997. Efficacy of candidate chemicals for preventing attachment of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 1930-1934.
- EU 2020/2184. EUROPAPARLAMENTETS OCH RÅDETS DIREKTIV (EU) 2020/2184. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SV/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020L2184&from=SV>
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E.F., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C., Guillette Jr., L.J., 2001. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40 (3), 392–398.
- Folmar L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette 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. *Environ. Health Perspect.* 104 (10), 1096–1101.
- Havs- och vattenmyndigheten. (2019). Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om klassificering och miljö kvalitetsnormer avseende ytvatten, HVMFS 2019:25.
- Holbech H., Kinnberg K., Petersen G.L., Jackson P., Hylland K., Norrgren L., Bjerregaard P. 2006. Detection of endocrine disruptors: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144, 57-66

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. *Environ. Health Perspect.* 117, 797–802.

Jobling S., Coey, S., Whitmore, J.G., Kime, D.E., Van Look, K.J., McAllister, B.G., Beresford, N., Henshaw, A.C., Brighty, G., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 2002. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biol. Reprod.* 67 (2), 515–524.

Jobling S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 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 U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ. Health Perspect.* 114 (1), 32–39.

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. *Aquat. Toxicol.* 122–123, 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. *PNAS* 104, 8897–8901.

King Heiden T.C., Spitsbergen J., Heideman W., Peterson R.E. 2009. Persistent Adverse Effects on Health and Reproduction Caused by Exposure of Zebrafish to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin During Early Development and Gonad Differentiation *Toxicol Sci.* 109, 75–87.

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. *Front. Environ. Sci.* 4.

Kunz, P., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N., & Kasea, R. (2015). In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106, 107–115.

Lundqvist J, Mandava G, Lungu-Mitea S, Lai FY, Ahrens L. (2019) In vitro bioanalytical evaluation of removal efficiency for bioactive chemicals in Swedish wastewater treatment plants. *Scientific Reports* 9:7166

Neale, P., Leusch, F., Escher, B. (2020) Effect Based Monitoring in Water Safety Planning – Medium to high throughput bioanalytical tools and decision-making tool for selection of bioassays, – GWRC EBM in WSP – WP3.2

Näslund J., Fick, J., Asker, N., Ekman, E., Larsson, D.G.J., Norrgren, L., 2017. Diclofenac affects kidney histology in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) at low µg/L concentrations. *Aquat. Toxicol.* 189, 87–96.

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay. <https://doi.org/10.1787/9789264185265-en>

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test. <https://doi.org/10.1787/9789264264335-en>

Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.

Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A., Qi, X., 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Morphol.* 218 (2), 203–224.

Socialstyrelsen 2022. <https://www.socialstyrelsen.se/statistik-och-data/statistik/alla-statistikamnen/lakemedel/Bilaga-Tabeller-Statistik-om-lakemedel-2021-Uppdaterad-2022-08-10>.

Van Aerle R., Nolan, T.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. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (12), 2841–2847.

Ågerstrand M, (2019) Derivation of PNECs for 39 pharmaceutical substances. ACES report number 36, Department of environmental science and analytical chemistry, Stockholm University 2019

Örn S., Holbech, H., Norrgren, L., 2016. Sexual disruption in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to mixtures of 17α-ethinylestradiol and 17β-trenbolone. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 41, 225–231.

Tabell 3. 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 Zebrafisk	°C	27,0±0,2	25,7±1,9	26,2±0,3	25,5±0,6		
Temperatur Dammsnäcka	°C	21,6±1,8	21,6±1,8	21,8±1,8	21,8±1,7		
Surhet	pH	8,18±0,07	7,26±0,1	7,13±0,18	7,4±0,16		
Konduktivitet	µS/cm	282±2,3	1220±152	1186±139	1205±147		
TOC (Totalt organiskt kol)	mgC/L	4,3*	12,3±1,4	11±1,5	6,4±1,2		
Läkemedel						PNEC**	PNEC***
Atenolol	ng/l	<5	413±26	200±45	29±34	32000	150000
Ciprofloxacin	ng/l	<10	24±6	<20±0	10±4	64	89
Citalopram	ng/l	<5	313±24	114±56	<10±6	0,075	16000
Clopidol	ng/l		<10±0	<10±0	<10±0		
Krotamiton	ng/l		<10±0	<10±0	<10±0		
Diklofenak	ng/l	<10	247±113	<10±0	57±73	50	50
Erytromycin	ng/l	<20	<10±0	<10±0	<10±0	20	200
Flukonazol	ng/l	<1	217±39	175±25	27±28		
Furosemid	ng/l		50±49	<30±0	<30±0	156	
Ibuprofen	ng/l		143±98	63±48	40±26	102000	
Karbamazepin	ng/l	<3	460±67	29±24	28±28		50
Ketokonazol	ng/l	<10	<100±0	<500±0	<10±0		
Klaritromycin	ng/l	<1	112±62	20±15	<10±0		120
Losartan	ng/l	<5	738±893	<10±0	12±9		78000
Metoprolol	ng/l	<5	2500±374	1330±570	78±87	2590	8600
Metotrexat	ng/l		<10±0	<10±0	<10±0		
Naproxen	ng/l		155±25	<30±0	<30±7	15000	1700
Oxazepam	ng/l	<5	527±54	275±75	40±42	10	
Paracetamol	ng/l		<10±0	28±23	<10±0	46000	134000
Primidon	ng/l		75±22	41±15	14±12		
Propranolol	ng/l	<50	105±31	<10±0	<10±0	228	410
Sertralin	ng/l	<10	86±12	25±8	<10±0	9,4	91
Sotalol	ng/l	<0,5	50±16	<10±0	<10±2		
Sulfadiazin	ng/l		275±225	<50±0	<10±0		4600
Sulfametoxazol	ng/l	<5	310±170	20±15	35±35	118	600
Tramadol	ng/l	8	433±63	215±65	32±38		
Trimetoprim	ng/l	1	160±22	10±5	<10±2	500	100000
Venlafaxin	ng/l	<0,5	683±123	315±125	63±69		38, 42000
Zolpidem	ng/l	<0,5	<10±0	<10±0	<10±0		
Summa läkemedel	ng/L	9	8077	2858	464		
Reningsgrad****	%			70	94		

*Data från Norrvatten

** Rekommenderade PNEC-värden Ågerstrand 2019

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

****Medelreningsgrad beräknat per enskilt ämne

Tabell 4. 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})

Respons	Enhet	KV	UT	OZ	GAC
		Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD	Medel±SD
<i>Storlek/överlevnad</i>					
Överlevnad	%	100	100	100	100
Vikt honor	mg	777 ±110	815 ±218	722 ±101	781 ±98,1
Vikt hanar	mg	650 ±79	638 ±65	638 ±101	665 ±55
Längd honor	mm	39,6 ±2,1	40,6 ±3,5	39,9 ±1,8	40,1 ±1,9
Längd hanar	mm	38,5 ±1,2	38,0 ±1,1	38,6 ±2,2	38,7 ±1,2
BCF honor	g*cm ⁻³ *100	1,26 ±0,14	1,20 ±0,12	1,13 ±0,10	1,20 ±0,08
BCF hanar	g*cm ⁻³ *100	1,14 ±0,06	1,17 ±0,10	1,11 ±0,11	1,15 ±0,08
<i>Reproduktion</i>					
Lektillfällen	Antal/21 lekdagar	16 ^A	19 ^B	21 ^B	21 ^B
Äggläggning dag	Antal ägg/hona/dag	13,0 ±9,5	14,3 ±5,5	22,4 ±11	24,4 ±12
Äggläggning vecka - Total	Antal ägg/hona/vecka	399 ±43	494 ±39	663 ±69	722 ±56
- Befruktade ägg	Antal ägg/hona/vecka	273 ±66	299 ±38	470 ±77	513 ±81
- Obefruktade ägg	Antal ägg/hona/vecka	125 ±29	194 ±9,7	193 ±25	208 ±27
<i>Simbeteende</i>					
Simdistans honor	m/9min	63 ±27	61 ±7	76 ±17	66 ±2
Simbeteende honor	k-värde	-33,6 ^B ±42,8	22,5 ^B ±207,2	553 ^A ±161	-106 ^B ±58,4
Simdistans hanar	m/9min	87 ±18	77 ±25	61 ±26	92 ±11
Simbeteende hanar	k-värde	9,40 ^B ±315	284 ^B ±252	1180 ^A ±1400	1,86 ^B ±105

Tabell 5. Resultat för genuttryck hos honor och hanar av zebrafisk exponerad 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>				
Tmem50a	-0,010±0,28	-0,082±0,34	-0,029±0,34	0,056±0,35
Nrf2	-0,12±0,22	-0,18±0,18	-0,15±0,16	-0,11±0,12
Ar	0,090±0,20	0,071±0,20	0,15±0,16	0,10±0,16
Era	1,1±0,24	1,1±0,30	1,0±0,23	1,1±0,24
Cyp1a1	-0,046±0,22	-0,15±0,19	-0,13±0,13	-0,23±0,18
Cyp3a65	-0,42±0,65	-0,54±0,63	-0,61±0,70	0,078±0,54
Vtg1	1,8±0,15	1,9±0,18	1,8±0,17	1,8±0,14
Mt	0,0066±0,22 ^A	-0,87±0,18 ^B	-0,71±0,34 ^B	-0,68±0,30 ^B
<i>Hanar</i>				
Tmem50a	0,010±0,32	-0,0030±0,28	0,11±0,15	0,20±0,14
Nrf2	0,12±0,15	0,050±0,13	-0,048±0,062	-0,028±0,16
Ar	-0,090±0,19	-0,054±0,15	0,012±0,15	-0,002±0,091
Era	-1,1±0,24	-0,72±0,77	-0,56±0,80	-1,0±0,19
Cyp1a1	0,047±0,20	0,13±0,17	-0,022±0,16	-0,055±0,10
Cyp3a65	0,42±0,16	0,49±0,20	0,51±0,18	0,34±0,28
Vtg1	-1,8±0,77	-1,5±1,3	-0,96±1,5	-2,0±0,94
Mt	-0,0066±0,18 ^A	-0,42±0,25 ^B	-0,66±0,25 ^B	-0,47±0,27 ^B

Tabell 6. 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
<i>Storlek/överlevnad</i>					
Överlevnad	%	84±26 ^A	60±24 ^{AB}	68±23 ^{AB}	32±11 ^B
Vikt	g	1,19±0,24	1,47±0,11	1,40±0,17	1,49±0,24
Längd	mm	26,3±1,4	27,2±0,5	27,6±0,6	27,4±1,1
BCF	g*cm ⁻³ *100	6,44±0,55	7,13±0,22	6,59±0,56	7,23±1,24
<i>Reproduktion</i>					
Kokonger					
Vecka 1 ^A	Antal/indiv	0,25±0,33	0,30±0,19	0,12±0,18	0,22±0,23
Vecka 2 ^A	Antal/indiv	0,32±0,46	0,20±0,11	0,51±0,41	0,33±0,21
Vecka 3 ^B	Antal/indiv	1,12±0,83	0,40±0,35	0,69±0,55	1,55±1,66
Ägg					
Vecka 1 ^A	Antal/indiv	7,8±8,8	15,5±10,6	5,8±8,0	8,1±8,2
Vecka 2 ^A	Antal/indiv	14,1±19,6	13,1±7,7	31,1±27,8	15, 7±9,8
Vecka 3 ^B	Antal/indiv	57,3±55,6	28,0±24,4	40,2±31,8	88,8±97,4
Dåliga ägg					
Vecka 1	Antal/indiv	0,09±0,12	0±0	0,28±0,52	0±0
Vecka 2	Antal/indiv	1,00±2,24	0,15±0,22	0,20±0,27	0,05±0,11
Vecka 3	Antal/indiv	0,66±0,67	0,43±0,59	0,26±0,31	0±0
<i>Log rel. genuttryck</i>					
EF		0±0,16	-0,035±0,15	0,020±0,16	0,058±0,16
Cat		0±0,081	-0,076±0,14	0,0098±0,10	-0,10±0,26
Gpx		0±0,22 ^{AB}	0,018±0,31 ^{AB}	0,21±0,15 ^A	-0,096±0,22 ^B
Nr3d		0±0,13 ^A	-0,26±0,16 ^B	-0,22±0,11 ^B	-0,28±0,29 ^B
Cyp3a		0±0,78 ^A	-0,12±0,58 ^A	0,042±0,61 ^A	-0,76±0,34 ^B
YF		0±0,067	-0,036±0,061	-0,054±0,088	-0,030±0,065
MT		0±0,12	-0,18±0,23	-0,057±0,19	-0,011±0,26

Tabell 7. Uppmätta aktiviteter i celltester av olika försöksvatten. Översta tabellvärden analyserade i vattenprover tagna under försöksperiod för fisk och snäckor. Nedre tabell extra provtagning vid senare tillfälle

	AR	anti-AR	ER	Nrf2	AhR
Prov	DHT-ekv. pg/L	OHF-ekv. µg/L	E2-ekv. pg/L	tBHQ-ekv. µg/L	TCDD-ekv. pg/L
KV	inaktiv	inaktiv	156	22	1763
UT	1053	inaktiv	155	16	11823
OZ	1812	inaktiv	325	13	7739
GAC	1792	inaktiv	200	inaktiv	6313
PAC	1929	inaktiv	478	4	4555
LOD	247	0,007	17	4	518
	(pg DHT/L)	(µg OHF/L)	(pg E2/L)	µg tBHQ/L)	(pg TCDD/L)

	AR	anti-AR	ER	Nrf2	AhR
Prov	DHT-ekv. pg/L	OHF-ekv. µg/L	E2-ekv. pg/L	tBHQ-ekv. µg/L	TCDD-ekv. pg/L
KV	inaktiv	inaktiv	100	11	378
UT	inaktiv	0,069	1810	22	2280
LOD	29	0,069	12	5	117
	(pg DHT/L)	(µg OHF/L)	(pg E2/L)	µg tBHQ/L)	(pg TCDD/L)