

# Effektbaserade analyser för att utvärdera reningseffektivitet och miljörisker i avloppsvatten

Lärdomar från sex avloppsreningsverk  
med konventionell respektive  
avancerad rening



2022-11-07

Gisela Holm  
Linda Önnby



# Sammanfattning

Vi har i denna rapport utvärderat effektbaserade metoder som ett verktyg för att bedöma reningseffektivitet och miljörisker genom att analysera avloppsvatten på sex stora till medelstora avloppsreningsverk (ARV). De deltagande avloppsreningsverken finns i Borås, Eskilstuna, Gävle, Lidköping, Uppsala och Västervik. Målet var att undersöka hur effektbaserade analyser (*in vitro*-tester i celler) kan komplettera kemisk analys vid utvärdering av borttagning av mikroföroreningar vid konventionell avloppsrening samt med olika avancerade reningstekniker i labb- och pilotförsök. De avancerade reningsteknikerna som ingick var i) en process med en fluidiserad kolbädd, Opacarb®FL (Borås), ii) ozon efterföljt av en rörlig biofilmsreaktor med bärare, MBBR (Eskilstuna), samt iii) filtrering genom granulerat aktivt kol, GAK, som var uppförd i bänkskala (Uppsala).

De effektbaserade metoderna inkluderade parametrar för aktivering/blockering av könshormonreceptorer (effekter av hormonstörande ämnen) där östrogen aktivitet (ER-aktivitet) samt androgen (AR) och anti-androgen aktivitet ingick. Utöver dessa studerades också aktivering av arylhydrokarbonreceptorn (AhR, dioxinreceptorn), oxidativ stress genom aktivering av Nrf2, samt genotoxicitet genom mikrokärntest. Utöver effektbaserad analys har vi också inkluderat kemisk analys av utvalda mikroföroreningar som är vanligt förekommande i avloppsvatten. För utvärdering av befintlig rening togs det ut prover i inkommande och utgående avloppsvatten samt i recipient. För pilotprocesserna togs det ut prover före och efter det aktuella processteget.

Resultaten från denna rapport har tydligt visat att effektbaserade analyser är ett värdefullt och känsligt verktyg för att undersöka i) förekomsten av miljöfarliga ämnen i vatten ii) reningseffektivitet i befintliga konventionella reningsprocesser och iii) reningseffektivitet av nya tekniker i pilotanläggningar.

Flera av de parametrar som ingick i denna utvärdering av den befintliga processen: ER, oxidativ stress och AhR, uppvisade tydliga effekter i de flesta prover men effekterna minskade markant (i regel >80 %) över ARV. Trots detta var t.ex. ER-aktiviteten i utgående vatten fortfarande hög på flera av de studerade ARV. Detta visades tydligt genom hög ER-aktivitet (mätt som östradiolekvivalenter (E2eq)) i närliggande recipienter. Ett viktigt resultat, baserat på den effektbaserade analysen i recipienterna, var att nivåer motsvarande över bedömningsgrunden (årsmedelvärde) för 17 $\beta$ -östradiol för inlandsvatten (400 pg 17 $\beta$ -östradiol/L) och det föreslagna effektbaserade riktvärdet på 400 pg E2eq/L uppmättes i Lidköping, Uppsala och Eskilstuna. Dessutom uppmättes nivåer för den effektbaserade analysen som överskred bedömningsgrunden (årsmedelvärde) för god status för kustvatten på 80 pg 17 $\beta$ -östradiol/L för de två ARV som har kustvatten som recipient (Gävle och Västervik). Det bör nämnas att våra resultat speglar data från enstaka provtagningar, medan bedömningsgrunderna representerar årsmedelvärden där det är önskvärt att ta prover som speglar hela årets variation av den undersökta parametern, t.ex. östradiol. Däremot kan vi utifrån resultaten få en indikation på att recipienten är påverkad, vilket bör följas upp med ytterligare mätningar. Vi observerade att 85% av alla provtagningar avseende effektbaserade parametrar i recipienten resulterade i halter som överskred det effektbaserade riktvärdet eller bedömningsgrunden (årsmedelvärde). Från kemisk analys kunde inga sådana slutsatser dras då samtliga prov var under detektionsgräns (som varierade från 0,1 till 5 ng/L för recipientproverna), vilket tydligt demonstrerar styrkan med den betydligt känsligare effektbaserade analysen. En bidragande orsak till att vissa recipienter uppvisar högre halter relativt andra kan vara att utspädningen varierar stort mellan olika recipienter. Det är sannolikt att ER-aktiviteten i recipienterna är lägre när det råder högre flöden. Detta understryker betydelsen av att notera flödesdata i samband med provtagning, samt att förstå den enskilda recipientens flödesvariation. Även provtagning fördelat över året blir viktigt, för att få ett mer robust dataunderlag som kan jämföras med aktuella årsmedelvärden för t.ex. östradiol.

Till skillnad mot de övriga effektbaserade parametrarna observerades androgen (AR) och anti-androgen (anti-AR) aktivitet endast i begränsad omfattning i de analyserade proverna, vilket betyder att de parametrarna inte var lika användbara för utvärdering av reningseffektivitet, vilket i sin tur kan bero på att miljöriskerna av ämnen som orsakar sådana effekter var låga eller obefintliga i denna studie.

Vi har även studerat genotoxicitet för de sex olika reningsverken. Genotoxicitet har i vårt fall utvärderats binärt (ja/nej), där genotoxicitet antingen påvisas eller inte. En orsak till detta är att genotoxiska ämnen i många fall inte har någon tröskeldos. Vi observerade genotoxicitet för alla inkommande prover till ARV. Den befintliga reningen kunde, i de flesta fall, inte eliminera denna toxicitet, utan den fanns även i det utgående avloppsvattnet. Först i recipienten (nedströms) försvann genotoxiciteten i de flesta fall.

Eskilstuna var det enda reningsverket där det utgående renade avloppsvattnet leds igenom en våtmark innan recipient. Provtagningen därifrån uppvisade i några fall högre effekt för oxidativ stress, AhR och AR efter våtmark jämfört med utgående avloppsvatten (innan våtmark). Vi har däremot inte kunnat dra några säkra slutsatser från underlaget i denna rapport, vilket till stor del beror på att det är väldigt komplext att följa vattenströmmarna i våtmarken. Resultaten från denna rapport indikerar dock att det vore värdefullt att undersöka våtmarker närmare med hjälp av effektbaserade analyser och huruvida våtmarker har en positiv eller negativ effekt avseende reducering av mikroföroreningar och effekter på närliggande recipient.

För att rättvist jämföra de olika reningsteknikerna krävs det att de är testade på samma avloppsvatten. Så är inte fallet i denna undersökning, utan här ser vi snarare hur respektive teknik fungerar för respektive avloppsvatten. När vi undersökte hur de effektbaserade parametrarna förändrades genom avancerad rening kunde vi konstatera att aktivering av ER och AhR minskade ytterligare, jämfört med konventionell avloppsrening; >98% (ER) och ≥66-88% (AhR) för ozon medan vi observerade >99% (ER) och >98% (AhR) för GAK. Det ska poängteras att utgående halt AhR och ER efter respektive pilot var <LOD (ozon + MBBR) och 0,08 ng TCDDeq/L (GAK). Däremot observerade vi varierande resultat avseende oxidativ stress, vilket sannolikt kan relateras till att de inkommande aktiviteterna skiljde sig betydligt mellan de olika pilotprocesserna. I fallet för ozon observerades halter <LOD efter ozoneringssteget och i ett fall av fyra (låg ozondos) ökade oxidativ stress (ett av två prover) över MBBR-steget. Övriga prover visade ingen oxidativ stress. För GAK-piloten var inkommande aktivitet väsentligt högre och här reducerades ca 78% och utgående halt visade viss aktivitet.

Med tanke på att vi i utgående avloppsvatten från befintlig rening fortfarande kunde se höga ER-aktiviteter (t.ex.), är det av vikt att förstå huruvida en avancerad rening i form av ozon eller GAK kan reducera denna aktivitet (och övriga parametrar) ytterligare. Resultaten visade att ozon och GAK reducerade många av de effektbaserade parametrarna väl och effekten i utgående, renat avloppsvatten blev förhållandevis låg - i flera fall under detektionsgränsen (<LOD). För ER-aktivitet, och i jämförelse med konventionell rening, observerades t.ex. att aktiviteten sjönk till icke-detekterbara halter för både GAK (Uppsala) och ozon (Eskilstuna). Recipientprovtagningen för dessa ARV (med befintlig rening) (2 i Eskilstuna, 1 dubbelprov i Uppsala), visade att det effektbaserade riktvärdet för östrogen aktivitet på 400 pg E2eq/L överskreds.

Pilotprocessen Opacarb®FL presterade markant sämre jämfört med både ozon efterföljt av MBBR och GAK, för samtliga studerade effektparametrar, vilket skulle kunna förklaras av att provtagningen genomfördes när processen hade en driftstörning. Vi kunde i de flesta fall inte bedöma hur MBBR påverkar de effektbaserade parametrarna eftersom inga aktiviteter kunde uppmätas efter det föregående reningssteget, ozonering, för aktivering av AhR, Nrf2, AR och anti-AR. För ER kvarstod dock, förvisso låg, aktivitet efter ozonering vid ett av två provtagningstillfällen (då en lägre ozondos användes) och reduktionsgraden för MBBR var då 48%. Vid den andra provtagningen när ozoneringen minskade ER-aktiviteten till <LOD sågs däremot en ökning vid MBBR och fler provtagningar skulle därför behövas för att kunna dra några generella slutsatser om hur nedbrytningen fungerar för MBBR.

En jämförelse mellan effektbaserad analys och kemisk analys av enskilda ämnen med östrogen effekt, visade att kemisk analys endast kunde förklara maximalt 3% av de östrogena effekter som uppmättes med de effektbaserade metoderna. En stor bidragande anledning till detta är att detektionsgränserna vid kemisk analys inte är tillräckligt låga för att mäta halter som kan ha negativ påverkan på akvatiska organismer. Detta understryker vikten av att utveckla förfinade analysmetoder för dessa ämnen. Utifrån detta resultat och uppmätta halter i recipient, är vår bedömning att det inte är tillräckligt att endast analysera enskilda

östrogena ämnen, utan det bör kompletteras med effektbaserad analys i utgående avloppsvatten och recipienter för att få ett helhetsgrepp om den totala östrogena effekten.

Det ska påpekas att effektbaserade celltester ger en tidig varning om att något kan vara fel, men ett positivt utslag i någon av dessa parametrar betyder inte automatiskt att hela organismer skadas. Det kan finnas försvarsmekanismer i en organism (t.ex. en fisk) som gör att effekten som påvisats i cellen inte behöver orsaka en effekt i fisken. För att det ska kunna bli en skadlig effekt i en organism så börjar påverkan alltid på cellnivå och därför betraktas metoderna som effektiva verktyg för att kartlägga förekomst av skadliga ämnen. Dessutom ger de effektbaserade analyserna ett betydligt bättre underlag för bedömning av den totala effekten av blandningar av kemiska ämnen än att bara mäta halter av enstaka kemiska ämnen, t.ex. för att bedöma en recipientpåverkan.

Utifrån vår rapport kan vi rekommendera att cellbaserade effektparametrar fortsätter att mätas i och kring avloppsreningsverk i Sverige. Vi ser också att det är en stor fördel att dessa parametrar inkluderas för utvärderingen av ett avancerat reningssteg, gärna redan innan processen installeras i fullskala. Det senare är särskilt aktuellt för en ozonprocess (särskilt när den körs som ett ensamt processteg utan efterpolering), som kan omvandla modersubstanser till biprodukter som i vissa fall kan ha högre toxicitet. Ett arbete av denna karaktär skulle kunna bidra till att vi får en större kunskap om spridningen av miljöfarliga ämnen, och kan på samma gång ge oss en tidig indikation på potentiellt miljöstörande effekter av inte bara enskilda ämnen utan av hela den komplexa blandning av ämnen som förekommer, något som inte är möjligt med kemisk analys.

# Ordlista

AhR = arylhydrokarbonreceptorn

AR = androgenreceptorn

BEQ = bioekvivalent koncentration

DHT = dihydrotestosteron

E2 = 17 $\beta$ -östradiol

E2eq<sub>kemi</sub> = östradiolekvivalenter beräknade från kemiska analyser

E2eq<sub>BEQ</sub> = östradiolekvivalenter från effektbaserad analys, uttryckt i BEQ (bioekvivalent koncentration)

EBT = effektbaserat riktvärde (från engelskans effect-baser trigger value)

eq. = ekvivalenter

ER = östrogenreceptorn

LOD = limit of detection

Nrf2 = nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OHF = hydroxyflutamide

SPE = fastfasextraktion (från eng. solid phase extraction)

tBHQ = tertiär butylhydrokinon

TCDD = 2, 3, 7, 8-tetraklordibenso-*p*-dioxin

YES = yeast estrogen screen (reporter assay för östrogen aktivitet där jästceller används)



# Innehållsförteckning

1	Bakgrund .....	11
1.1	Mål och syfte med projektet .....	11
1.1.1	Projektets deltagare .....	11
1.2	Tekniker för avancerad rening av mikroföroreningar .....	12
1.3	Vanligt förekommande kemiska analyser för miljöriskbedömningar .....	13
1.4	Effektbaserade metoder .....	13
1.4.1	Hormonstörande effekter .....	15
1.4.2	Aktivering av metaboliserande system .....	17
1.4.3	Oxidativ stress .....	17
1.5	Effektbaserade metoder inom avloppsvattenrening och avancerad rening .....	17
1.5.1	Konventionell avloppsvattenrening .....	17
1.5.2	Avancerad rening .....	18
1.5.3	Effektbaserade metoder och koppling till kemisk analys .....	19
1.5.4	Genotoxicitet och mutagenicitet .....	19
1.6	Effektbaserade parametrar som analyseras av BioCell Analytica .....	20
1.6.1	Aktivering/blockering av könshormonsreceptorer .....	20
1.6.2	Aktivering av arylhydrokarbonreceptorn (AhR) (dioxinreceptorn) .....	21
1.6.3	Oxidativ stress (Nrf2) .....	21
1.6.4	Genotoxicitet (mikrokärntest) .....	21
2	Metod .....	22
2.1	Provtagningar .....	22
2.1.1	Befintlig process och pilotprocess .....	22
2.1.2	Pilotprocesser som utvärderats .....	24
2.2	Provbearbetning för effektbaserade analyser .....	25
2.2.1	Detektionsgränser för de effektbaserade analyserna .....	25
2.3	Analys av mikroföroreningar .....	26
2.4	Samband mellan biologiska effekter och kemisk analys .....	26
3	Resultat och diskussion .....	27
3.1	Hormonstörande effekter .....	27
3.1.1	Östrogen aktivitet i befintlig rening .....	27
3.1.2	Östrogen aktivitet i närliggande recipient .....	29
3.1.3	Östrogen aktivitet efter avancerad rening (pilotprocesser) .....	31
3.1.4	Androgen aktivitet - aktivering (AR) och blockering (anti-AR) av androgenreceptorn i ARV och i recipient .....	32



3.1.5	Androgen aktivitet - aktivering (AR) och blockering (anti-AR) av androgenreceptorn för avancerad rening .....	33
3.2	Oxidativ stress - Nrf2.....	33
3.2.1	Förändring av oxidativ stress i befintlig rening .....	33
3.2.2	Förändring av oxidativ stress för avancerad rening.....	34
3.3	Aktivering av Ah-receptorn (metaboliserande aktivitet) .....	36
3.3.1	Förändring av AhR-aktivitet i befintlig rening.....	36
3.3.2	Förändring av AhR-aktivitet för avancerad rening.....	37
3.4	Genotoxicitet .....	38
3.4.1	Genotoxicitet i befintlig rening.....	38
3.4.2	Genotoxicitet i avancerad rening .....	39
3.5	Jämförelse mellan östrogen aktivitet och analyserade kemiska föreningar .....	40
4	Slutsats och utblick.....	43
5	Referenser.....	46
	Bilaga 1 - Ämneslista från Naturvårdsverket .....	49
	Bilaga 2 – Sammanfattning av provtagning för de deltagande VA-organisationerna .....	50
	Bilaga 3 - Ämnen som ingått för analys av mikroföroreningar .....	54
	Bilaga 4 - Steg för steg – vattenanalys BioCell Analytica.....	56
	Bilaga 5 - Uppmätta aktiviteter för befintlig process och pilotprocesser.....	57
	Bilaga 6 - Kemisk analys och ER-aktivitet.....	60



# 1 Bakgrund

Det här projektet är ett innovationsprojekt som finansieras och drivs av Sweco Sverige AB. Vi som skrivit denna rapport heter Linda Önnby<sup>1</sup> och Gisela Holm och arbetar på Swecos kontor i Malmö respektive Stockholm. Utöver Sweco finns det också sex olika VA-organisationer som deltagit i det här projektet genom att ta ut prover från sina respektive avloppsreningsverk (ARV). BioCell Analytica har utfört de biologiska analyser som projektet har utvärderat.

## 1.1 Mål och syfte med projektet

Målet med innovationsprojektet var att utvärdera effektbaserade analyser (*in vitro*-tester i celler) vid test av föroreningar i avloppsvatten och effektivitet av olika avancerade reningstekniker. För att åstadkomma detta har analysdata från sex VA-organisationer sammanställts. Fem av deltagarna har under 2021 och 2022 drivit projekt (förstudier eller pilotundersökningar) om avancerad rening av mikroföroreningar med stöd från Naturvårdsverket. Förhoppningen och det huvudsakliga syftet är att vårt material kommer att vara vägledande för framtida VA-organisationer om hur dessa analyser bäst kan användas och utvärderas inom detta område. Vi har uppmärksammat att det behövs en bättre kännedom om hur effektbaserade analyser kan användas för att bedöma och utvärdera avloppsvatten och recipienter förorenade med mikroföroreningar. Effektbaserade analyser kan beskrivas som en mer övergripande, genomslagskraftig och djupgående metod jämfört med när endast kemisk analys används, eftersom även effekter av okända ämnen och cocktaileffekter kan mätas.

Genom att skapa referensvärden mellan olika kunder och påvisa fördelen och bredden med effektbaserade analyser, kan VA-organisationer framgent vara bättre rustade för hur de kan ta beslut kring eventuella risker och hur bra en reningsslagmetod fungerar. Effektbaserade analyser kan användas vid bedömning av alla typer av vatten där det finns misstanke om att mikroföroreningar förekommer, t.ex. recipientutredningar, lakvattenutredningar och ekologiska statusbedömningar.

### 1.1.1 Projektets deltagare

Projektet har vänt sig till alla de organisationer som driver Naturvårdsverksfinansierade projekt inom avancerad rening och mikroföroreningar under 2021/2022. Totalt var det sex organisationer som visade intresse för ett deltagande till denna rapport och under hösten 2021 och

---

<sup>1</sup> Linda arbetar nu på IVL Svenska Miljöinstitutet.

våren 2022 har de samlat in prover avseende dels befintlig reningsprocess och recipientpåverkan, dels pilotprocess som är föremål för utvärdering.

De olika VA-organisationerna som medverkat presenteras översiktligt i Tabell 1. Där framgår också vilken typ av reningsprocess som är utvärderad med effektbaserad analys (befintlig eller pilotprocess) samt vilken tillhörande recipient är. I kapitel 2.1 beskrivs varje organisation mer ingående.

Tabell 1. Deltagare för detta projekt och vilken typ av recipient som är aktuell

Stad och avloppsreningsverk	Process som analyserats med effektbaserad analys	Recipient
Borås, Sobacken ARV	Befintlig process och pilotprocess	Viskan
Eskilstuna, Ekeby ARV	Befintlig process och pilotprocess	Eskilstunaån
Gävle, Duvbackens ARV	Befintlig process	Inre Fjärden (Östersjön)
Lidköping, Lidköpings ARV	Befintlig process	Lidan (Vänern, Värmlandssjön)
Västervik, Lucerna ARV	Befintlig process	Skeppsbrofjärden (Östersjön)
Uppsala, Kungsängsverket	Befintlig process och pilotprocess <sup>a</sup>	Fyrisån

<sup>a</sup> Uppsala Vatten har för projektet valt att utvärdera en försöksuppställning i bänkskala med kolonner eftersom den planerade pilotanläggningen inte var i drift vid provtagningsstillfället.

I resultatdelen i denna rapport utvärderas befintlig reningsprocess för samtliga deltagare samt pilotprocesser för tre organisationer Tabell 1.

## 1.2 Tekniker för avancerad rening av mikroföroreningar

De huvudsakliga teknikerna som är aktuella för rening av mikroföroreningar är oxidation i form av ozonering respektive processer där aktivt kol används. Teknikerna fungerar på två olika sätt där aktivt kol ska betraktas som en borttagande process där separationen sker genom adsorption, medan ozon är en omvandlande (oxidativ) process som bidrar till att mål-molekylerna (och andra närvarande molekyler i vattnet) oxideras till mindre enheter. Eftersom ozon kan bidra till att reaktiva och potentiellt toxiska transformationsprodukter och biprodukter bildas, är det rekommenderat att ozon efterföljs av ett poleringssteg. Det är framför allt mindre organiska föreningar från oxidation av löst organiskt kol (DOC) som bryts ned över poleringssteget (von Sonntag & von Gunten, 2012). Andra biprodukter som är viktiga att hålla under uppsikt för en ozonprocess är bromat och nitrosodimetylamin (NDMA) som båda är cancerogena och toxiska ämnen. De olika alternativ som diskuteras som poleringssteg efter ozonering är framför allt sandfilter, aktivt kol och en rörlig biofilmsreaktor med bärare (MBBR). I denna studie har en deltagare kombinerat ozonering med efterföljande MBBR.

## 1.3 Vanligt förekommande kemiska analyser för miljöriskbedömningar

Vid en bedömning av miljörisker för en specifik recipient eller för ett reningsverk utgår arbetet ofta från en definierad lista över kemiska föreningar och mikroföroreningar som innefattar både organiska och oorganiska ämnen. Listan är ofta framtagen för den specifika verksamheten och de särskilda tillstånd som gäller. För arbetet om avancerad rening av mikroföroreningar finns det idag ingen definierad ämneslista som ska följas vilket är kopplat till att det idag inte råder några riktlinjer eller lagförslag avseende avancerad rening på ARV. Naturvårdsverket har däremot rekommenderat en ämneslista som de gärna ser att VA-organisationer följer i samband med sina förstudier och pilotundersökningar inom området. Ämneslistan är förankrad till den svenska kontexten och består av läkemedel vi återfinner på den svenska marknaden och därmed också i vårt avloppsvatten samt "fenolära ämnen (åtminstone nonylfenol)" och "PFAS-11". I Bilaga 1 sammanfattas Naturvårdsverkets lista. Utöver kemiska föreningar tas även mutagenicitet och östrogena effekter upp som rekommenderade parametrar. De två senare är exempel på parametrar som analyseras med hjälp av effektbaserad analys, vilka redogörs mer i detalj under nästa avsnitt.

Det finns idag inte ett enskilt laboratorium som utför samtliga analyser upptagna på Naturvårdsverkets lista. Däremot finns det analyspaket på några enskilda laboratorier som stämmer bra överens med ämneslistan från Naturvårdsverket. Utöver att analysera avloppsvatten med effektbaserad analys har de deltagande VA-organisationerna även analyserat mikroföroreningar parallellt med effektbaserad analys. För merparten av deltagare har ett laboratorium i Kristianstad utnyttjats (MoLab) men även analys genom ALS har förekommit.

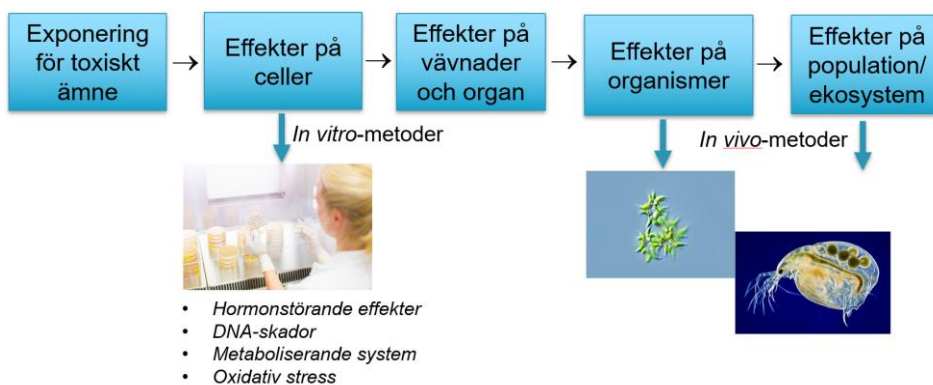
## 1.4 Effektbaserade metoder

För att med stor säkerhet kunna säga hur föroreningar i renat avloppsvatten eller kemikalier påverkar organismer i mottagande vattendrag vore det bäst att testa så många djur och växter som möjligt. Då detta inte är möjligt, både rent praktiskt, kostnadsmässigt och etiskt, är det önskvärt att komplettera studier på hela organismer med enklare testsystem som på bästa möjliga sätt kan svara på eller ge en indikation på om det testade vattnet kan ha en skadlig effekt på organismerna i miljön.

De kemiska metoder som idag används för att detektera miljöskadliga ämnen kan bara mäta ett mycket litet antal av i förväg utvalda ämnen. Även om det kan finnas information om varje enskilt ämnes miljörisk är den totala effekten som dessa kemikalier tillsammans ger (så kallad cocktaileffekt) okänd. Dessutom finns det många okända kemikalier som inte analyserats där effekten på miljön är okänd. Flera studier har visat att upp till 99 % av de toxiska effekterna i vattenmiljön orsakas av okända ämnen, se t.ex. (Escher, Stapleton, & Schymanski, 2020). Detta visar att det behövs effektbaserade metoder för att kunna mäta den totala toxiska effekten i ett vattenprov.

Effektbaserade metoder är biologiska metoder som mäter effekter av skadliga ämnen i hela organismer (*in vivo*) eller i celler (*in vitro*) (Brack, o.a., 2019). Ofta används fisk, kräftdjuret *Daphnia sp* (vattenloppa - ryggradslöst djur) och encelliga grönalger för att mäta effekter på hela organismer på olika nivåer i

näringskedjan. Generellt sett finns det en ambition och strävan efter att minska och begränsa användningen av försöksdjur och övergå till cellbaserade system, vilket medför att det i framtiden kan bli svårare att använda vissa *in vivo*-tester och understryker vikten av att utveckla och öka användningen av *in vitro*-tester. Flera tekniker används för att mäta effekter på cellnivå, vilket är fokus i denna rapport. Här ingår tekniker för att mäta hormonstörande effekter (kan ge skador på reproduktionen), skador på arvsmassan (DNA) och oxidativ stress samt aktivering av metaboliserande system. Figur 1 visar olika metoder för att upptäcka och mäta effekter av skadliga ämnen, där effektbaserade celltester ingår.



Figur 1. Metoder för att mäta effekter av skadliga ämnen i miljön, från exponering till effekter på ekosystem.

Användandet av effektbaserade celltester stöds av Naturvårdsverket som i sin utlysning av medel för projekt inom avancerad rening och mikroföroreningar specifikt nämnt att förutom analys av mikroföroreningar (se 1.3) så är det önskvärt att deltagande VA-organisationer använder effektbaserade analyser för mutagenicitet och östrogena effekter.

De effektbaserade celltesterna ger en tidig varning om förekomst av skadliga ämnen i ett prov och effekter även från okända ämnen samt blandningseffekter detekteras, men det ska påpekas att ett positivt utslag i någon av dessa parametrar inte automatiskt betyder att hela organismen skadas. Det kan finnas försvarsmekanismer i organismen (t.ex. en fisk) som gör att effekten som påvisats i cellen inte orsakar en effekt i fisken. För att det ska kunna bli en skadlig effekt i en organism så börjar påverkan alltid på cellnivå och därför betraktas metoderna som effektiva verktyg för att kartlägga förekomst av skadliga ämnen. Dessutom ger de effektbaserade analyserna ett betydligt bättre underlag för bedömning av den totala effekten av blandningar av kemiska ämnen jämfört med att bara mäta halter av enstaka kemiska ämnen. En vidare förståelse för den totala effekten kan vara av betydelse vid t.ex. en recipientpåverkan.

Mer i detalj mäts de biologiska effekterna av miljö- och hälsofarliga kemikalier i vatten i laboratorieodlade däggdjursceller, som modifierats för att kunna upptäcka specifika oönskade effekter, exempelvis hormonstörande effekter (BioCell Analytica, 2022; Persson, Lundqvist, & Oskarsson, 2021). När cellerna exponeras för ett prov som innehåller kemiska ämnen som orsakar de specifika effekter som studeras, så utsöndrar cellerna ett signalprotein. Signalproteinet

kan mätas enkelt efter att cellerna exponerats för t.ex. ett avloppsvattenprov. Detta ger ett snabbt svar på om, och i vilken grad provet är förorenat med miljö- och hälsofarliga kemikalier. En rad sådana effektbaserade metoder har utvecklats, och dessa mäter grundläggande fysiologiska och hälsorelevanta effekter, såsom cellernas tillväxt och stresspåslag, östrogena och androgena effekter, och skador på arvsmassan. Som komplement till de kemiska analysmetoderna har det visats att de biologiska effektbaserade cellanalyserna fungerar väl för att få en mer heltäckande bild av förekomsten av skadliga ämnen och ämnen som i kombination kan ge negativa hälso- eller miljöeffekter. Metoderna kan användas för att förbättra och övervaka dricksvattenkvaliteten och effektiviteten i avloppsreningsverk, för att utföra miljöövervakning samt för att utvärdera nya tekniska lösningar i vattenbranschen.

Nedan listas några vanliga effektbaserade metoder för att mäta effekter på cellnivå (*in vitro*). Under 1.6 redovisas de aktuella effektbaserade analyserna som använts i föreliggande studie mer i detalj.

### 1.4.1 Hormonstörande effekter

Många viktiga processer i kroppen styrs av hormoner som verkar vid mycket låga halter i kroppen (Kemikalieinspektionen, 2022). I avloppsvatten kan det förekomma naturligt östradiol (utsöndrat från människa) och östron. Dessa har en östrogen effekt, liksom etinylöstradiol (syntetiskt p-piller-hormon), naturliga ämnen som genistein och daidzein (finns i soja) och syntetiska ämnen som bisfenol A och nonylfenol. Ämnena kan exempelvis bidra till utveckling av cancer eller påverka ämnesomsättningen och fortplantningsförmågan.

I en nyligen publicerad artikel föreslås en rad *in vivo*- och *in vitro*-tester för att detektera hormonstörande ämnen (Robitaille, o.a., 2022). Här nämns även OECD:s<sup>2</sup> ramverk för att identifiera dessa ämnen (OECD, 2018) som innehåller tester för att utvärdera östrogen-, androgen- och tyroidaktivitet, samt påverkan på produktion av steroidhormoner (steroidogenes).

Några av testerna för att mäta hormonstörande effekter på cellnivå listas nedan.

#### 1. *Aktivering/blockering av östrogenreceptorn (ER)*

Östrogenreceptorn (ER) kan påverkas både genom aktivering (agonistisk effekt) och blockering (antagonistisk effekt) av receptorn av ämnen som därmed klassas som hormonstörande.

Aktivering av ER ingår i testerna som utförts av BioCell Analytica och beskrivs i mer detalj i avsnitt 1.6.)

Det finns olika metoder för att mäta östrogena effekter, där flera är baserade på modifierade däggdjursceller (t.ex. (anti-)ER $\alpha$  CALUX, MELN, T47D-KBluc, GeneBLAzer-ER alpha) och andra på modifierade jästceller (t.ex. A-YES). Om samma referenssubstans används (17 $\beta$ -östradiol) i olika cellmodeller är resultaten från metoderna jämförbara. Exempel på tester för att mäta aktivering och blockering av östrogenreceptorn (östrogena effekter) (Wolf, o.a., 2022) ges nedan:

ISO-standarder finns för östrogentester baserade på humana celler och jästceller. Styrkor och svagheter med de olika testerna nämns i flera artiklar. Ett

<sup>2</sup> OECD: The Organisation for Economic Co-operation and Development, är en internationell organisation som bl.a. arbetar med att ta fram och etablera vetenskapligt förankrade internationella standarder för utmaningar inom ekonomi, sociala frågor och miljö.

exempel är YES som används ofta, men där flera källor beskriver svagheterna. YES-testet baseras på jästceller och har en högre detektionsgräns än test som baseras på däggdjursceller, men används ofta eftersom det är enkelt att använda (dos Santos Argolo, Gomes, & Maia Bila, 2021). YES rekommenderas däremot inte längre som ett framgångsrikt test, något som det amerikanska Naturvårdsverket (US EPA) kommunicerade redan 1998 och sedan 2018 är det också något som OECD ställer sig bakom. Det är fler som ansluter sig till samma slutsatser: i en nyligen publicerad översiktsartikel från forskare från flera olika lärosäten i Europa och USA, förtydligas detta närmare. Några anledningar till detta är:

- den höga detektionsgränsen för jästceller jämfört med humanceller,
- det lägre upptaget av substanser i jästceller jämfört med i däggdjursceller,
- att YES inte alltid kan skilja på agonister och antagonister, vilket kan göra att man får fel resultat avseende aktiviteten i ett prov och;
- att jästcellers överlevnad kan påverkas av fungicider (svampdödande ämnen) som är klassade som hormonstörande ämnen (Robitaille, o.a., 2022).

## 2. *Aktivering/blockering av androgenreceptorn (AR)*

Androgenreceptorn (AR) kan precis som ER påverkas både genom aktivering (agonistisk effekt) och blockering (antagonistisk effekt) av receptorn av ämnen som därmed klassas som hormonstörande.

Både aktivering och blockering av AR ingår i testerna som utförts av BioCell Analytica och beskrivs i mer detalj i avsnitt 1.6.

Exempel på tester för att mäta androgen effekt är (anti-)AR CALUX och AR-EcoScreen där det sistnämnda användes i denna studie.

Det är även möjligt att undersöka andra typer av hormonpåverkan med bioassays, vilka beskrivs i punkt 3 - 6 nedan. Detta gjordes dock inte i denna studie då fokus varit på de parametrar som inom forskning vanligen testas för dessa typer av vatten.

## 3. *Progesteronaktivitet och glukokortikoidaktivitet*

Många läkemedel ingår bland de som har progesteronaktivitet eller glukokortikoidaktivitet, bl.a. kortison och astmamediciner, vilket gör att dessa tester kan vara viktiga för att fånga upp effekterna av dessa ämnen (IWA, 2021).

## 4. *Retinoidliknande aktivitet*

Retinoider kontrollerar bl.a. utveckling av organ och celler hos djur, och en störning i detta system kan orsaka fosterskador hos fisk och groddjur (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019). Vissa kemikalier har potential att orsaka denna störning.

## 5. *Sköldkörtelhormonaktivitet (tyroid aktivitet)*

Sköldkörtelhormon är viktiga för metabolism, tillväxt och organutveckling inklusive hjärnan (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019). Det finns olika typer av tester för att studera ämnen som kan störa sköldkörtelns aktivitet.

## 6. *Störning av hormonbiosyntes*

Vissa ämnen kan störa syntesen av hormoner och det finns tester som kan mäta denna aktivitet (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019).



### 1.4.2 Aktivering av metaboliserande system

Exempel på test för att mäta aktivering av metaboliserande system ges nedan:

- *Aktivering av arylhydrokarbonreceptorn (AhR, även kallad dioxinreceptorn)*  
AhR-receptorn är också känd som dioxinreceptorn då den bland annat aktiveras av dioxinlika föreningar. AhR inducerar bland annat cytokrom 450, som är metaboliserande enzym. Detta test ingår i testerna som utförts av BioCell Analytica och beskrivs i mer detalj i avsnitt 1.6.

### 1.4.3 Oxidativ stress

Oxidativ stress orsakas av ett överskott av syreradikaler som bl.a. kan ge inflammatoriska effekter och orsaka cancer. Exempel på test för att mäta oxidativ stress ges nedan:

- *Nrf2-aktivitet*  
Detta test ingår i testerna som utförts av BioCell Analytica och beskrivs i mer detalj i avsnitt 1.6.

## 1.5 Effektbaserade metoder inom avloppsvattenrening och avancerad rening

### 1.5.1 Konventionell avloppsvattenrening

Det finns idag en rad studier som har undersökt avloppsvattenrening med olika typer av effektbaserade *in vitro*-metoder för att beskriva uppmätt effekt före och efter konventionell avloppsvattenrening (Golovko, O., Lundqvist, J., Öhrn, S. och Ahrens, L., 2020; Lundqvist, Mandava, Lungu-Mitea, Yin Lai, & Ahrens, 2019; Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019; Stalter, Magdeburg, Wagner, & Oehlmann, 2011). Dessa, samt referenser inom dem, visar också att avloppsvatten har analyserats för en rad olika typer av effekter (t.ex. oxidativ stress, mutagenitet, AhR-aktivitet, androgena och östrogena effekter), men att det är framförallt östrogena effekter som är de i särklass mest dominerande inom detta fält och för avloppsvatten (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019).

I en nyligen publicerad översiktsartikel som summerade 46 studier och totalt 22 avloppsreningsverk (pilot- eller fullskala), visades att konventionella reningsmetoder effektivt reducerar ER-aktivitet, men att även återstående östrogenitet kan utgöra en risk för omgivande ekosystem. De sistnämnda riskerna utvärderades med hjälp av effektbaserade metoder, där framför allt *in vitro*-tester baserade på östrogenitet och *in vivo*-tester på kräftdjuret *Daphnia* sp dominerade (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019). Efter konventionell rening visade även Stalter o.a. (2011) att androgena, östrogena och AhR-aktiviteter minskade med 78-99% vid jämförelse med inkommande avloppsvatten. Författarna understryker att även om de studerade effekterna minskade avsevärt efter konventionell rening, så var det fortsatt hög östrogenitet och androgenitet i det utgående vattnet, vilket efterlyser ytterligare åtgärder för att inte recipienter ska påverkas negativt. Även i Sverige har liknande studier med effektbaserad analys genomförts: t.ex. utvärderades flera typer av effekter på fem svenska reningsverk med konventionell avloppsvattenrening (Lundqvist, Mandava, Lungu-Mitea, Yin Lai, & Ahrens, 2019). Precis som i studien från Tyskland av Stalter och medarbetare (2011)

observerades det en tydlig trend i hur effekterna minskade över avloppsreningsverket (Lundqvist, Mandava, Lungu-Mitea, Yin Lai, & Ahrens, 2019). Reduktionen för de olika effekterna rapporterades vara högst för östrogena effekter (ca. 90% för samtliga reningsverk), medan t.ex. de androgena effekterna reducerades olika mycket (>99% för tre ARV och 50-60% för två ARV).

### 1.5.2 Avancerad rening

Kunskapen kring hur östrogena effekter minskar ytterligare efter ett avancerat reningssteg är etablerad i den vetenskapliga litteraturen sedan drygt ett decennium, vilket sammanfattas väl av Völker o.a. (2019). Ozon och GAK bidrar t.ex. båda med en kraftig minskning av både östrogena, anti-androgena och AhR-aktiviteter (Stalter, Magdeburg, Wagner, & Oehlmann, 2011; Wolf, o.a., 2022).

I flera studier har hormonstörande effekter i avloppsvatten före och efter ozonbehandling studerats (Wolf, o.a., 2022; Itzel, o.a., 2020). Dessa studier har visat att den östrogena effekten i princip eliminerades efter behandling. Däremot påvisades ingen klar minskning avseende antiöstrogen och antiandrogen effekt, och Itzel och medarbetare (2020) kunde inte heller påvisa att effekten minskade efter ett biologiskt polersteg med biofilmsbärare. En förklaring till detta kan vara att ozonering skapar transformationsprodukter som ger upphov till de antagonistiska effekterna.

Ett avancerat reningssteg med ozon kräver en efterbehandling enligt schweiziska riktlinjer. Detta rekommenderas för att bryta ned reaktiva ämnen som skapas under den oxidativa processen. Kunskapen kring hur efterbehandlingen till ozon fungerar är i skrivande stund ett fält under stor utveckling. En del i denna utveckling är att utvärderingen av polersteg såsom aktivt kol (GAK), sandfilter eller biofilmsbaserad biologisk nedbrytning (t.ex. genom biofilmsprocesser med bärare eller membran (MBBR eller MBR)) med effektbaserad analys precis är påbörjad. Kienle och medarbetare (2022) undersökte avloppsvatten efter ozonering med polersteg såsom sandfilter, GAK (färskt respektive gammalt) samt en fast biologisk bädd. Ett viktigt resultat i denna studie var att påvisa att ozonering bidrog till att ekotoxiciteten minskade markant och att en ytterligare förbättring av vattenkvaliteten observerades för ett färskt GAK-filter som endast hade nyttjats mellan 13 000 – 20 000 bäddvolymmer (Kienle, o.a., 2022). En parallell observation avseende reduktion av identifierade transformationsprodukter gjordes dessutom ganska nyligen, där det konstaterades att högre reduktion av transformationsprodukter erhöles för ett yngre (16 000 bäddvolymmer) GAK jämfört med ett äldre (35 000 bäddvolymmer), men i samma studie erhöles bäst reduktion av transformationsprodukter när aktivt kol i pulverform (PAK) doserades på ett sandfilter och sämst reduktion av transformationsprodukter visades när polersteget utgjordes av endast ett sandfilter (Gulde, o.a., 2021).

Utöver att titta på hur toxicitet från *in-vitro* tester förändras över befintliga avloppsreningsverk kan dessa tester även utnyttjas som en utvärdering inför en installation av ett avancerat reningssteg. Det senare är särskilt aktuellt för ozonprocessen eftersom det är en oxidativ process, som utöver att reagera med mikroföroreningar, även reagerar med övriga komponenter i avloppsvattnet (vattenmatrisen) (von Sonntag & von Gunten, 2012).

I en studie från Schweiz redogör författarna för hur ozon kan testas och utvärderas på avloppsvatten för att få en tydlig totalbild över hur ozonprocessen

med efterföljande biologiskt polersteg påverkar vattnet (Schindler Wildhaber, o.a., 2015). Testförfarandet omfattar primärt ozonstabiliteten i avloppsvattnet men även toxiciteten och östrogena och androgena effekter undersöks före och efter ozonsteget, samt efter ett biologiskt polersteg. För utvärderingen av mutagenicitet användes tre varianter av Ames-test<sup>3</sup>. Det övergripande resultatet från denna utvärdering pekade på att en inducerad toxicitet som konsekvens av ozonering, försvann efter det biologiska polersteg. För ett avloppsvatten observerades mutagenicitet redan på obehandlat vatten, vilket inte förändrades efter vare sig ozonering eller ett biologiskt polersteg. Utifrån testförfarandet kunde två avloppsvatten konstateras vara olämpliga för ozonering och detta förklarades bland annat av att de var mycket påverkade av industriellt avloppsvatten.

### 1.5.3 Effektbaserade metoder och koppling till kemisk analys

Som vi tidigare påtalat är det sällan enskilda kemiska analyser kan förklara hela den respons som en effektbaserad analys ger. Däremot finns det några effekter där det varit möjligt att förklara en relativt hög grad av effekten med kemisk analys av enskilda ämnen, i vissa fall upp till 70%. Ett exempel är östrogena effekter som anges som östradiolekvivalenter (E2-ekvivalenter, E2eq). Detta beror på att östrogena effekter vanligtvis domineras av förekomst av ett fåtal högpotenta ämnen. Några kända ämnen med östrogen verkan är östradiol, etinylöstradiol, östron samt bisfenol A (Gutendorf & Westendorf, 2001; Robitaille, o.a., 2022) m. fl. Även nonylfenoler nämns i litteraturen som kemiska ämnen med östrogenicitet. Ett problem är att östradiol är svårt att analysera kemiskt i tillräckligt låga koncentrationer. En finsk studie på 8 avloppsreningsverk rapporterade detekterbara halter av östradiol i två prover, vilket förklarade 28 respektive 67% av ER-aktiviteten. Östron och bisfenol A, som kunde detekteras i flertalet prover, förklarade mindre än 10% av ER-aktiviteten (Välitalo, o.a., 2016). På samma sätt finns det beskrivet att studerade effekter kan relateras till vissa typer av ämnen. I (Robitaille, o.a., 2022) skriver de att anti-androgena effekter har kunnat härledas till halter av ftalater i dricksvatten. Även polyklorerade bifenyler (PCB:er), polycykliska aromatiska kolväten (PAH:er), flamskyddsmedel, pesticider och läkemedel nämns som potentiella kandidater (Itzel, o.a., 2020). För androgena effekter nämns att de korrelerar till halter av steroider (Robitaille, o.a., 2022). Det återstår dock mycket att studera inom detta fält innan någon helhetsbild kan skapas. En betydande skillnad är att effektbaserad analys som görs på olika typer av vatten ger en sammantagen bild av hela vattenprovet, till skillnad från enskild kemisk analys som endast påvisar det ämne som på förhand är bestämt att analyseras. Detta innebär t.ex. att effekter som är additiva, synergistiska och/eller antagonistiska, påvisas i en effektbaserad analys, medan den missas i den enskilda kemiska analysen.

### 1.5.4 Genotoxicitet och mutagenicitet

Genotoxicitet innebär effekter i form av primära DNA-skador och mutationer på DNA-molekylnivå eller kromosomnivå. Genotoxicitet och mutagenicitet är i princip samma sak förutom att genotoxiska effekter inte nödvändigtvis är associerade med mutationer. Skador på DNA kan innebära en ökad cancerrisk och reproduktionsstörningar.

<sup>3</sup> Tre olika bakteriestammar utnyttjades i försöket; TA100, TA98 och YG7108.

Exempel på tester som mäter genotoxicitet:

- *Mikrokärntest*  
Detta test ingår i testerna som utförts av BioCell Analytica och beskrivs i mer detalj i avsnitt 1.6.
- *UmuC assay*  
I denna test mäts förmågan att reparera DNA (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019).
- *Comet assay*  
Denna test mäter DNA-skador (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019).

Exempel på test som mäter mutagenicitet:

- *Ames test*

Ames test är ett bakteriellt snabbtest som används för att identifiera carcinogena ämnen med hjälp av att studera mutagenicitet i bakterien *Salmonella typhimurium* (Föllmann, Degen, Oesch, & Hengstler, 2013).

I tillägg till testerna ovan finns t.ex. inhibering av acetylkolinesteras (AChE), påverkan på peroxisomproliferationaktiverade (PPAR) receptorer och mikroplattstester med bakterier och mikroalger (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019).

## 1.6 Effektbaserade parametrar som analyseras av BioCell Analytica

I denna studie har vi studerat förekomsten av ämnen i avloppsvatten och vatten från recipientprovtagning som kan aktivera östrogenreceptorn (ER) och arylhydrokarbonreceptorn (AhR) (dioxinreceptorn), aktivera och blockera androgenreceptorn (AR), orsaka oxidativ stress (Nrf2-aktivitet) eller genotoxicitet. Nedan beskrivs de olika toxiska effekterna som är en följd av effekt på receptorer, oxidativ stress eller genotoxicitet (Persson, Lundqvist, & Oskarsson, 2021; BioCell Analytica, 2022).

### 1.6.1 Aktivering/blockering av könshormonsreceptorer

#### 1. Aktivering av östrogenreceptorn (ER)

Östrogenreceptorn aktiveras av kvinnliga könshormonsliknande ämnen. Ämnena kan aktivera (agonistisk aktivitet) eller blockera (antagonistisk aktivitet) östrogenreceptorn. Könshormoner, såsom östrogener, har många viktiga fysiologiska funktioner exempelvis för reproduktionen. Ämnen som efterliknar eller blockerar könshormoner klassas som hormonstörande ämnen. I denna studie har undersökts om proverna innehåller ämnen som kan aktivera östrogenreceptorn.

#### 2. Aktivering av androgenreceptorn (AR)

Androgenreceptorn aktiveras av manliga könshormonsliknande ämnen. Ämnena kan aktivera (agonistisk aktivitet) eller blockera (antagonistisk aktivitet) androgenreceptorn. Könshormoner, såsom androgener, är bl.a. viktiga för reproduktionen. Ämnen som efterliknar eller blockerar könshormoner klassas som hormonstörande ämnen. I denna studie har undersökts om proverna innehåller ämnen som kan aktivera respektive hämma androgenreceptorn.

### 1.6.2 Aktivering av arylhydrokarbonreceptorn (AhR) (dioxinreceptorn)

Arylhydrokarbonreceptorn (AhR) (dioxinreceptorn) har blivit särskilt uppmärksammas för att den aktiveras av många toxiska ämnen, särskilt tetraklordibenzodioxin (TCDD), varvid metaboliserande enzym induceras (sätts igång) (bl.a. cytokrom P450). Effekten av AhR-aktivering har därför kommit att kallas metabolisk aktivering, men Ah-receptorn har många olika fysiologiska funktioner och aktiveras av både kroppsegna och främmande kemiska ämnen. Viktiga funktioner där AhR ingår är vid utveckling av olika organsystem och vid reglering av inflammatoriska reaktioner. AhR aktiveras av ett mycket stort antal skilda ämnen, såsom halogenerade organiska miljöföroreningar, PAH:er, vissa pesticider (bekämpningsmedel) och läkemedel, och naturligt förekommande ämnen som indoler (finns bl.a. i stenkolstjära och i växter) och stilbener (polyfenol som bl.a. finns i växter).

### 1.6.3 Oxidativ stress (Nrf2)

Många toxiska ämnen, t.ex. organiska miljögifter, pesticider, metaller, naturliga ämnen, kan orsaka oxidativ stress. Oxidativ stress beror på bildning av reaktiva syreradikaler i överskott och obalans i cellernas förmåga att ta hand om dessa. Det är en vanlig mekanism bakom olika typer av toxiska effekter, t.ex. inflammatoriska effekter, fosterskador och cancer. En viktig faktor som reglerar cellernas försvarssystem vid oxidativ stress är Nrf2 (nuclear transcription factor erythroid 2- related factor 2). Vid induktion av oxidativ stress uppregleras Nrf2, vilket kan användas som markör vid bioanalys av vattenprovers innehåll av ämnen som orsakar oxidativ stress.

Då en rad organiska mikroföroreningar inducerar en oxidativ stress-respons och det är förväntat att *in-vitro* analyser avseende Nrf2-aktivitet kommer att öka framgent inom vattenbranschen i samband med utvärdering av vattenprocesser och avseende vattenkvalité (Völker, Stapf, Mieke, & Wagner, 2019), var det av särskilt intresse som Nrf2-aktivitet analyserades inom detta projekt.

### 1.6.4 Genotoxicitet (mikrokärntest)

Genotoxicitet, d.v.s. DNA-skadande effekt, är en allvarlig effekt som kräver omfattande testning och utredning vid registrering av till exempel bekämpningsmedel, livsmedelstillsatser och aromämnen. DNA-skada i kroppsceller kan leda till cancer och andra sjukdomar och till reproduktionsstörningar om det drabbar könsceller. BioCell Analytica använder sig av ett mikrokärntest för att mäta genotoxicitet och metodiken följer i stora drag OECD Guideline 487 (2016) och andelen mikrokärnor analyseras med flödescytometri, som beskrivs i (Bryce, o.a., 2013). I metoden beskrivs att mikrokärntestet är ett alternativ till kromosomavvikelsestest och att några av fördelarna i förhållande till det testet är att mikrokärntestet betydligt lättare hittar agens (verksamt ämne) som kan leda till kromosomavvikelse och att metoden är lätt att automatisera.

## 2 Metod

### 2.1 Provtagningar

Provtagningar för effektbaserad analys och mikroföroreningar genomfördes under hösten 2021 och våren 2022. Upplägget för provtagningen har sett olika ut beroende på om deltagarna valde att utvärdera (i) endast befintlig process, eller om (ii) en pilotprocess också ingick.

#### 2.1.1 Befintlig process och pilotprocess

Samtliga deltagare tog ut prover i den befintliga processen genom att samla in prover från inkommande och utgående vatten samt prov i recipienten nedströms ARV. Sweco förespråkade tre provtillfällen för den befintliga processen och att dessa skulle spridas jämnt under hösten. För de deltagare som även skulle samla in prover för sin pilotprocess, rekommenderade vi att samtliga prover (befintlig process och pilotprocess) samlades in under samma period. Detta resulterade i att provtagningen för befintlig process omfattar prover från oktober 2021 till och med juni 2022. För provtagningen på reningsverken togs dygnsprov och i recipient samlades det in stickprov (se Tabell 2). Utöver detta provupplägg valde vissa deltagare att ta ut ytterligare prover: i Lidköping, t.ex., togs det ut prover uppströms ARV, och i Eskilstuna togs det även ut prover efter våtmark. I Bilaga 2, Tabell 2.1. visas alla deltagares prover.

För de deltagare som också utvärderade en pilotprocess, samlades det istället in prover avseende reningsverket i anslutning till att pilotförsöken var igång. Provtagningen skedde därmed under våren 2022. Detta gällde Uppsala, som samlades in dubbelprover för reningsverket (dygnsprover) och i recipient (stickprov). I Borås, hann de endast med en provtagning: dygnsprov togs på inkommande och utgående vatten från ARV medan stickprov togs i recipienten. För pilotprocessen togs det ut stickprov innan och efter det avancerade reningssteget. I de fall där det handlade om två reningssteg, t.ex. ozon efterföljt av en s.k. moving bed bioreactor (MBBR), som utvärderades i Eskilstuna, togs det ut prover efter steg 1 och efter steg 2 av reningsprocessen. Pilotprocessernas provtagningar sammanfattas i Bilaga 2 Tabell 2.2.

Tabell 2 sammanfattar rapportens deltagande VA-organisationer samt vilka prover och vilken typ av prover (dygnsprov, stickprov) som respektive organisation har valt att inkludera för analys. Utöver provtagning anges också hur stor påverkan, i form av vattenflöde som släppts ut relativt flödet i den mottagande recipienten för det specifika provtagningstillfället. Detta har vi valt att kalla för *andel ARV<sub>ut</sub> relativt recipient*. Denna andel är beräknad i procent

och de flöden som har utgjort dygnsflödet från respektive ARV för det aktuella provtagningsstillfället. För recipient har vi i bästa fall utnyttjat aktuell vattenföring för provtagningsstillfället. I de fall där detta inte varit möjligt har vi beräknat ett medelflöde i recipient utifrån befintlig information i VISS. Specifika detaljer anges i Tabell 2.

Tabell 2. Sammanfattning av VA-organisationer som ingått för den här rapporten, befintlig reningsprocess och vilken typ av process som blivit utvärderad (befintlig och/eller pilotprocess) samt andel av utgående vatten som går till aktuell recipient redovisad för respektive provtillfälle.

VA-organisation, ARV, (dimensionerande belastning)	Befintlig process	Typ av pilotprocess som ingår för analys	Typ av recipient	Andel ARV <sub>ut</sub> /Recipient (%) <sup>a</sup> för respektive provtagningsstillfälle
<b>Borås Energi och Miljö, Borås ARV (150 000 pe)</b>	Mekanisk – biologisk (anammoxrening av rejektvatten från förtjockare och centrifuger) och kemisk rening (dygnsprov)	Opacarb®FL (stickprov)	Sötvattenrecipient (stickprov)	8,00 <sup>c</sup>
<b>Eskilstuna Energi och Miljö, Ekeby ARV (150 000 pe)</b>	Mekanisk – kemisk – biologisk (aktivslamprocess) rening (dygnsprov)	Ozon + MBBR med två driftsätt: 0,6/12/60 0,8/12/30 (stickprov)	Sötvattenrecipient (stickprov)	1,3/6,2
<b>Gästrik Vatten, Duvbackens ARV (120 000 pe)</b>	Mekanisk – biologisk (aktivslamprocess med fosforreduktion) – och kemisk rening vid behov (dygnsprov)	-	Kustvatten (stickprov)	2,0/1,9/1,5 <sup>d</sup>
<b>Lidköping, Lidköping ARV (45 000 pe)</b>	Mekanisk – biologisk (aktivslamprocess med kväverening i oluftad anox zon och luftad zon) – och kemisk rening (dygnsprov)	-	Sötvattenrecipient (stickprov)	0,5/0,9/1,3
<b>Uppsala Vatten, Kungsängsverket (200 000 pe)</b>	Mekanisk (med förfällning) – biologisk (aktivslamprocess med kaskadkväverening) – och kemisk rening (dygnsprov)	GAK-kolonn (stickprov)	Sötvattenrecipient (stickprov)	11,2
<b>Västervik, Lucerna ARV (24 000 pe)</b>	Mekanisk (med förfällning) – biologisk (SBR-bassäng eller aktivslamprocess med kväverening) –kemisk rening (dygnsprov)	-	Kustvatten (stickprov)	0,1/0,1/0,1 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Andel (%) avloppsvatten i recipient vid provtagningsstillfället har beräknats med hjälp av flöde (q) för utgående (utg) och recipient (rec) enligt: Andel (%) =  $100 \times (q_{utg} / (q_{rec} + q_{utg}))$ .

<sup>b</sup> Andel för de tre olika provtillfällena

<sup>c</sup> Flödet i Viskan är beräknat till 3,8 m<sup>3</sup>/s vid provtagningsstillfället

<sup>d</sup> Flödet i Inre Fjärden har beräknats med antagandet att det sker total omblandning (vertikalt och horisontellt) och att total vattenmassa är  $80 \cdot 10^6 \text{ m}^3$  vilket ger medeflöde  $80 \text{ m}^3/\text{s}$  (oktober) och  $88 \text{ m}^3/\text{s}$  (november)

<sup>e</sup> Flödet i Skeppsbrofjärden är beräknat efter total volym ( $10,3 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ ) och omsättningstiden 2,22 dagar (november) och 1,52 dagar (december). Medelvattenflödet blev därmed 52 respektive  $76 \text{ m}^3/\text{s}$ .

För utvärderingen har vi beräknat medelvärden (och standardavvikelse) på uppmätta effekter. I de fall där inaktivitet har påvisats, har vi ersatt dessa värden med detektionsgränsen (LOD) för beräkning av medelhalt och erhållen reduktion av effekt.

### 2.1.2 Pilotprocesser som utvärderats

För den här rapporten har tre olika typer av pilotprocesser ingått. Eftersom ingen av dem är likadan, ger detta oss en möjlighet att få en översiktlig bild av hur de skiljer sig åt angående de studerade effekterna (t.ex. östrogen och androgen aktivitet, oxidativ stress och genotoxicitet). Det är dock svårt att generalisera, eftersom effekterna av olika behandlingar till stor del beror på vilka föroreningar som finns i vattnet. Tabell 3 sammanfattar vilka deltagare med respektive pilotprocess och tillhörande driftsätt som har ingått för den här rapporten.

I Borås har man valt att utvärdera en relativt ny process som ett aktivt kol (s.k. mikrokol) som går under namnet Opacarb®FL och som är en teknik utvecklad av Veolia. Mikrokol ligger storleksmässigt mellan de två mer kända sorterna pulverkol (PAK) och granulerat aktivt kol (GAK). Opacarb®FL är en uppströmsreaktor vilket innebär att avloppsvattnet pumpas in i botten och rinner ut i toppen av reaktorn. I reaktorn används mikrogranulerat aktivt kol (Chemviron Microsorb® 400R), ca  $300 \text{ g/l}$  i medelkoncentration, som fluidiseras av det uppåtriktade flödet. Mikroföroreningar och övriga organiska ämnen adsorberas på det aktiva kolet. Teknikens utformning möjliggör en regelbunden förnyelse av det aktiva kolet (ca  $30 \text{ g}$  tillsätts per behandlad  $\text{m}^3$  vatten) under drift genom att extrahera en andel av förbrukat aktivt kol och införa motsvarande volym av nytt aktivt kol. För försöket som provtagits i denna rapport ingick inte någon ozonprocess och uppehållstiden i kolbädden motsvarade 10 min. Piloten är även utrustad med en ozongenerator som kan användas för att dosera en liten dos ozon med väldigt kort kontakttid innan vattnet når den fluidiserade bädden. Ozongeneratoren var dock inte i drift i samband med provtagningen i juni.

I Eskilstuna har en process som innefattar ozon efterföljt av MBBR ingått för utvärdering. Här har två olika driftsätt ingått i utvärderingen. Det ena driftsättet genomfördes med en ozondos på  $0,6 \text{ g O}_3/\text{g DOC}$  och en uppehållstid på ca 25 min i kontakttanken, följt av 60 min uppehållstid i MBBR:en. Det andra driftsättet genomfördes med en högre ozondos, en kortare uppehållstid i kontakttanken, 12 min, och en kortare tid i MBBR:en (30 min).

Slutligen, i Uppsala valde man att utvärdera en GAK-kolonn uppförd i bänkskala och som behandlat vatten upp till  $13\,700 \text{ bäddvolym}$  (BV) vid provtillfället. GAK-kolonnen matas med ett förfiltrerat utgående vatten från ARV. Filtreringen görs för att GAK-kolonnen inte ska sätta igen. Det aktiva kolet i kolonnen är från Chemviron och är en regenererad GAK-produkt som heter Cyclecarb 401.



Tabell 3. Avloppsreningsverk med respektive pilotprocess och driftsätt som ingått för utvärderingen

Avloppsreningsverk	Pilotprocess	Driftsätt	Prover
Borås	Opacarb@FL <sup>a</sup>	10 min uppehåll i en fluidiserad bädd	Innan och efter pilot
Eskilstuna	Ozon efterföljt av MBBR	Ozondos (g O <sub>3</sub> /g DOC)/tid (min) i kontakttank/tid i MBBR (min): 0,6/25/60 och 0,8/12/30	Innan pilot, efter ozon (steg 1) och efter MBBR (steg 2)
Uppsala	GAK i kolonn <sup>b</sup>	Prov togs ut efter ca 13 700 BV GAK från Chemviron/Cyclecarb 401, ca 16 min kontakttid i kolbädden	Innan och efter kolonn

<sup>a</sup> Opacarb@FL kördes med 10 min uppehållstid i kolbädden.

<sup>b</sup> I Uppsala hade inte den stora pilotprocessen satt igång och därför valde de att utvärdera en uppställning med GAK-kolonn i bänkskala. Ingående vatten till GAK var förfiltrerat med två filter i serie (50 µm följt av 5 µm).

## 2.2 Provbearbetning för effektbaserade analyser

Vattenprover enligt upplägget i Tabell 2 analyserades med effektbaserade metoder av BioCell Analytica Uppsala AB. Bilaga 4 visar hur analysen fungerar steg för steg. Proverna koncentrerades 5000 gånger med hjälp av fastfasextraktion (HLB-kolonner vilka elueras med etanol) 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.

Proverna testades initialt för cellviabilitet (cytotoxicitet), för att utesluta koncentrationer som kan orsaka ospecifik toxicitet som påverkar cellerna på ett så negativt sätt så att det inte går att mäta specifika toxiska effekter. Proverna analyserades därefter i spädningsserier om 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 referenssubstans som är analyserad samtidigt. Om ett vattenprov har ett BEQ-värde om 10 pg ekvivalenter/l betyder det alltså att den biologiska aktiviteten i provet motsvarar den aktivitet som 10 pg/l av referenssubstansen skulle orsaka. BEQ-värdet beräknas för att kunna jämföra aktiviteten mellan prover och mellan studier. Referenssubstanserna är 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) för AhR-aktivitet, 17β-östradiol (E2) för ER-aktivitet, dihydrotestosteron (DHT) för AR-aktivitet, hydroxyflutamid (OHF) för anti-AR-aktivitet och tertiär butylhydrokinon (tBHQ) för Nrf2 (oxidativ stress).

### 2.2.1 Detektionsgränser för de effektbaserade analyserna

Detektionsgränserna för de olika parametrarna framgår av analysresultaten i Bilaga 5. Den höga känsligheten för aktivering av östrogenreceptorn är värd att notera: detektionsgränsen är normalt ca 0,01 - 0,05 ng östradiolekvivalenter/L (E2eq/L) för det aktuella analyslaboratoriet, vilket är ca 100 gånger lägre än detektionsgränsen vid kemisk analys av östradiol. Detektionsgränsen för vissa prover i den aktuella studien var 114 pg/L, vilket beror på att proverna var

cytotoxiska vid höga uppkoncentreringar och därför fick analyseras i lägre koncentrationer. Detta leder till att känsligheten för analysen minskar. Den högre detektionsgränsen har dock fortfarande god marginal till föreslagna akvatiska riktvärdet på 400 pg E2eq/L för östrogen aktivitet (Kunz, Kienle, Carere, Homazava, & Kasea, 2015).

## 2.3 Analys av mikroföroreningar

Merparten av de prover som har analyserats med effektbaserad analys har även genomgått analys avseende mikroföroreningar. Mikroföroreningarna är analyserade i ett miljöanalytiskt laboratorium i Kristianstad (MoLab) eller i ALS. De ingående substanserna från respektive laboratorium finns samlade i Bilaga 3.

Proverna som analyserats har genomgått upparbetning med fastfasextraktion (HLB-kolonner, Oasis SPE cartridges, Waters, metanol som elueringsmedel). Analyserna är genomförda med högupplösande vätskekromatografi (HPLC) följt av tandem masspektrometri (MS/MS).

## 2.4 Samband mellan biologiska effekter och kemisk analys

För att undersöka hur effektbaserad analys kan användas inom området avancerad rening av mikroföroreningar och hur en miljöriskbedömning kan göras inför eller under en installation av ett sådant reningssteg, har vi haft en ambition om att studera hur effekterna förändras över dels befintlig rening, dels en pilotprocess. Att i förlängningen också inkludera analysresultat från recipienten som är kopplad till det specifika reningsverket kan också ge en indikation om hur dessa analyser kan komplettera och eventuellt verka förklarande. Utöver att studera hur effekterna ser ut innan och efter ett reningsverk eller ett avancerat reningssteg, kommer vi också att mer specifikt undersöka hur t.ex. östrogen effekt kan relateras till kvantifierade mängder av specifika mikroföroreningar kända att ha östrogen effekt.

## 3 Resultat och diskussion

I detta kapitel redovisas de resultat vi har erhållit genom att analysera avloppsvatten med effektbaserad analys. Effekterna som analyserats har kategoriserats enligt hormonstörande effekter, där både östrogen, androgen och anti-androgen aktivitet ingår. Därefter redovisas effekter på metaboliserande system i form av aktivering av arylhydrokarbonreceptorn (Ah-receptorn (AhR)), följt av oxidativ stress som redovisas genom Nrf2-aktivitet. Resultaten visar avseende befintlig process följt av de effekter vi ser för tre pilotprocesser som ingått för utvärdering för tre deltagande VA-organisationer. Slutligen har vi försökt att finna korrelationer mellan kända kemiska ämnen och observerade effekter i avloppsvattnet.

### 3.1 Hormonstörande effekter

#### 3.1.1 Östrogen aktivitet i befintlig rening

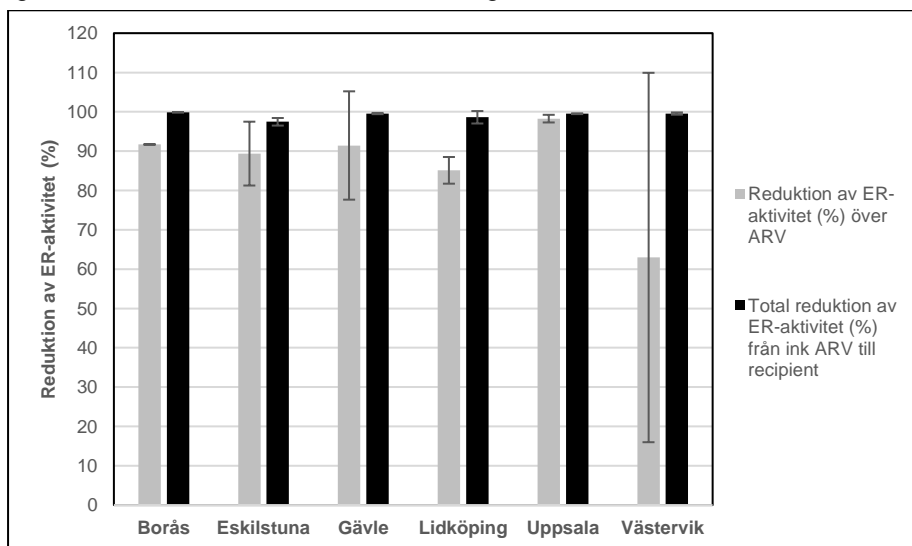
Jämförelser mellan östrogen aktivitet (ER-aktivitet) i olika prover och mellan olika studier kan göras genom parallell analys av en spädningsserie av 17 $\beta$ -östradiol (E2). Den östrogena aktiviteten i provet uttrycks som östradiolekvivalenter per liter vatten (pg E2eq/L), vilket anger att provets totala innehåll av östrogena ämnen ger samma östrogenaktivitet som den angivna koncentrationen av 17 $\beta$ -östradiol (E2).

Som vi nämnde redan inledningsvis är studier om östrogen effekt och avloppsvattenrening relativt etablerat i litteraturen. Även olika typer av avancerade reningssteg är studerade och utvärderade. För den här studien observerades en stor variation på ER-aktivitet i inkommande avloppsvatten; från ca 52 000 till drygt 280 000 pg E2eq/L. Detta är dock något lägre än vad som påträffades för svenska reningsverk i en tidigare genomförd studie där aktiviteter från 35 000 upp till drygt 900 000 pg E2eq/L uppmättes i inkommande avloppsvatten (Golovko, O., Lundqvist, J., Öhrn, S. och Ahrens, L., 2020). Även utgående halter var i vissa fall högre i samma studie (545-ca 37 000 pg E2eq/L) jämfört med de halter som påvisats i denna studie (2280 - 23 000 pg E2eq/L).

Figur 2 visar medelvärden över hur östrogen aktivitet, uttryckt som östradiolekvivalenter (pg E2eq/L), reduceras (%) över den befintliga reningen (grå staplar) och hur den totala reduktionen ser ut från inkommande avloppsvatten till recipient (svarta staplar). Även standardavvikelse för provtagningen är inkluderad. Samtliga uppmätta ER-aktiviteter finns presenterade i Bilaga 5.

För den befintliga reningen var den observerade reduktionen mellan 9% (Västervik) till 98% (Uppsala), vilket ligger i något lägre intervall som tidigare genomförda studier (Golovko, O., Lundqvist, J., Öhrn, S. och Ahrens, L., 2020; Lundqvist, Mandava, Lungu-Mitea, Yin Lai, & Ahrens, 2019; Stalter, Magdeburg, Wagner, & Oehlmann, 2011). En förklaring till den, i Västervik låga reduktionsgraden vid en av provtagningarna, kan vara att det rådde väldigt höga inkommande flöden vid det tillfället (drygt 50% mer än normalt) och vid de två andra provtagningarna var borttagningseffektiviteten betydligt högre (90% och 91 %). Det höga flödet resulterade i en förbiledning av det biologiska reningssteget motsvarande ca 1300 m<sup>3</sup>, vilket är 1000 m<sup>3</sup> mer än normalt. Resultatet från denna förbiledning var att endast 9% ER-aktivitet reducerades och den uppmätta ER-aktiviteten var 23 000 E2eq/L i utgående vatten. Detta åskådliggörs tydligt i Figur 2 genom en stor standardavvikelse. Även i Lidköping var reduktionsgraden relativt låg vid en av tre provtagningar med 63% jämfört med 96% och 97%. Vi har inte kunnat identifiera någon förklaring till varför ER-aktiviteten reducerades sämre vid ett provtillfälle men en viktig slutsats från detta är att det är viktigt med upprepade provtagningar för att fånga eventuella variationer i reningseffektivitet. Allra högst reduktion påvisades i Uppsala med 98%, där det togs dygnsprover. Medelhalt för utgående vatten var också lägst för Uppsala, men vid jämförelse med alla enstaka analyser var ett provresultat av två (dubbelprov) lägre i utgående vatten i Eskilstuna. Däremot visade detta dubbelprov på väldigt stor variation och vi kan därför inte säga om dessa utgående halter var lägre eller ej (se Bilaga 5 för detaljerade data).

Den totala reduktionen från inkommande avloppsvatten till recipient är däremot mer eller mindre samma för samtliga ARV (svarta staplar, Figur 2), från 95 - >99%. Figur 2 åskådliggör väl hur respektive recipient bidrar till ytterligare minskning av ER-aktivitet i form av en utspädning. Däremot är det svårt att se huruvida den ytterligare reduktion som erhållits från inkommande vatten till recipient kan anses vara tillräcklig för att inte utgöra en miljörisk för recipienten. Även om en hög reduktion observeras, kan de östrogena aktiviteterna i utgående renat vatten fortfarande vara höga, vilket beskrivs i nästa avsnitt.

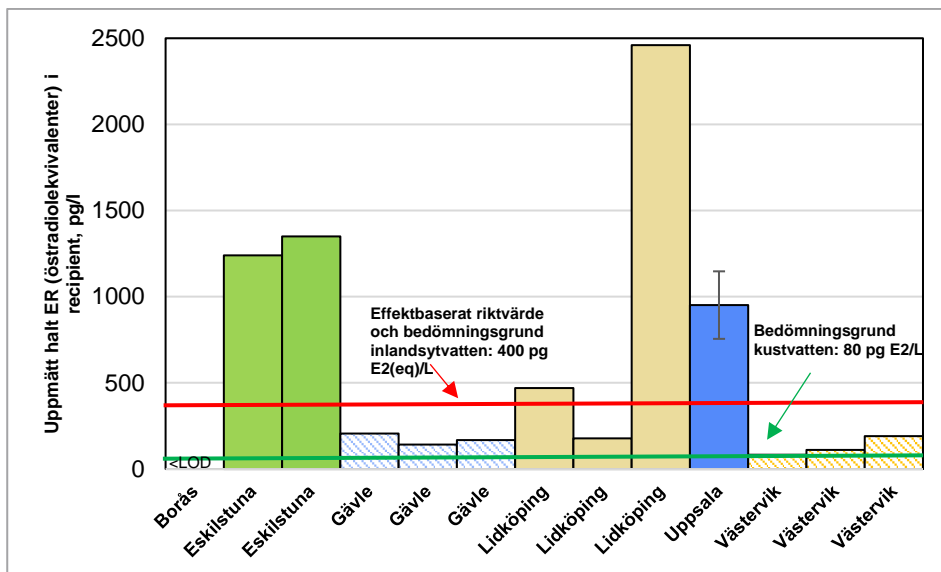


Figur 2. Reduktion (%) (gråa staplar) av ER-aktivitet (östrogen aktivitet) med beräknad standardavvikelse för befintlig process och beräknad total reduktion (%) (svarta staplar) från inkommande vatten till ARV och recipient för Borås, Eskilstuna, Gävle, Lidköping, Uppsala och Västervik. I Eskilstuna där en våtmark ingår, är denna inte inkluderad för beräkningen av erhållen reduktion över den befintliga processen.

### 3.1.2 Östrogen aktivitet i närliggande recipient

Även om den biologiska reningen på ARV kan reducera ER-aktivitet väl, återstår det ofta (för) hög östrogenicitet i utgående avloppsvatten, något som poängterats i litteraturen sedan drygt tio år (Stalter, Magdeburg, Wagner, & Oehlmann, 2011). Även här kan vi dra liknande slutsatser. Figur 3 visar hur den uppmätta östrogena aktiviteten såg ut relativt två aktuella bedömningsgrunder för 17 $\beta$ -östradiol på 80 pg/l (grön linje) och 400 pg/L (röd linje). Det senare värdet motsvarar det föreslagna effektbaserade riktvärdet (effect-based trigger value, EBT) för östrogen aktivitet på 400 pg E2eq/L (Kunz, Kienle, Carere, Homazava, & Kasea, 2015; Simon, o.a., 2022). EBT anger nivån upp till vilken effekten kan anses vara acceptabel för akvatiska organismer. Randiga staplar i Figur 3 motsvarar provresultat för kustvatten medan fyllda staplar visar provresultat för inlandsvatten. Bedömningsgrunden för god status för inlandsytvatten motsvaras av samma halt av 17 $\beta$ -östradiol (medelvärde på årsnivå) i Sverige (Havs- och vattenmyndigheten, 2019). I kustvatten och vatten i övergångszon är motsvarande bedömningsgrund 80 pg/l för 17 $\beta$ -östradiol. För våra mätningar observerades en stor variation på utgående ER-aktivitet (Figur 3); Borås hamnade under detektionsgräns (LOD). Både i Gävle och i Västervik är recipienten ett kustvatten (randiga staplar, Figur 3) och alla proverna (83 - 206 pg E2eq/L) överskred bedömningsgrunden för god status på 80 pg 17 $\beta$ -östradiol/L. I Lidköping, observeras att uppmätta halter i recipient är betydligt mer varierande: lägsta aktiviteten mättes till 178 pg E2eq/L, medan den högsta var 2460 pg E2eq/L. Två av tre mättillfällen här överskred 400 pg E2eq/L (Figur 3). Någon förklaring till denna variation har inte hittats men viss nederbörd hade inträffat innan första provtagningen. I Eskilstuna, där man tagit dubbelprover vid två provtillfällen, varierade halten inte lika mycket: från (som medel för dubbelproverna) 1240 till 1350 pg/l. I båda fallen överskreds dock det angivna EBT-värdet. Det ska nämnas att recipientprovet är insamlat i Eskilstunaån och att utspädningen vid provtillfället är uppskattat till ca 10 gånger, vilket är en väldigt låg siffra i jämförelse med de andra deltagande VA-organisationerna, som låg mellan 50 och 1000 gångers spädning.

De uppmätta östradiolekvivalenta koncentrationerna i recipienterna för denna studie kan relateras till den tidigare nämnda studien genomförd i Sverige där östrogena effekter uppmättes i 14 recipienter nedströms reningsverk (Golovko, O., Lundqvist, J., Öhrn, S. och Ahrens, L., 2020). I denna studie låg aktiviteterna under detektionsgräns i sex recipienter, medan två recipienter hade ER-aktiviteter under 400 pg E2eq/L. I övriga sex recipienter uppmättes aktiviteter över 400 pg E2eq/L, vilket motsvarar 42% av de undersökta recipienterna. För vår studie beräknade vi att bedömningsgrunden överskreds i 71% av fallen för inlandsvatten (7 provtagningar, 4 ARV) medan bedömningsgrunden för kustvatten överskreds för samtliga prover (3 provtagningstillfällen för 2 ARV).



Figur 3. Uppmätt ER-aktivitet (pg östradiolekvivalenter per liter) i recipienter för Borås, Eskilstuna, Gävle, Lidköping, Uppsala och Västervik. Röd linje motsvarar det effektbaserade riktvärdet på 400 pg E2eq/L samt bedömningsgrunden (årsmedelvärde) för 17 $\beta$ -östradiol på 400 pg/L i inlandsvatten; grön linje motsvarar bedömningsgrunden (årsmedelvärde) för 17 $\beta$ -östradiol på 80 pg/L i kustvatten och vatten i övergångszon (Havs- och vattenmyndigheten, 2019). Inlandsvatten är markerade med helfärgade staplar medan kustvatten är markerade med randiga staplar.

I bedömningen av befintlig process från ARV ovan har inte uppnådd effekt i våtmark inkluderats. Det är endast i Eskilstuna det finns en våtmark och här togs det även ut prover innan (dvs utgående från ARV, dubbelprover vid två tillfällen) och efter reningsverkets våtmark (enkelprover vid två tillfällen). Resultaten från första provtillfället visade inte på någon tydlig skillnad i östrogen aktivitet före och efter våtmarken. Vid det andra provtillfället var det stor skillnad i aktivitet mellan dubbelproverna på utgående vatten från ARV, och några slutsatser om effekten av våtmarken är svåra att dra. Det ska dock påpekas att provtagningen i våtmarken är komplex och uppehållstiden och vattnets väg genom våtmarken är svår att följa. Om vi beaktar de utgående halterna från våtmark (3740 respektive 2290 pg E2eq/L), kan vi konstatera att ett av två prover uppmättes till en lägre halt än vad som uppmättes i utgående vatten från ARV enligt vår diskussion ovan.

I Lidköping följdes östrogena aktiviteter både upp- och nedströms ARV i recipient. För två av tre mättillfällen påvisades det att östrogen aktivitet var högre nedströms ARV relativt uppströms. I dessa två fall överskreds därmed det effektbaserade riktvärdet på 400 pgE2eq/L samt bedömningsgrunden (årsmedelvärde) för 17 $\beta$ -östradiol på 400 pg/L i inlandsvatten.

### *Samband mellan andel avloppsvatten i recipient och uppmätta halter av östrogen aktivitet*

Att det blir olika utfall i recipienten kan bero på provtagningsmetodiken, befintliga aktiviteter i recipienten uppströms utsläppspunkten, men också rådande omblandning mellan utgående avloppsvatten och flödet i mottagande recipient. För att adressera det senare har vi samlat in data för det utgående dygnsflödet från respektive reningsverk den aktuella provtagningsdagen och även uppskattat medelflödet i den angränsande recipienten. Det var utmanande att hitta information kring flödet i recipienten för samtliga reningsverk; i t.ex. Västervik och Gävle kunde vi endast identifiera ett månadsflöde, medan vi

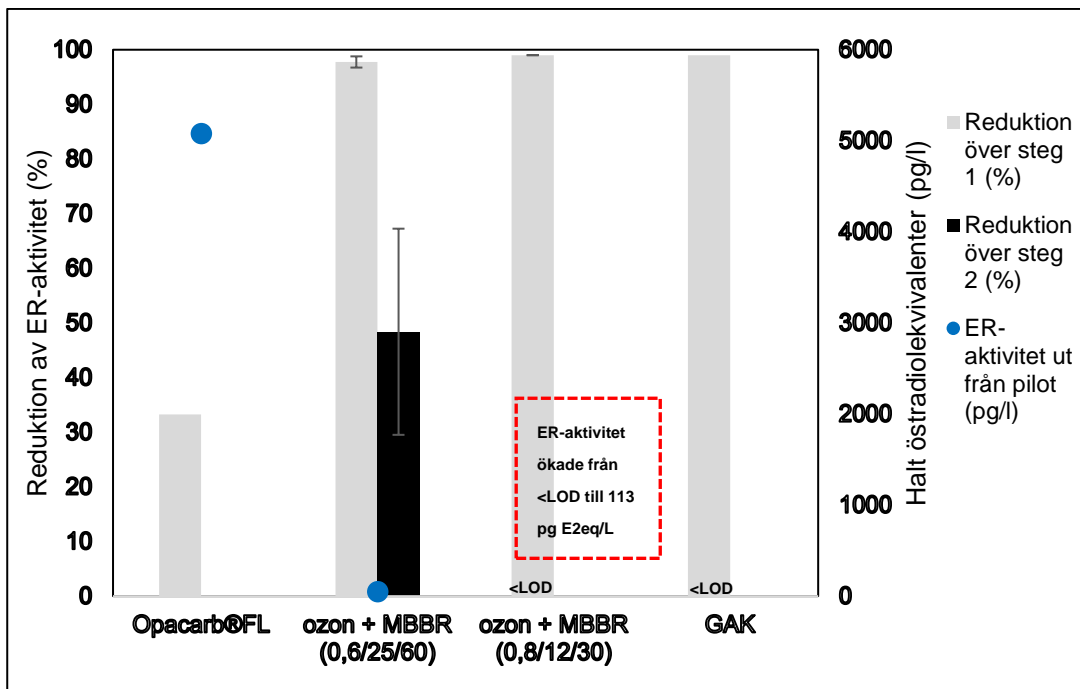
kunde hitta dygnsspecifika flöden i Uppsala, Lidköping och i Eskilstuna. Av denna anledning har vi inte kunnat jämföra vår data vidare, det finns helt enkelt för många osäkerheter. Däremot kunde vi se att viss korrelation mellan hög utspädning och låg uppmätt aktivitet föreligger ( $R^2$  är ca 0,7 för Lidköping), men eftersom mätillfällena är för få kan vi inte lämna några mer underbyggda uttalanden än så.

### 3.1.3 Östrogen aktivitet efter avancerad rening (pilotprocesser)

För att förhindra att östrogeniciteten i recipienterna överskrider bedömningsgrunder, vilket vi observerade för 85% av de genomförda recipientprovtagningarna (11 av 13 provtagningar), är det intressant att se vad ett avancerat reningssteg kan åstadkomma avseende reduktion av ER-aktivitet.

Figur 4 visar hur reduktionen av östrogen aktivitet såg ut för tre olika pilotprocesser, en med Opacarb®FL (fluidiserad kolbädd), en för ozon och MBBR och en med GAK-kolonner (bänkskala). För ozon och MBBR ingick två olika driftscenarion i) låg ozondos kombinerat med lång uppehållstid i MBBR och ii) hög ozondos kombinerat med kortare uppehållstid i MBBR. Den tredje pilotprocessen utgjordes av aktivt kol i en GAK-kolonn och var utformad i bänkskala (se 2.1.2 för mer detaljer). Ozon + MBBR utvärderades både efter steg 1 respektive steg 2, medan de andra pilotprocesserna endast omfattade ett processteg. Utöver erhållen reduktion av ER-aktivitet visas även utgående aktivitet efter det sista processteget för respektive teknik (Figur 4, höger y-axel).

Av de tre olika reningsteknikerna som utvärderats presterade Opacarb®FL sämst, vilket är förväntat eftersom denna pilot hade driftstörningar under provtagningstillfället. Erhållen reduktionsgrad motsvarade därmed endast 33% och utgående aktivitet uppmättes till 5080 pg E2eq/L (Figur 4, höger y-axel). Ozonsteget reducerade ER-aktivitet väl: 98% (låg ozondos, 0,6/25/60) och >99% (till <LOD) (hög ozondos, 0,8/12/30). Ytterligare ER-reduktion erhöles över MBBR vid tillfället låg ozondos, medan driftsättet med hög ozondos efterföljt av MBBR visade på en ökning av ER-aktivitet från <LOD till 113 pg E2eq/L (Figur 4). Detta skulle kunna bero på att det under ozoneringen skapats nya ämnen som ger upphov till östrogenicitet, men för att kunna dra några säkra slutsatser skulle fler provtagningar behövas. Kolonnen med GAK gav både hög reduktion av ER-aktivitet ( $\geq 98\%$ ) och utgående ER-aktivitet var under detektionsgräns, som här låg på 114 pg E2eq/L, vilket är tio gånger högre än för mätningarna av ozonprocessen i Eskilstuna (se 2.2.1 för förklaring och bilaga 5, tabell 5.2 för detaljer). Erhållen reduktion för ozon respektive GAK motsvarar här reduktionsgrader som både Stalter o.a. (2011) och Kienle o.a. (2022) observerade i sina respektive studier.



Figur 4. Reduktion (%) av ER-aktivitet (östrogen aktivitet) för steg 1 (grå staplar) och steg 2 (svarta staplar) för tre olika avancerade reningsprocesser: Opacarb@FL, ozon + MBBR och GAK. Ozon + MBBR följde två driftsätt: 0,6 g O<sub>3</sub>/g DOC, 25 min uppehållstid för ozon och 60 min i MBBR (0,6/25/60) och 0,8 g O<sub>3</sub>/g DOC, 12 min uppehållstid för ozon och 30 min i MBBR (0,8/12/30). Utgående ER-aktiviteter efter pilotprocesserna visas med blå datapunkter (höger y-axel).

### 3.1.4 Androgen aktivitet - aktivering (AR) och blockering (anti-AR) av androgenreceptorn i ARV och i recipient

Jämförelser mellan androgen aktivitet (AR-aktivitet respektive anti-AR-aktivitet) i olika prover och mellan olika studier kan göras genom parallell analys av en spädningsserie av referenssubstanten dihydrotestosteron (DHT) för AR-aktivitet och hydroxyflutamid (OHF) för anti-AR-aktivitet). AR-aktiviteten i provet uttrycks som dihydrotestosteronekvivalenter per liter vatten (ng DHTeq/L), vilket anger att provets totala innehåll av androgena ämnen ger samma AR-aktivitet som den angivna koncentrationen av DHT. På motsvarande sätt anges anti-AR-aktiviteten som hydroxyflutamidekvivalenter per liter vatten (ngOHFeq/L).

Androgen (AR) och anti-androgen (anti-AR) aktivitet observerades i alla inkommande vatten (AR-aktivitet: 4,1 - 278 ng DHTeq/L; anti-AR: 146 - 595 ng OHFeq/L), utom i ett prov där anti-AR-aktiviteten var under detektionsgränsen (i detta fall var LOD 580 ng OHFeq/L för mätningen i Eskilstuna, vilket var ett högre LOD relativt de andra mätningarna, se Bilaga 5). För AR, observerades minskad aktivitet för utgående vatten (<0,11 ng DHTeq/L) eller ingen aktivitet (LOD=0,01 eller 0,07 ng DHTeq/L). Detta motsvarar därmed  $\geq 99\%$  reduktion för de studerade reningsverken. För anti-AR uppmättes även aktivitet i utgående vatten för Borås och Västervik. Reningseffektiviteten varierade därmed från 80 till >99% och för tillfället då t.ex. Västervik hade problem med driften, kunde det observeras att reduktionsgraden sjönk ner till ca 49% för anti-AR (detaljerade data finns samlad i Bilaga 5). På liknande sätt observerades höga reduktionsgrader av AR-aktivitet (>99%) vid konventionell avloppsrening av Golovko o.a. (2020). I samma studie kunde det också konstateras av flera



reningsverk (9 av 16) visade på inaktivitet för anti-AR både i inkommande och utgående avloppsvatten, till skillnad från denna studie där samtliga ARV hade aktivitet för anti-AR i inkommande avloppsvatten.

För recipientproverna gällde att ingen aktivitet kunde påvisas för AR medan Borås och Västervik hade viss aktivitet av anti-AR i recipienten, vilket alltså utgör 30% av de studerade reningsverken. I Lidköping, där prover togs både upp- och nedströms utsläpp i recipient observerades det ingen aktivitet av vare sig AR eller anti-AR vid någon av recipientprovpunkterna.

För Eskilstuna var det endast utgående vatten från våtmark (innan recipient) som visade aktivitet av både AR och anti-AR, medan inkommande vatten och utgående vatten från ARV var inaktiva. Detta indikerar på att det kan råda en variation av aktivitet i utgående vatten, som är beroende av hur mikroföroreningar förändras och varierar i våtmarken.

### 3.1.5 Androgen aktivitet - aktivering (AR) och blockering (anti-AR) av androgenreceptorn för avancerad rening

Analys av AR- och anti-AR-aktivitet visade att samtliga prover över pilotprocessen var inaktiva (Bilaga 5). Någon bedömning av hur de avancerade reningsstegen kan reducera dessa aktiviteter kan därför inte göras.

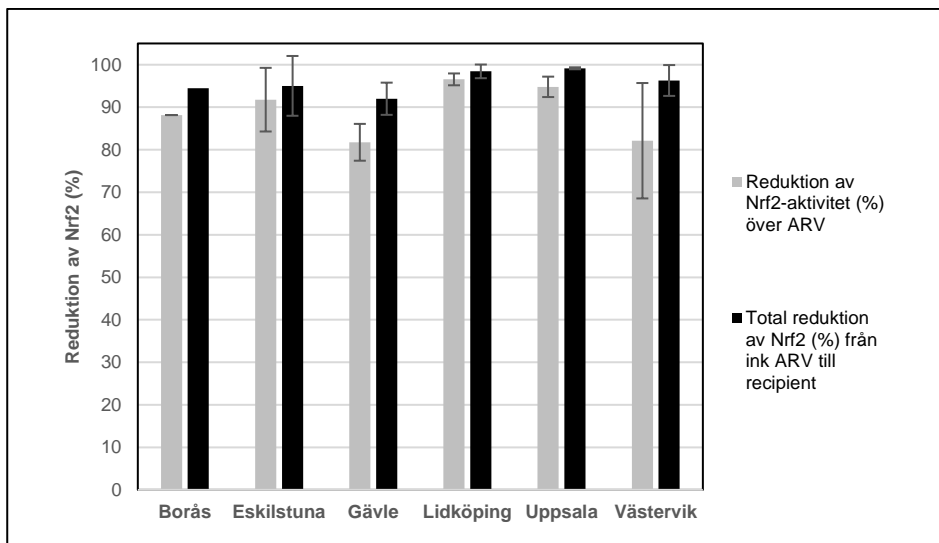
## 3.2 Oxidativ stress - Nrf2

### 3.2.1 Förändring av oxidativ stress i befintlig rening

Oxidativ stress mäts som induktion av Nrf2 och anges i proverna i förhållande till aktiviteten hos referenssubstanten tertiär butylhydrokinon (tBHQ) som  $\mu\text{g tBHQeq/L}$ .

Oxidativ stress uppmättes i samtliga inkommande och utgående vatten med ett undantag för ett prov i utgående vatten i Eskilstuna. Figur 5 visar hur oxidativ stress förändras över befintlig rening (gråa staplar) och total reduktion från inkommande till ARV till recipient (svarta staplar). Samtliga reningsverk påvisar en reduktion av Nrf2-aktiviteten med >80% (medelvärde) (Figur 5). De ARV som uppvisar högst reduktion av Nrf2-aktivitet är Lidköping (97% som medelvärde men i samtliga fall minst 95%) och Uppsala (95% och endast vid en provtagning), följt av Eskilstuna och Borås, medan Gävle och Västervik har en något lägre reduktion relativt de andra ARV. Det bör understrykas att det förekommit variation för provtagningarna. Särskilt stor var den för Västervik, men även i Gävle såg vi en variation. Detta åskådliggörs tydligt i den beräknade standardavvikelsen (Figur 5). För Västervik visade en provtagning på 65% reduktion, medan de båda andra visade 90% reduktion, i Gävle rörde det sig om 79% reduktion vid två fall och 87% i ett fall. Sammantaget är erhållna reduktionsgrader från denna studie något högre vid jämförelse med en annan studie genomförd på fem svenska reningsverk (Lundqvist, Mandava, Lungu-Mitea, Yin Lai, & Ahrens, 2019). Här visades att Nrf2-aktiviteten reducerades från 66% till 75% i två av reningsverken medan tre verk inte uppvisade någon Nrf2-aktivitet varken i inkommande eller utgående avloppsvatten.

Genomgående uppmättes låga Nrf2-aktiviteter i recipient (<40  $\mu\text{g tBHQeq/L}$ ) och vid 3 av 13 provtagningar uppmättes ingen aktivitet.



Figur 5. Reduktion (%) av Nrf2-aktivitet (oxidativ stress) med beräknad standardavvikelse över ARV (gråa staplar) och total reduktion från inkommande till ARV till recipient (svarta staplar) för Borås, Eskilstuna, Gävle, Lidköping, Uppsala och Västervik. I Eskilstuna där en våtmark ingår, är denna inte inkluderad för beräkningen av den befintliga processen.

För våtmarken i Eskilstuna analyserades oxidativ stress för inkommande vatten till våtmark (två dubbelprover) och för utgående vatten från våtmark (två enkelprover). Som tidigare nämnts är provtagningen i våtmarken komplex men genom provtagningen observerade vi att för ett tillfälle var oxidativ stress i utgående vatten från våtmark något högre än i inkommande vatten, medan det andra provtillfället indikerade på bibehållen aktivitet över våtmarken. I Lidköping, där prover togs ut både upp- och nedströms ARV påvisades Nrf2-aktivitet nedströms ARV för alla tre provtillfällena, medan två av tre provtillfällen uppströms ARV var inaktiva.

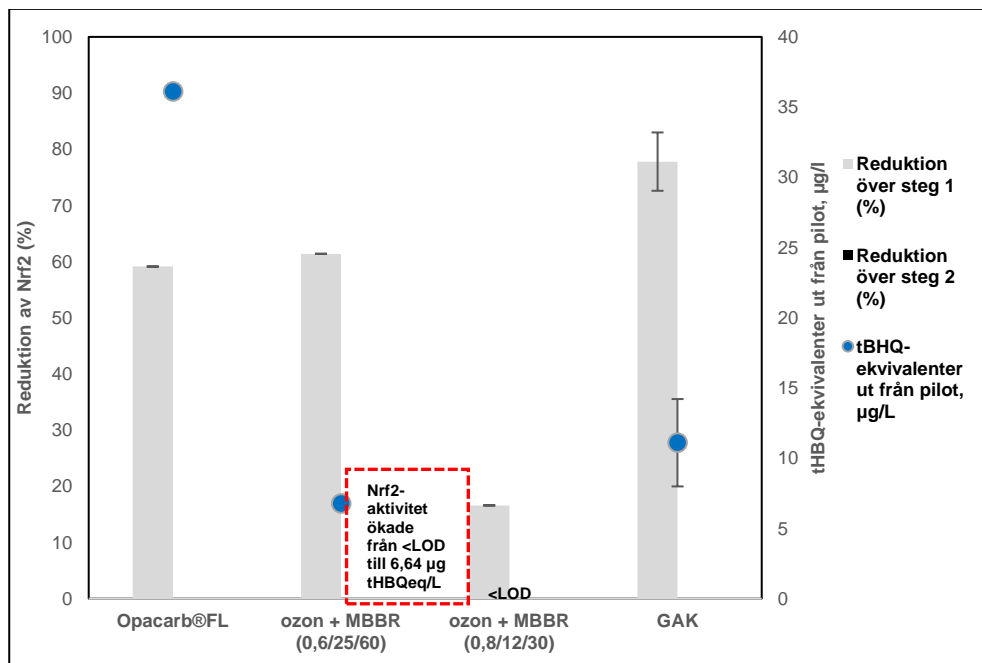
### 3.2.2 Förändring av oxidativ stress för avancerad rening

Förändringen av oxidativ stress för de olika processtegen som studerats som alternativ för avancerad rening visas i Figur 6. Även utgående halt av tBHQ-ekvivalenter från respektive pilotprocess visas. Det visas tydligt att Nrf2-aktiviteten reduceras av samtliga pilotprocesser. Opacarb®FL reducerade endast 59% av Nrf2-aktiviteten medan den andra kol-baserade pilotprocessen, GAK, visade ca 78% reduktion. För processen med ozon + MBBR, resulterade ozonsteget (steg 1), oberoende av driftsätt, att ingen aktivitet av Nrf2 kunde påvisas och reduktionen var >99%. Någon ytterligare reduktion över steg 2 för denna pilotprocess kunde därför inte kvantifieras och vi kan därmed inte heller uttala oss något om hur bra MBBR kan reducera Nrf2-aktivitet (Figur 6). Värt att nämna är att Nrf2-aktivitet kunde uppmätas efter MBBR vid en av två provtagningar, om än nära detektionsgränsen, vilket visar på en ökning av oxidativ stress under processen då prov tagna efter ozonering var inaktiva.

De högsta utgående aktiviteterna av Nrf2-aktivitet följde graden av reduktion väl: högst halt uppvisades för Opacarb®FL, följt av aktivt kol och därefter ozon + MBBR. Däremot, kunde viss ökning av Nrf2-aktivitet ses över MBBR när en hög ozondos utnyttjades (0,8/12/30), från inaktivitet till en medelhalt på ca 7,13 tBHQeg/L, vilket dock är väldigt nära LOD på 6,41. Samma observation gör vi inte när MBBR körs under en längre uppehållstid (60 min för driftsätt 0,6/12/60) men det är svårt att dra några generella slutsatser från så få provtagningar.

Opacarb®FL-processen kördes inte under ett optimalt driftsätt vid det enda provtagningstillfället (en stor mängd kol förlorades och flödet genom bädden kunde inte hållas jämnt). Driftstörningen kan vara en förklaring till den relativt låga reduktionen på 60% för processen men för att fastställa detta behöver fler mätningar göras. Resultaten som visas i Figur 6 antyder att de mikroföroreningar som leder till aktivering av Nrf2 i dessa prover verkar ha större förmåga till oxidation (såsom ozonering) än adsorption (t.ex. genom Opacarb®FL eller GAK).

Vid en jämförelse med andra studier har vi observerat att det är väldigt få studier som genomför utvärdering avseende oxidativ stress/Nrf2-aktivitet. I en översiktsartikel av Völker och medarbetare (2019) beskrivs att det endast är 3 studier utav 46 där Nrf2-aktivitet är utvärderad för avancerad rening. I den citerade studien observerades det att befintlig rening redan åstadkom närmare 87% reduktion av Nrf2-aktivitet, vilket överensstämmer ganska väl med vad vi har observerat här. Ozon, var ett avancerat reningssteg som utvärderats avseende Nrf2-aktivitet och ozonering ledde till att ytterligare 63% reducerades, i vårt fall ozonerades ett vatten med låg Nrf2-aktivitet (ett av fyra prover var inaktivt). Vi observerade för den här studien, att dubbelproverna vid de två provtagningarna efter ozonering var inaktiva (>99%, Figur 6). Det rapporteras också om ozon kombinerat med GAK, men variationen var väldigt stor och resulterade i ett medelvärde omkring ca 44% och bör därför inte betraktas som ett väl underbyggt värde för denna process (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019).



Figur 6. Reduktion (%) av Nrf2-aktivitet (oxidativ stress) för steg 1 och steg 2 av pilotprocess (Opacarb®FL, ozon + MBBR och GAK) och utgående halt av tertiär butylhydrokinon, µg tBHQ-ekvivalenter per liter, efter pilotprocessen (blå datapunkter, höger y-axel). Ozon + MBBR kördes med två driftsätt: 0,6 g O<sub>3</sub>/g DOC, 25 min uppehållstid för ozon och 60 min i MBBR (0,6/25/60) och 0,8 g O<sub>3</sub>/g DOC, 12 min uppehållstid för ozon och 30 min i MBBR (0,8/12/30).

## 3.3 Aktivering av Ah-receptorn (metaboliserande aktivitet)

### 3.3.1 Förändring av AhR-aktivitet i befintlig rening

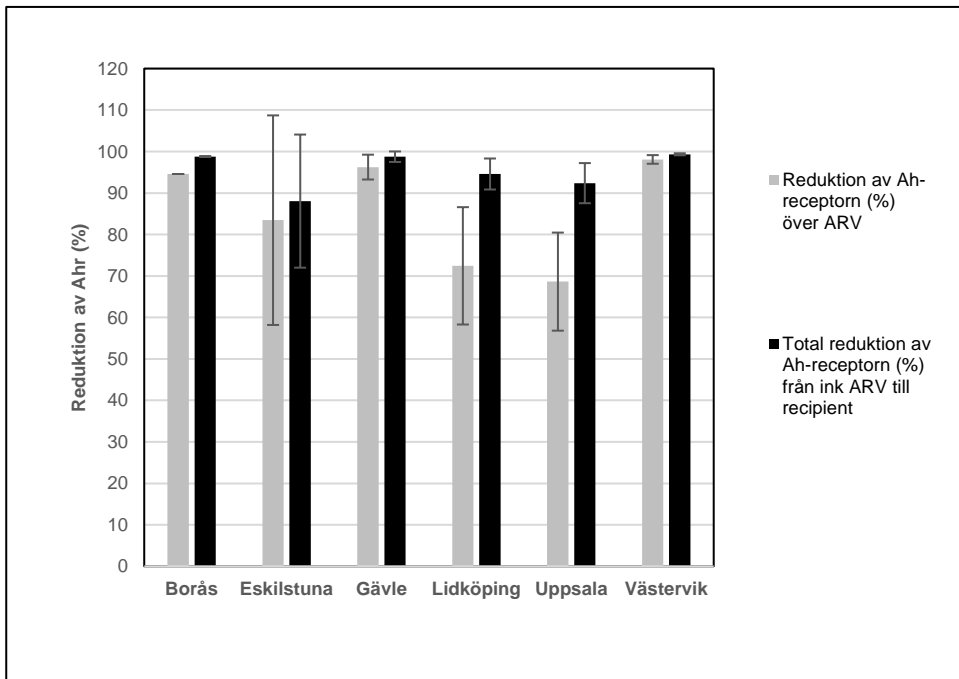
Ah-receptoraktivitet anges i proverna i förhållande till aktiviteten hos referenssubstanten 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) som ng TCDDeq/L.

Ah-receptorn (AhR) aktiveras av en rad främmande ämnen som vi likställer med organiska mikroföroreningar: t.ex. polycykliska aromatiska kolväten, polyklorerade bifenyler, furaner och dioxiner (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019). Däremot, nämner vi inte dessa ämnen lika ofta inom området avancerad rening av mikroföroreningar, vilket kan bero på att dessa ämnen i stor utsträckning fördelas till slamfasen på reningsverket. Med detta sagt är det därför fortfarande ovisst vilka ämnen som bidrar till att AhR aktiveras i avloppsvatten, även om biocider nämns som några potentiella kandidater på ämnen som kan aktivera AhR (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019). Figur 7 visar reduktionen (%) av AhR för befintlig rening och den totala reduktionen från inkommande till ARV till recipient.

AhR-aktivitet fanns i alla prover av ingående vatten (0,62 - 80,8 ng TCDDeq/L) och utgående vatten från ARV (0,33 – 3,04 ng TCDDeq/L). I recipient var ett prov under detektionsgränsen (<0,07 ng TCDDeq/L) och övriga låg i intervallet 0,11 – 0,88 ng TCDDeq/L.

Det övergripande resultatet är att dessa aktiviteter minskar över reningsverket; fyra av sex ARV uppvisar en reduktion från 95 - 99% (Figur 7), medan två ARV, Lidköping och Uppsala, uppvisar en något lägre reduktion över ARV (72% respektive 69%). Variationen på inkommande aktiviteter var dock stor, i Eskilstuna var inkommande aktivitet 80,8 respektive 0,62 ngTCDDeq/L vid två olika provtillfällen. För utgående och för samma ARV uppvisade ett dubbelprov inaktivitet, medan aktivitet mättes i det andra provet för utgående vatten. Sammantaget gav detta en stor spridning för beräkning av medelreduktion, vilket visas genom standardavvikelsen (Figur 7). Vid jämförelse med en liknande studie genomförd på fem svenska reningsverk, påvisades markant lägre reduktioner (Lundqvist, Mandava, Lungu-Mitea, Yin Lai, & Ahrens, 2019), i intervallet 15 - 60%. Völker och medarbetare (2020) nämner att medelreduktionen för de summerade studierna i deras översikt uppgår till ca 74,5%.

Den totala reduktionen, inkluderande såväl avskiljningen i ARV och utspädningen i recipienten, var närmare 90% för samtliga ARV (svarta staplar, Figur 7). Eskilstuna har något lägre reduktion (88%) och är återigen den recipient som vid provtillfället sannolikt hade lägst utspädning relativt de andra avloppsreningsverken. Här är det viktigt att påpeka att de inkommande halterna skilje sig betydligt åt för de två olika provtillfallen, vilket väl förklarar att reduktionen blir väsentligt annorlunda. Den stora spridningen i inkommande aktivitet speglas i stor variation i beräkning av medelreduktion och för tillhörande standardavvikelse.

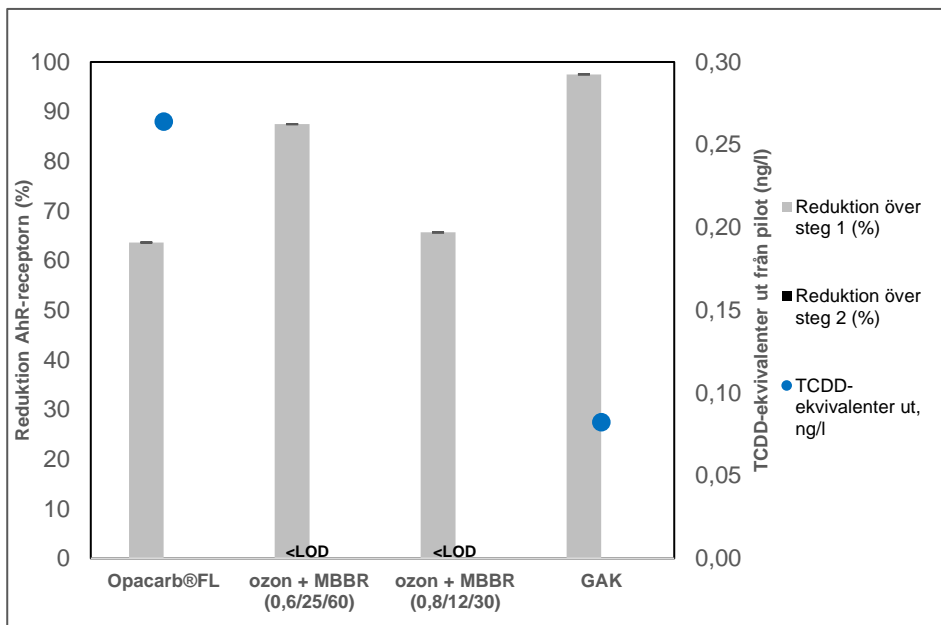


Figur 7. Reduktion (%) av Ah-receptorn med beräknad standardavvikelse över ARV respektive total reduktion från inkommande till ARV till recipient för Borås, Eskilstuna, Gävle, Lidköping, Uppsala och Västervik. I Eskilstuna där en våtmark ingår, är denna inte inkluderad för beräkningen av erhållen reduktion över den befintliga processen.

Likt observationen för oxidativ stress, såg vi även här en ökning för ett av två provtillfällena i effekt mellan utgående vatten från ARV och utgående från våtmark på Eskilstuna ARV. För Lidköping, där prov är uttaget både nedströms och uppströms ARV, indikerar resultaten att aktivering av AhR är högre nedströms ARV jämfört med uppströms ARV för två av tre provtillfällena (data ej presenterade, se Bilaga 5).

### 3.3.2 Förändring av AhR-aktivitet för avancerad rening

Även den avancerade reningen kan resultera i att AhR-aktiviteten minskar över reningssteget. Figur 8 visar hur denna förändring ser ut för de tre studerade reningsteknikerna. Efter ozonering kunde ingen AhR-aktivitet uppmätas (reduktionen var  $\geq 87\%$  (låg dos) respektive  $\geq 66\%$  (hög dos)). Detta gjorde att eventuell reningseffektivitet över MBBR-steget inte kunde utvärderas. Att reduktionen blev högre vid låg ozondos kan sannolikt relateras till att inkommande AhR-aktiviteter var olika; 0,55 ng/l (låg dos) och 0,20 ng/l (hög dos), för den senare provtagningen var dessutom ett av två prover inaktiva. Även GAK resulterade i god reduktion (ca 98%) och de utgående halterna var låga (0,08 ng TCDD<sub>eq</sub>/L), men detekterbara (LOD=0,07 ng TCDD<sub>eq</sub>/L, Figur 8). Litteraturen (t.ex. Völker och medarbetare, 2020 och referenser inom den) likställer ozon och GAK avseende hur väl de kan reducera AhR-aktiviteten, något som vi också konstaterar i denna undersökning.



Figur 8. Reduktion (%) av Ah-aktivitet för steg 1 och steg 2 av pilotprocess (Opacarb@FL, ozon + MBBR och GAK) och utgående halt av tetradiklorobensodioxin, TCDD-ekvivalenter (ng/L) efter pilotprocessen (blå datapunkter, höger y-axel). Ozon + MBBR kördes med två driftsätt: 0,6 g O<sub>3</sub>/g DOC, 25 min uppehållstid för ozon och 60 min i MBBR (0,6/25/60) och 0,8 g O<sub>3</sub>/g DOC, 12 min uppehållstid för ozon och 30 min i MBBR (0,8/12/30). Utgående halt av TCDD visas på höger axel i ng/l.

## 3.4 Genotoxicitet

### 3.4.1 Genotoxicitet i befintlig rening

Analys av genotoxisk effekt är ett binärt test där utslaget antingen är positivt (det finns genotoxisk effekt i provet), eller negativt (det saknas genotoxicitet). Tabell 4 visar resultaten för genotoxicitet i proverna från de olika reningsverken och tillhörande recipienter. Genotoxicitet indikeras med rött i tabellen, medan avsaknad av genotoxicitet är markerat i grönt.

Samtliga inkommande vattenprover var genotoxiska (Tabell 4) och merparten (71%) av alla analyserade prover (inkommande, utgående och i recipient) var genotoxiska. Det var främst för recipientproverna som avsaknad av genotoxicitet påträffades (t.ex. Gävle, Lidköping, ett av två från Eskilstuna), men vid två av tre provtillfällen observerades genotoxicitet i Västervik. För dessa ARV har utspädningen uppskattats att vara från 50 - 1000. I Eskilstuna, Uppsala och Västervik, däremot, påträffades genotoxicitet nedströms ARV.

Det finns två isolerade iakttagelser som är värda att påpeka. För Eskilstuna ARV, visade provtagningen att utgående vatten från ARV inte var genotoxiskt (tre av fyra prover) medan utgående vatten från våtmark samt ett prov från recipient indikerade på genotoxicitet (Tabell 4).

För recipientproverna i Lidköping ARV visade fem av sex prover att det inte fanns genotoxicitet vare sig uppströms eller nedströms ARV, medan ett av proven (taget uppströms ARV) visade på genotoxicitet.

Tabell 4. Analys av genotoxicitet för inkommande, utgående vatten från ARV samt recipientprover. Röda celler indikerar genotoxicitet medan gröna celler visar på avsaknad av genotoxicitet. Grå celler motsvarar provpunkter som inte ingått för det specifika reningsverket. Delade celler indikerar dubbelprover.

	Inkommande ARV	Utgående ARV		Utgående våtmark	Uppströms recipient	Nedströms recipient
Borås						
Eskilstuna <sup>a</sup>						
Eskilstuna <sup>a</sup>						
Gävle						
Gävle						
Gävle						
Lidköping						
Lidköping						
Lidköping						
Uppsala						
Västervik						
Västervik						
Västervik						

<sup>a</sup> Dubbelprover togs ut för utgående ARV

### 3.4.2 Genotoxicitet i avancerad rening

De utvärderade pilotprocesserna med ozon respektive GAK visade hög reningseffektivitet för den genotoxiska aktiviteten (Tabell 5). I samtliga fall där det inkommande vattnet till dessa processteg var genotoxiskt var vattnet efter reningsstegen icke-genotoxiskt. Som vi nämnde inledningsvis studeras mutagenicitet med hjälp av Ames test och för ozon har det i enstaka fall i litteraturen rapporterats inducerad mutagenicitet som resultat av ozonering, vilket sedan har eliminerats av efterföljande polersteg, se t.ex. Kienle och medarbetare (2022). I vår studie, däremot, har vi inte observerat någon inducerad genotoxicitet som resultat av ozonering, däremot har vi sett hur inkommande genotoxiskt vatten har påvisats icke-genotoxiskt som resultat av ozonering: se t.ex. Eskilstuna, Tabell 5. Här var ett av fyra prover av det inkommande vattnet genotoxiskt, vilket eliminerades redan under ozonprocessen. Hur MBBR kan eliminera genotoxicitet kan vi därför inte uttala oss om här heller.

Hur väl olika typer av polersteg till ozon fungerar (t.ex. MBBR, sandfilter, aktivt kol) avseende mutagenicitet är fortfarande relativt ovisst, vilket också poängteras i litteraturen. Detta är med andra ord ett område som förtjänar mer undersökningar framgent (Völker, Stapf, Miehe, & Wagner, 2019).

Opacarb®FL klarade inte att eliminera genotoxiciteten över pilotsteget men på grund av driftstörningen vid provtagningen väljer vi att inte dra några slutsatser av detta.

Tabell 5. Analys av genotoxicitet för inkommande pilot, utgående pilot steg 1 respektive utgående pilot steg 2. Röda celler indikerar genotoxicitet medan gröna celler visar på avsaknad av genotoxicitet. Grå celler motsvarar provpunkter som inte ingått för den specifika pilotprocessen och delade celler indikerar dubbelprover.

ARV	Pilotprocess	Ink. pilot		Utg. pilot, steg 1		Utg. pilot, steg 2	
Borås <sup>a</sup>	Opacarb®FL						
Eskilstuna	Ozon + MBBR, 0,6/25/60						
Eskilstuna	Ozon + MBBR, 0,8/12/30						
Uppsala	GAK						

<sup>a</sup> Pilotprocessen i Borås hade driftstörningar, vilket kan ha påverkat provresultaten.

### 3.5 Jämförelse mellan östrogen aktivitet och analyserade kemiska föreningar

I många studier har försök gjorts för att förklara uppmätt östrogen aktivitet med förekomst av organiska mikroföroreningar med östrogena effekter. I flera studier påpekas det dock att trots flera hundratals analyser av enskilda ämnen, så kan dessa endast förklara en bråkdel (ca 0,4%) av de effekter som mäts och detekteras på cellnivå (Robitaille, o.a., 2022). En stor del av den östrogena aktiviteten kan förklaras med förekomst av de potenta naturliga östrogenerna, särskilt östradiol och östron och den syntetiska östrogenen etinylöstradiol (ingår i p-piller). Problemet är att kemisk analys har för höga detektionsnivåer för dessa ämnen i förhållande till deras biologiska aktivitet, vilket gör att ämnena inte detekteras men troligen finns i icke-detekterbara koncentrationer.

Inom ramen för detta projekt har provtagning utförts avseende effektbaserad analys, men även några mikroföroreningar med östrogen aktivitet analyserades parallellt. Fyra ämnen från denna analys har i litteraturen identifierats som östrogena (Gutendorf & Westendorf, 2001), och dessa är bisfenol A, etinylöstradiol, 17 $\beta$ -östradiol och östron. I denna studie uppmättes inga detekterbara halter av östradiol (LOD=0,1 ng/L eller högre) eller etinylöstradiol (LOD=0,1 ng/L eller högre). (Simon, o.a., 2022) Simon o.a. (2022) analyserade 70 ytvatten i Europa och fann att 76% av proverna hade icke-detekterbara halter av naturliga östrogener och etinylöstradiol, medan effektbaserade metoder hade icke-detekterbara aktiviteter i 28% av proverna.

Utifrån vår kemiska analys har den relativa toxiciteten för varje ämne beräknats och angivits i nM östradiolekvivalenter, E2eq. (E2eq<sub>kemi</sub>), och summerats för samtliga ämnen. Vi beräknade två summor; i) en summa där icke-detekterbara halter (<LOD) ingick och fick motsvara en halt motsvarande LOD-värdet (=LOD), och en summa ii) där endast detekterbara halter inkluderades, dvs. <LOD antogs vara 0 och utgick därmed ur summaberäkningen. Resultatet från dessa beräkningar visas i Tabell 6.1, Bilaga 6 och åskådliggör tydligt vilken stor andel analyser som detekteras under detektionsgräns och med en relativt hög detektionsgräns utgör när den inkluderas i beräkningen.

Tabell 6.1 i Bilaga 6, visar tydligt att summan för den kemiska analysen angett i nM E2eq<sub>kemi</sub> är liten i jämförelse med nM E2eq uppmätt (E2eq<sub>BEQ</sub>) genom effektbaserad analys. Den kemiska analysen kunde alltså i mycket begränsad omfattning förklara de östrogena effekter som den effektbaserade analysen påvisade. Det visas också att samtliga genomförda analyser gav icke-



detekterbara halter av 17 $\beta$ -östradiol i inkommande och utgående avloppsvatten. För recipientproverna ser vi samma resultat: 17 $\beta$ -östradiol detekteras inte. Däremot, och vid jämförelse med uppmätt ER-aktivitet, ser vi flera recipientprover (Eskilstuna, Lidköping och Uppsala), med aktiviteter över bedömningsgrunden för god status i inlandsvatten på 400 pg E2/L. Än mer tydligt blir resultaten från kustbaserade recipienter, där alla värden har aktiviteter över bedömningsgrunden för god status, 80 pg E2/L. För denna studie motsvarar recipientprover som överskrider bedömningsgrunderna 85% av samtliga mätillfällen. På samma gång blir det tydligt att den effektbaserade analysen överträffar den kemiska analysen avseende att påvisa risk i recipienten.

För att illustrera detta vidare sammanfattas uppmätt ER-aktivitet från den effektbaserade analysen, angiven i pg E2eq/L, BEQ-värde och jämförs med andelen som den kemiska analysen motsvarar relativt denna (angiven som  $E2eq_{kemi}/E2eq_{BEQ}$ ), där  $E2eq_{kemi}$  motsvarar summan för detekterbara halter av bisfenol A, etinylöstradiol, 17 $\beta$ -östradiol och östron. Det kan noteras att inga prover hade halter av etinylöstradiol eller östradiol över detektionsgränsen (0.1 ng/L). Vi ser att, i bästa fall, motsvarar den kemiska analysen 3,05% av den uppmätta ER-aktiviteten (se inkommande vatten för Gävle, Tabell 6). Sammantaget, ser vi att den kemiska analysen endast utgör 0,00 - 3,05% av de uppmätta ER-aktiviteterna från reningsverken med tillhörande recipient, vilket alltså stödjer tidigare studier som visat att analys av enskilda ämnen endast kan förklara en mycket liten del av uppmätta effekter på cellnivå och att viktig information om överskridande av bedömningsgrader missas ifall man endast använder kemisk analys.

Tabell 6. Uppmätt östrogen aktivitet (mätt som BEQ-värden för ER-aktivitet (medelvärden), östradiolekv. pg/l) jämfört med andel (%) ER-aktivitet från kemisk analys ( $E2eq_{kemi}$  relativt uppmätt ER (BEQ-värde,  $E2eq_{BEQ}$ ). Relativ toxicitet är beräknad för detekterbara halter av bisfenol A, och östron; etinylöstradiol och 17 $\beta$ -östradiol var inte detekterbart i något prov. Recipientprover från inlandsvatten som överskrider 400 pg E2eq/L är markerade i grått och recipientprover från kustvatten som överskrider 80 pg E2eq/L är markerade med beige.

ARV	Provpunkt	ER-aktivitet, pg E2eq/L	Andel $E2eq_{kemi}^a / E2eq_{BEQ}$ (%)
Borås	Inkommande	91 700	na <sup>b</sup>
	Utgående	7610	0.02
	Recipient	114	0.44
Eskilstuna	Inkommande	55 800	0.45
	Utgående	5818	1.87
	Recipient	1295	1.04
Gävle	Inkommande	41 333	1.10
	Utgående	3577	3.05
	Recipient	172	1.93
Lidköping	Inkommande	68 533	0.56
	Utgående	8423	0.19
	Recipient	1036	0.29
Uppsala <sup>c</sup>	Inkommande	199 500	0.37

	<b>Utgående</b>	2900	0.00
	<b>Recipient</b>	951	0.02
<b>Västervik</b>	<b>Inkommande</b>	31 833	na <sup>b</sup>
	<b>Utgående</b>	9997	0.52
	<b>Recipient</b>	128	2.28

<sup>a</sup> Summan för E2eq<sub>kemi</sub> inkluderar endast uppmätta halter av bisfenol A, östron, etinylöstradiol och 17β-östradiol

<sup>b</sup> na, not applicable (E2eq<sub>kemi</sub> kan ej beräknas eftersom analys av mikroföroreningar saknas)

<sup>c</sup> I Uppsala har ett annat laboratorium utnyttjats och därför har endast östron, etinylöstradiol och 17β-östradiol analyserats.

## 4 Slutsats och utblick

- Effektbaserade cellanalyser visade sig vara ett värdefullt verktyg för att undersöka förekomsten av miljöfarliga ämnen i vatten och hur väl de avskiljs vid avloppsrening, samt för att utvärdera effektiviteten i pilotanläggningar.
- De effektbaserade celltesterna ger en tidig varning om förekomst av skadliga ämnen, men det ska påpekas att ett positivt utslag i någon av dessa parametrar inte automatiskt betyder att hela organismen skadas. Däremot ger testerna ett betydligt bättre underlag för bedömning av effekt än att bara mäta halter av kemiska ämnen.
- Flera av de effektbaserade parametrarna som ingick i denna utvärdering av de befintliga avloppsreningsprocesserna: ER, oxidativ stress och AhR, reducerades kraftigt (i regel >80 %) över ARV, men trots detta var t.ex. ER-aktivitet i utgående vatten fortfarande så hög att den skulle kunna ge negativa effekter på akvatiska organismer.
- Hög östrogen aktivitet (ER) uppmättes i flera recipienter och i Lidköping, Uppsala och Eskilstuna detekterades nivåer över bedömningsgrunden (årsmedelvärde) för god status i inlandsytvatten för 17 $\beta$ -östradiol och det föreslagna effektbaserade riktvärdet på 400 pg E2eq/L. Det ska påpekas att resultaten speglar data från enstaka provtagningar och inte årsmedelvärden som bedömningsgrunden avser. Större dataunderlag är alltid att föredra. Däremot kan vi utifrån resultaten få en indikation på att recipienten är påverkad, vilket bör följas upp med ytterligare mätningar.
- Många slutsatser bygger på enstaka prov och för de ARV där flera prover tagits finns en tydlig variation. Detta belyser vikten av att så långt möjligt ta flera prov vid fler tillfällen för att få ett så säkert resultat som möjligt. Det är extra viktigt vid provtagning i recipient där stora flödesvariationer förekommer under året och där bedömningsgrunderna för miljö kvalitet ofta baseras på årsmedelvärden.
- Trots att vi i flertalet av mättillfällena (effektbaserad analys) påvisade att det effektbaserade riktvärdet på 400 pg E2eq/L och bedömningsgrunderna (årsmedelvärde) överskreds, kunde inte samma slutsats dras enbart från kemisk analys genom t.ex. förekomst av 17 $\beta$ -östradiol. Detta visar tydligt att i) kemisk analys inte är tillräcklig för att bedöma förekomsten av östrogena ämnen i recipienter och ii) att den kemiska analysen inte är tillräckligt känslig, dvs detektionsgränsen är för hög relativt bedömningsgrunden.
- Lägre östrogen aktivitet påvisades i recipienter som är kustvatten (Västervik och Gävle), men aktiviteterna överskred ändå bedömningsgrunden (årsmedelvärde) för god status i kustvatten för 17 $\beta$ -östradiol, som är 80 pg E2/L, d.v.s. lägre än bedömningsgrunden för inlandsytvatten. Detta är ytterligare en bekräftelse på att kemisk analys är otillräcklig för bedömning av östrogena ämnen i recipienter.

- Det är sannolikt att halten uppmätt ER i recipient är lägre vid högre flöden i mottagande recipient, vilket visar vikten av att notera flödesdata i samband med provtagning.
- En bräddning av avloppsvatten i Västervik påverkade reningsresultatet markant. Det höga flödet resulterade vid ett provtagningstillfälle i en förbiledning av det biologiska reningssteget, vilket resulterade i att ER-aktiviteten över ARV endast reducerades 9% och att den uppmätta ER-aktiviteten var 23 000 pg E2eq/L i utgående vatten. Detta visar tydligt nyttan av konventionell avloppsrening för att minska östrogen aktivitet och understryker vikten av att minska antalet bräddningar.
- Alla inkommande prover till ARV var genotoxiska och genotoxiciteten kvarstod även i det renade, utgående avloppsvattnet i de allra flesta fall. Först i recipienten (nedströms) försvann genotoxiciteten i de flesta fall, men kvarstod i några provpunkter. Ett prov för Lidköping var genotoxiskt även uppströms ARV.
- Provtagning i Eskilstuna uppvisade i några fall högre effekt för oxidativ stress, AhR och AR efter våtmark jämfört med i utgående avloppsvatten, men inga säkra slutsatser kan dras från underlaget i denna rapport eftersom våtmarken är komplex att följa avseende vattenströmmar. Resultaten från denna rapport indikerar dock att det vore värdefullt att undersöka våtmarker vidare med effektbaserade analyser.
- För att rättvist jämföra de olika reningsteknikerna krävs det att de är testade på samma avloppsvatten. Så är inte fallet i denna undersökning, utan här ser vi snarare hur respektive teknik fungerar för respektive avloppsvatten. De effektbaserade parametrarna ER och AhR minskade ytterligare, jämfört med konventionell avloppsrening; >98% (ER) och ≥66-88% (AhR) för ozon medan vi observerade >99% (ER) och >98% (AhR) för GAK och utgående halt AhR och ER efter respektive pilot var <LOD (ozon + MBBR) och 0,08 ng TCDDeq/L (GAK).
- Varierande resultat noterades avseende oxidativ stress, vilket sannolikt kan relateras till att de inkommande aktiviteterna skiljde sig betydligt mellan de olika pilotprocesserna. I fallet för ozon observerades halter <LOD efter ozoneringssteget och i ett fall av fyra (låg ozondos) ökade oxidativ stress (ett av två prover) över MBBR-steget. Övriga prover visade ingen oxidativ stress. För GAK-piloten var inkommande aktivitet väsentligt högre och här reducerades ca 78% och utgående halt visade viss aktivitet.
- De effektbaserade parametrarna ER och AhR reducerades ytterligare genom avancerad rening; 66-97% för ozon och 97-99% för GAK. Avseende oxidativ stress erhöles varierade reduktioner från ≥17-61% för ozon, och 78% för GAK. De olika reduktionsgraderna kan inte jämföras mellan varandra avseende prestation utan skillnaderna beror sannolikt på att de inkommande halterna till respektive pilotprocess var annorlunda. En låg inkommande halt kan till exempel inte förväntas resultera i en lika stor reduktion (%) jämfört med en högre inkommande halt.
- Avancerad rening i form av ozon eller GAK reducerade många av dessa effektbaserade parametrar väl, vilket betyder att toxiciteten i utgående, renat avloppsvatten blev förhållandevis låg. I jämförelse med konventionell rening observerades t.ex. att ER-aktivitet sjönk till icke-detekterbara nivåer (<LOD) för både GAK och ozon, medan den konventionella reningen för dessa ARV ledde till överskridande av det effektbaserade riktvärdet på 400 pg E2eq/L och bedömningsgrunden för god status för 17β-östradiol, som är 400 pg E2/L i inlandsvatten och 80 pg E2/L i kustvatten.

- Pilotprocessen Opacarb<sup>®</sup>FL presterade markant sämre jämfört med både ozon efterföljt av MBBR och GAK, för samtliga studerade effektparametrar, vilket skulle kunna förklaras av att provtagningen genomfördes när processen hade en driftstörning.
- Eftersom ozonsteget reducerade flera av de effektbaserade parametrarna väldigt väl och i flera fall ner till halter under detektionsgräns, kunde inte MBBR bedömas avseende reduktion av de effektbaserade parametrarna.
- En jämförelse mellan effektbaserad analys och kemisk analys av enskilda ämnen, visade att kemisk analys endast kunde förklara maximalt 3% av de östrogena effekter som uppmättes med de effektbaserade metoderna.  $\geq 97\%$  av de östrogena effekterna som kunde uppmätas med effektbaserad analys skulle alltså missas om man förlitade sig enbart på kemisk analys. För att undersöka den totala östrogena effekten i utgående avloppsvatten och recipienter förordas därför effektbaserad analys.
- Vi rekommenderar fortsatt användning av effektbaserade analyser i och kring svenska avloppsreningsverk, både för befintlig och avancerad rening, för att få en större kunskap om reningseffekt och spridningen av miljöfarliga ämnen, samt en tidig indikation på potentiellt miljöstörande effekter. Det är önskvärt att provtagningen planeras med hänsyn till årstids- och flödesvariationer och att även provtagning uppströms ARV genomförs för att studera andra möjliga spridningsvägar för miljöstörande ämnen.

## 5 Referenser

- BioCell Analytica*. (Augusti 2022). Hämtat från [www.biocellanalytica.se](http://www.biocellanalytica.se)
- Brack, W., Aissa, S., Backhaus, T., Dulio, V., Escher, B., Faust, M., . . . Altenbu. (2019). Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Sciences Europe*, 31(10).
- Bryce, S., Avlasevich, S., Bemis, J., Tate, M., Walmsley, R., Saad, F., . . . Dertinger, S. (2013). Flow Cytometric 96-Well Microplate-Based In Vitro Micronucleus Assay With Human TK6 Cells: Protocol Optimization and Transferability Assessment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54, 180-194.
- dos Santos Argolo, A., Gomes, G., & Maia Bila, D. (2021). Insights into total estrogenic activity in a sewage-impacted urban stream assessed via ER transcriptional activation assay: Distribution between. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208.
- Escher, B., Stapleton, H., & Schymanski, E. (2020). Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. *Science*, 367, 388-392.
- Föllmann, W., Degen, G., Oesch, F., & Hengstler, J. (2013). i *Brenner's Encyclopedia of Genetics (2nd ed.)* (ss. 104-107).
- Golovko, O., Lundqvist, J., Öhrn, S. och Ahrens, L. (2020). *Kemiska och biologiska analyser i anslutning till reningsverk för att följa upp de beräkningar som gjordes i regeringsuppdraget om avancerad rening*. Naturvårdsverket.
- Gulde, R., Rutsch, M., Clerc, B., Schollée, J., von Gunten, U., & McArdell, C. (den 27 April 2021). Formation of transformation products during ozonation of secondary wastewater effluent and their fate in post-treatment: from laboratory- to fullscale. *Water Research*.
- Gutendorf, B., & Westendorf, J. (2001). Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology*, 79-89.
- Havs- och vattenmyndigheten. (2019). *Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om klassificering och miljö kvalitetsnormer avseende ytvatten, HVMFS 2019:25*.
- Itzel, F., Baetz, N., Hohrenk, L., Gehrmann, L., Antakyali, D., Schmidt, T., & Tuerk, J. (2020). Evaluation of a biological post-treatment after full-scale ozonation at a municipal wastewater treatment plant. *Water Research*.
- IWA. (2021). *Bioanalytical tools in water quality assessment Chapter 10. Current bioanalytical tools for water quality assessment*. Hämtat från [https://urldefense.com/v3/\\_\\_\\_https://iwaponline.com/ebooks/book/832/ch](https://urldefense.com/v3/___https://iwaponline.com/ebooks/book/832/ch)

apter/2507193/Current-bioanalytical-tools-for-water-quality\_\_!!HBVxBjZwpQ!2VGYSigRwsx6uoaYhwc6uC-95SR\_dUXJXIMgUtgRJ\_WQiW97Yos\_iN\_fVDyqnKOjXc0XV7qOCQFF8tHJgEqNQiC0bJmiW7KaHsc\$

- Kemikalieinspektionen*. (Augusti 2022). Hämtat från <https://www.kemi.se/kemiska-amnen-och-material/hormonstorand-amnen>
- Kienle, C., Werner, I., Fischer, S., Lüthi, C., Schifferli, A., Besselink, H., . . . Vermeirssen, E. (2022). Evaluation of a full-scale wastewater treatment plant with ozonation and different post-treatments using a broad range of in vitro and in vivo bioassays. *Water Research*.
- 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., Yin Lai, F., & Ahrens, L. (2019). In vitro bioanalytical evaluation of removal efficiency for bioactive chemicals in Swedish wastewater treatment plants. *Scientific reports*, 9(7166). doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43671-z>
- OECD. (2018). *Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*.
- Persson, M., Lundqvist, J., & Oskarsson, A. (2021). *Vad har hänt med vårt dricksvatten på 30 år?* Rapport 2021-07: Svenskt Vatten Utveckling.
- Robitaille, J. D., Kurita-Oyamada, H.-G., Marlatt, V., Martyniuk, C., Navarro-Martín, L., Prosser, R., . . . Langlois, V. (2022). Towards regulation of Endocrine Disrupting chemicals (EDCs) in water resources using bioassays – A guide to developing a testing strategy. *Environmental Research*, 205. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112483>
- Schindler Wildhaber, Y., Mestankova, H., Schärer, M., Schirmer, K., Salhi, E., & von Gunten, U. (2015). Novel test procedure to evaluate the treatability of wastewater with ozone. *Water Research*, 324-335.
- Simon, E., Duffek, A., Stahl, C., Frey, M., Scheurer, M., Tuerk, J., . . . m.fl. (2022). Biological effect and chemical monitoring of Watch List substances in European surface waters: Steroidal estrogens and diclofenac - Effect-based methods for monitoring frameworks. *Environment International*, 159. doi:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.107033>
- Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., & Oehlmann, J. (2011). Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. *Water Research*, 45, 1015-1024.
- vattenmyndigheten, H. o. (2019). *Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om klassificering och miljö kvalitetsnormer avseende ytvatten, HVMFS 2019:25*.
- vattenmyndigheten, H. o. (2019). *Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om klassificering och miljö kvalitetsnormer avseende ytvatten, HVMFS 2019:25*.
- von Sonntag, C., & von Gunten, U. (2012). *Chemistry of ozone in wastewater and water treatment, from basic principles to applications*. London: IWA publishing.
- Välitalo, P., Perkola, N., Seiler, T.-B., Sillanpää, M., K. J., Mikola, A., . . . Schultz, E. (2016). Estrogenic activity in Finnish municipal wastewater effluents. *Water Research*, 88, 740-749. doi:<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.056>

- Völker, J., Stapf, M., Miehe, U., & Wagner, M. (2019). Systematic Review of Toxicity Removal by Advanced Wastewater Treatment Technologies via Ozonation and Activated Carbon. *Environmental Science & Technology*, 53, 7215-7233.
- Wolf, Y., Oster, S., Shuliakovich, A., Brückner, I., Dolny, R., & Linnemann, V. (2022). Improvement of wastewater and water quality via a full-scale ozonation plant? – A comprehensive analysis of the endocrine potential using effect-based methods. *Science of the total environment*, 803.



# Bilaga 1 - Ämneslista från Naturvårdsverket

Tabell 1.1. Rekommenderade ämnen för analys från Naturvårdsverket<sup>4</sup>

Namn	Kommentar
Atenolol	
Carbamazepine	
Ciprofloxacin	
Citalopram	
Clarithromycin	
Diclofenac	
Erythromycin	
Fenolära ämnen	Åtminstone nonylfenol
Fluconazole	
Furosemide	
Ibuprofen	
Ketoconazole	
Losartan	
Methotrexate	
Metoprolol	
Mutagenicitet	AMES
Naproxen	
Oxazepam	
Paracetamol	
PFAS-11	Riskhantering – PFAS i dricksvatten och fisk (Livsmedelsverket)
Propranolol	
Sertraline	
Sulfamethoxazole	
Tramadol	
Trimethoprim	
Venlafaxine	
Zolpidem	
Östrogena effekter	YES (eller cellinjebaserad)

<sup>4</sup> Hämtad från Naturvårdsverkets hemsida den 8 september 2022;  
<https://www.naturvardsverket.se/bidrag/lakemedelsrening-vid-avloppsreningsverk/rekommenderade-amnen-for-analys/>

# Bilaga 2 – Sammanfattning av provtagning för de deltagande VA-organisationerna

Sammanfattning av prover som samlats in för utvärdering. Prover är tagna i inkommande (ink) och utgående (utg) avloppsvatten samt i recipient (rec).

Tabell 2.1. Beskrivning av prover som ingått för effektbaserad analys av den befintliga processen samt vilken typ av analys som är genomförd: effektbaserad analys genom BioCell Analytica (BA) och mikroföroreningar genom MoLab eller ALS<sup>a</sup>

Provnr.	Datum	ARV	Namn på prov	Beskrivning prov	Typ av prov	Analyslabb
1	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-ink	Inkommande avlopp Sobacken ARV	dygnsprov	BA
2	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-utg	Utgående renat avlopp Sobacken ARV	dygnsprov	BA + MoLab
3	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-rec	Recipient Viskan nedströms ARV	stickprov	BA + MoLab
4	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-ink	Inkommande avlopp Ekeby ARV	dygnsprov	BA + MoLab
5	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-utg 1	Avlopp innan pilot (utgående ARV)	dygnsprov	BA + MoLab
6	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-utg 2	Avlopp innan pilot (utgående ARV)	dygnsprov	BA + MoLab
7	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-våtmark-ut	Utgående från våtmark	stickprov	BA + MoLab
8	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-rec	Recipient nedströms våtmark	stickprov	BA + MoLab
9	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-ink	Inkommande avlopp Ekeby ARV	dygnsprov	BA + MoLab
10	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-utg 1	Avlopp innan pilot (utgående ARV)	dygnsprov	BA + MoLab
11	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-utg 2	Avlopp innan pilot (utgående ARV)	dygnsprov	BA + MoLab
12	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-våtmark-ut	Utgående från våtmark	stickprov	BA + MoLab
13	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-rec	Recipient nedströms våtmark	stickprov	BA + MoLab
14	2021-10-18	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-ink	Inkommande avlopp Duvbackens ARV	dygnsprov	BA + MoLab
15	2021-10-18	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-utg	Utgående vatten från Duvbackens ARV	dygnsprov	BA + MoLab
16	2021-10-18	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-rec	Nedströms recipient, Inre Fjärden, punkt K619	stickprov	BA + MoLab
17	2021-11-15	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-ink	Inkommande avlopp Duvbackens ARV	dygnsprov	BA + MoLab
18	2021-11-15	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-utg	Utgående vatten från Duvbackens ARV	dygnsprov	BA + MoLab
19	2021-11-15	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-rec	Nedströms recipient, Inre Fjärden, punkt K619	stickprov	BA + MoLab
20	2021-11-29	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-ink	Inkommande avlopp Duvbackens ARV	dygnsprov	BA + MoLab
21	2021-11-29	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-utg	Utgående vatten från Duvbackens ARV	dygnsprov	BA + MoLab

Provrnr.	Datum	ARV	Namn på prov	Beskrivning prov	Typ av prov	Analyslabb
22	2021-11-29	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-rec	Nedströms recipient, Inre Fjärden, punkt K619	stickprov	BA + MoLab
23	2022-02-16	Lidköpings Lidköpings ARV	Lidköping-ink	Inkommande avlopp, Lidköpings ARV	dygnsprov	BA + MoLab
24	2022-02-16	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-utg	Lidköpings ARV, utgående, dygnsprov	dygnsprov	BA + MoLab
25	2022-02-16	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec upp	Uppströms recipient Lidan (Ågårdbron)	stickprov	BA + MoLab
26	2022-02-16	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec ned	Nedströms recipient Lidan (Piren)	stickprov	BA + MoLab
27	2022-03-30	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-ink	Lidköpings ARV, inkommande, dygnsprov	dygnsprov	BA + MoLab
28	2022-03-30	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-utg	Lidköpings ARV, utgående, dygnsprov	dygnsprov	BA + MoLab
29	2022-03-30	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec upp	Uppströms recipient Lidan (Ågårdbron)	stickprov	BA + MoLab
30	2022-03-30	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec ned	Nedströms recipient Lidan (Piren)	stickprov	BA + MoLab
31	2022-06-08	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-ink	Lidköpings ARV, inkommande, dygnsprov	dygnsprov	BA + MoLab
32	2022-06-08	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-utg	Lidköpings ARV, utgående, dygnsprov	dygnsprov	BA + MoLab
33	2022-06-08	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec upp	Uppströms recipient Lidan (Ågårdbron)	stickprov	BA + MoLab
34	2022-06-08	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec ned	Nedströms recipient Lidan (Piren)	stickprov	BA + MoLab
35	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-ink 1	Inkommande ARV	dygnsprov	BA + ALS
36	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-ink 2	Inkommande ARV	dygnsprov	BA + ALS
37	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-utg 1	Utgående ARV	dygnsprov	BA + ALS
38	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-utg 2	Utgående ARV	dygnsprov	BA + ALS
39	2022-06-14	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-rec 1	Recipient Fyrisån, vid utlopp <sup>b</sup>	stickprov	BA + ALS
40	2022-06-14	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-rec 2	Recipient Fyrisån, vid utlopp	stickprov	BA + ALS
41	2021-11-04	Västervik, Lucerna	Västervik-ink	Inkommande ARV	dygnsprov	BA + MoLab
42	2021-11-04	Västervik, Lucerna	Västervik-utg	Utgående ARV	dygnsprov	BA + MoLab
43	2021-11-04	Västervik, Lucerna	Västervik-rec	Recipient, Skeppsbrofjärden	stickprov	BA + MoLab
44	2021-11-22	Västervik, Lucerna	Västervik-ink	Inkommande till ARV	dygnsprov	BA + MoLab
45	2021-11-22	Västervik, Lucerna	Västervik-utg	Utgående från ARV	dygnsprov	BA + MoLab
46	2021-11-22	Västervik, Lucerna	Västervik-rec	Recipient, Skeppsbrofjärden	stickprov	BA + MoLab
47	2021-12-14	Västervik, Lucerna	Västervik-ink	Inkommande till ARV	veckoprov	BA + MoLab
48	2021-12-14	Västervik, Lucerna	Västervik-utg	Utgående från ARV	veckoprov	BA + MoLab

Provnr.	Datum	ARV	Namn på prov	Beskrivning prov	Typ av prov	Analyslabb
49	2021-12-14	Västervik, Lucerna	Västervik-rec	Recipient, Skeppsbrofjärden	stickprov	BA + MoLab

<sup>a</sup> Ämneslista avseende mikroföroreningar återfinns i Bilaga 2.

<sup>b</sup> Recipientprov är insamlat 20 m från utloppet.

Tabell 2. 2. Beskrivning av prover som ingått för effektbaserad analys av de pilotprocesser som ingick för rapporten samt vilken typ av analys som är genomförd: effektbaserad analys genom BioCell Analytica (BA) och mikroföroreningar genom MoLab eller ALS<sup>a</sup>

Provnr.	Datum	ARV	Namn på prov	Beskrivning av prov	Typ av prov	Analyslabb
50	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-pilot-in	Avlopp innan pilot (utgående ARV)	stickprov	BA + MoLab
51	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-pilot-ut	Ut från pilot	stickprov	BA + MoLab
52	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot-in 1	Avlopp innan pilot (utgående ARV)	stickprov	BA + MoLab
53	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot-in 2	Avlopp innan pilot (utgående ARV)	stickprov	BA + MoLab
54	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_ozon-ut-1	Pilot, efter ozon, scenario 0,6/25/60	stickprov	BA + MoLab
55	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_ozon-ut-2	Pilot, efter ozon, scenario 0,6/25/60	stickprov	BA + MoLab
56	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_MBBR-ut-1	Pilot, efter MBBR (60 min HRT)	stickprov	BA + MoLab
57	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_MBBR-ut-1	Pilot, efter MBBR	stickprov	BA + MoLab
58	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot-in-1	Avlopp innan pilot (utgående ARV)	stickprov	BA + MoLab
59	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot-in-2	Avlopp innan pilot (utgående ARV)	stickprov	BA + MoLab
60	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_ozon-ut-1	Pilot, efter ozon, scenario 0,8/12/30	stickprov	BA + MoLab
61	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_ozon-ut-2	Pilot, efter ozon, scenario 0,8/12/30	stickprov	BA + MoLab
62	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_MBBR-ut-1	Pilot, efter MBBR (30 min HRT)	stickprov	BA + MoLab
63	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_MBBR-ut-1	Pilot, efter MBBR (30 min HRT)	stickprov	BA + MoLab

Provnr.	Datum	ARV	Namn på prov	Beskrivning av prov	Typ av prov	Analyslabb
64	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Upp-GAK-in-1	Innan GAK-kolonn, nr 1 <sup>b</sup>	stickprov	ALS + MoLab
65	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Upp-GAK-in-2	Innan GAK-kolonn, nr 2	stickprov	ALS + MoLab
66	2022-06-14	Uppsala, Kungsängsverket	Upp-GAK-ut-1	Efter GAK-kolonn, nr 1	stickprov	ALS + MoLab
67	2022-06-14	Uppsala, Kungsängsverket	Upp-GAK-ut-2	Efter GAK-kolonn, nr 2	stickprov	ALS + MoLab

<sup>a</sup> Ämneslista återfinns i Bilaga 2.

<sup>b</sup> Inkommande vatten till pilot är utgående renat avloppsvatten som filtrerats i följd genom 2 filter (50 µm och 5 µm).

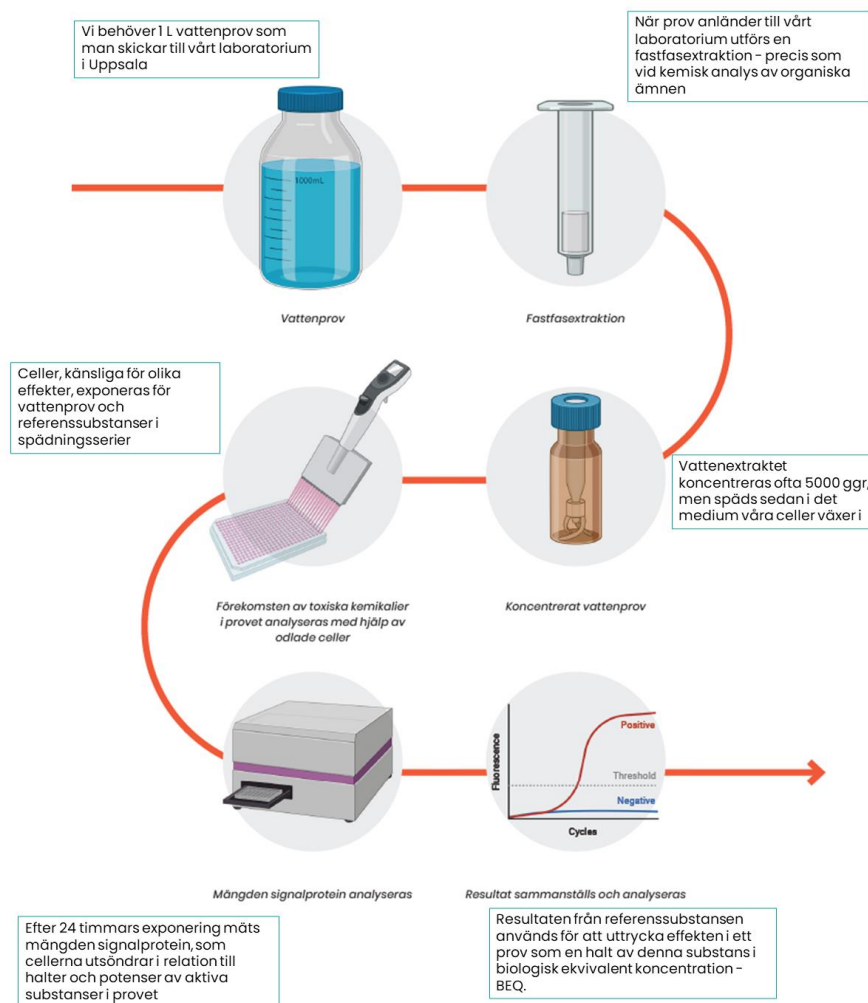
# Bilaga 3 - Ämnen som ingått för analys av mikroföroreningar

Tabell 3.1 Ämneslista för MoLab och ALS

Ämneslista MoLab	Ämneslista ALS
17 $\alpha$ -etinylöstradiol (EE2)	17 $\alpha$ -etinylöstradiol (EE2)
17 $\beta$ -östradiol (E2)	17 $\beta$ -östradiol (E2)
Acetamidrid	-
Amisulprid	-
Atenolol	Atenolol
Azitromycin	-
Bensotriazol	-
Bisfenol A	-
Ciprofloxacina	Ciprofloxacina
Citalopram	Citalopram
Diklofenak	Diklofenak
Erytromycin	Erytromycin
Flukonazol	-
Furosemid	Furosemid
Hydroklortiazid	-
Ibuprofen	Ibuprofen
Imidakloprid	-
Irbesartan	-
Karbamazepin	Karbamazepin
Ketokonazol	-
Klaritromycin	Klaritromycin
Losartan	-
Metoprolol	Metoprolol
Metotrexat	Metotrexat
Naproxen	Naproxen
Oxazepam	Oxazepam
Paracetamol	Paracetamol
PFOA	PFOA
PFOS	PFOS
Propranolol	Propranolol
Sertralin	Sertralin
Sulfametoxazol	Sulfametoxazol
Tiakloprid	-
Tiametoxam	-

<b>Ämneslista MoLab</b>	<b>Ämneslista ALS</b>
Tramadol	Tramadol
Trimetoprim	Trimetoprim
Venlafaxin	Venlafaxin
Zolpidem	Zolpidem
Östron (E1)	Östron (E1)

# Bilaga 4 - Steg för steg – vattenanalys BioCell Analytica





# Bilaga 5 - Uppmätta aktiviteter för befintlig process och pilotprocesser

Tabell 5.1. Uppmätta aktiviteter för samtliga ARV och för befintlig process

Provrnr	Datum	ARV	Beskrivning	AhR (ng/L)	LOD (ng/L)	Nrf2 (µg/L)	LOD (µg/L)	ER (pg/L)	LOD (pg/L)	AR (ng/L)	LOD (ng/L)	Anti-AR (ng/L)	LOD (ng/L)	Gentox
1	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-ink	13,4	0,0688	746	6,41	91700	114	55,9	0,0131	583	72,5	JA
2	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-utg	0,726	0,0688	88,3	6,41	7610	114	0,114	0,0131	73,4	72,5	JA
3	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-rec	0,162	0,0688	41,1	6,41	inaktivt	114	inaktivt	0,0131	109	72,5	NEJ
4	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-ink	80,8	0,0688	202	6,41	38600	14,2	4,12	0,0131	inaktivt	580	JA
5	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-utg 1	0,583	0,0688	18,4	6,41	3660	14,2	inaktivt	0,0131	73,3	72,5	NEJ
6	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-utg 2	0,515	0,0688	14,8	6,41	5030	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
7	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-våtmark-ut	1,11	0,0688	24,2	6,41	3740	14,2	0,0731	0,0131	inaktivt	72,5	JA
8	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-rec	0,49	0,0688	20,1	6,41	1240	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
9	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-ink	0,618	0,0688	49,2	6,41	73000	14,2	7,4	0,0131	146	72,5	JA
10	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-utg 1	0,332	0,0688	8,96	6,41	14400	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
11	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-utg 2	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	181	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
12	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-våtmark-ut	0,305	0,0688	inaktivt	6,41	2290	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
13	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-rec	0,144	0,0688	inaktivt	6,41	1350	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
14	2021-10-18	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-ink	33,4	0,0688	257	6,41	33700	14,2	278	0,0131	147	72,5	JA
15	2021-10-18	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-utg	2,3	0,0688	53,1	6,41	2280	14,2	0,0495	0,0131	inaktivt	72,5	JA
16	2021-10-18	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-rec	0,88	0,0688	31,8	6,41	206	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
17	2021-11-15	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-ink	29,9	0,0688	240	6,41	46600	14,2	154	0,0131	268	72,5	JA
18	2021-11-15	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-utg	1,03	0,0688	31,8	6,41	3000	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
19	2021-11-15	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-rec	0,281	0,0688	14,2	6,41	142	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
20	2021-11-29	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-ink	70,00	0,0688	182	6,41	43700	14,2	55,4	0,0131	216	72,5	JA
21	2021-11-29	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-utg	0,647	0,0688	37,9	6,41	5450	14,2	0,0219	0,0131	inaktivt	72,5	JA
22	2021-11-29	Gävle, Duvbackens ARV	Gävle-rec	0,109	0,0688	10,4	6,41	168	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ

Provnr	Datum	ARV	Beskrivning	AhR (ng/L)	LOD (ng/L)	Nrf2 (µg/L)	LOD (µg/L)	ER (pg/L)	LOD (pg/L)	AR (ng/L)	LOD (ng/L)	Anti-AR (ng/L)	LOD (ng/L)	Gentox
23	2022-02-16	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-ink	4,67	0,0688	1070	6,41	76400	14,2	33	0,0131	588	72,5	JA
24	2022-02-16	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-utg	0,709	0,0688	26	6,41	3420	14,2	0,0689	0,0131	inaktivt	72,5	JA
25	2022-02-16	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec upp	inaktivt	0,0688	17,9	6,41	208	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
26	2022-02-16	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec ned	inaktivt	0,0688	33,4	6,41	470	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
27	2022-03-30	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-ink	4,56	0,0688	898	6,41	52400	14,2	56,5	0,0131	595	72,5	JA
28	2022-03-30	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-utg	1,96	0,0688	45,2	6,41	19300	14,2	inaktivt	0,0131	74,7	72,5	JA
29	2022-03-30	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec upp	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	223	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
30	2022-03-30	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec ned	0,169	0,0688	inaktivt	6,41	178	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
31	2022-06-08	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-ink	12,4	0,0688	1010	6,41	76800	14,2	83,8	0,0131	585	72,5	JA
32	2022-06-08	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-utg	3,04	0,0688	29	6,41	2550	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
33	2022-06-08	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec upp	0,215	0,0688	inaktivt	6,41	178	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
34	2022-06-08	Lidköping, Lidköpings ARV	Lidköping-rec ned	0,351	0,0688	9,31	6,41	2460	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
35	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-ink 1	7,65	0,0688	1270	6,41	120000	114	76,8	0,0131	inaktivt	580	JA
36	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-ink 2	4,43	0,0688	645	6,41	279000	114	54	0,0131	inaktivt	580	JA
37	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-utg 1	1,22	0,0688	40	6,41	2670	114	0,0861	0,0131	inaktivt	72,5	JA
38	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-utg 2	2,3	0,0688	49	6,41	3130	114	0,0932	0,0131	inaktivt	72,5	JA
39	2022-06-14	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-rec 1	0,213	0,0688	12,9	6,41	813	114	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
40	2022-06-14	Uppsala, Kungsängsverket	Uppsala-rec 2	0,295	0,0688	inaktivt	6,41	1090	114	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
41	2021-11-04	Västervik, Lucerna	Västervik-ink	27,4	0,0688	149	6,41	36400	14,2	116	0,0131	390	72,5	JA
42	2021-11-04	Västervik, Lucerna	Västervik-utg	0,845	0,0688	14,8	6,41	3790	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
43	2021-11-04	Västervik, Lucerna	Västervik-rec	0,166	0,0688	10,8	6,41	83,1	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
44	2021-11-22	Västervik, Lucerna	Västervik-ink	35,6	0,0688	211	6,41	33900	14,2	18,7	0,0131	569	72,5	JA
45	2021-11-22	Västervik, Lucerna	Västervik-utg	0,388	0,0688	21,4	6,41	3200	14,2	inaktivt	0,0131	112	72,5	JA
46	2021-11-22	Västervik, Lucerna	Västervik-rec	0,165	0,0688	8,17	6,41	111	14,2	inaktivt	0,0131	73,8	72,5	JA
47	2021-12-14	Västervik, Lucerna	Västervik-ink	26,8	0,0688	62,6	6,41	25200	14,2	6,1	0,0131	259	72,5	JA
48	2021-12-14	Västervik, Lucerna	Västervik-utg	0,417	0,0688	21	6,41	23000	14,2	inaktivt	0,0131	132	72,5	JA
49	2021-12-14	Västervik, Lucerna	Västervik-rec	0,251	0,0688	inaktivt	6,41	191	14,2	inaktivt	0,0131	77,6	72,5	NEJ

Tabell 5.2. Uppmätta aktiviteter (namnge) för pilotprocesser

Provnr	Datum	ARV	Beskrivning	AhR (ng/L)	LOD (ng/L)	Nrf2 (µg/L)	LOD (µg/L)	ER (pg/L)	LOD (pg/L)	AR (ng/L)	LOD (ng/L)	Anti-AR (ng/L)	LOD (ng/L)	Gentox
50	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-pilot-in	0,726	0,0688	88,3	6,41	7610	114	0,114	0,0131	73,4	72,5	JA
51	2022-06-01	Borås, Sobacken ARV	Borås-pilot-ut	0,264	0,0688	36,1	6,41	5080	114	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
52	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot-in 1	0,583	0,0688	18,4	6,41	3660	14,2	inaktivt	0,0131	73,3	72,5	NEJ
53	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot-in 2	0,515	0,0688	14,8	6,41	5030	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
54	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_ozon-ut-1	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	65,9	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
55	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_ozon-ut-2	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	129	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
56	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_MBBR-ut-1	inaktivt	0,0688	7,13	6,41	63,3	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
57	2022-04-25	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_MBBR-ut-1	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	37,3	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
58	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot-in-1	0,332	0,0688	8,96	6,41	14400	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
59	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot-in-2	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	181	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
60	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_ozon-ut-1	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	inaktivt	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
61	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_ozon-ut-2	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	inaktivt	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
62	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_MBBR-ut-1	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	110	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
63	2022-05-16	Eskilstuna, Ekeby ARV	Eskilstuna-pilot_MBBR-ut-1	inaktivt	0,0688	inaktivt	6,41	116	14,2	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
64	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Upp-GAK-in-1	1,68	0,0688	57,1	6,41	2910	114	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
65	2022-06-09	Uppsala, Kungsängsverket	Upp-GAK-in-2	4,65	0,0688	62,7	6,41	9810	114	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	JA
66	2022-06-14	Uppsala, Kungsängsverket	Upp-GAK-ut-1	0,0823	0,0688	11,1	6,41	inaktivt	114	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ
67	2022-06-14	Uppsala, Kungsängsverket	Upp-GAK-ut-2	0,0759	0,0688	15,5	6,41	inaktivt	114	inaktivt	0,0131	inaktivt	72,5	NEJ

## Bilaga 6 - Kemisk analys och ER-aktivitet

Den uppmätta ER-aktiviteten visas i Tabell 6.1. och jämförs med summan av beräknad ER-aktivitet från kemisk analys (pM E2eq/L) av bisfenol A, etinylöstradiol, 17β-östradiol och östron. Den första summan inkluderar samtliga analyser, även de analyser där resultatet hamnade under detektionsgräns (<LOD). I dessa fall ersattes mätvärdet med LOD, vilket resulterar i höga summor baserat på ett antagande som blir missvisande. Kolumnen är med i sammanställningen för att illustrera problematiken. I den sista kolumnen avser summan endast *detekterade* östradiolekvivalenter. Analyser redovisade som <LOD har därmed exkluderats.

Tabell 6.1. Uppmätt ER-aktivitet angiven i E2eq pg/L och E2eq, nM, samt uppmätta halter (ng/L) av bisfenol A, etinylöstradiol, 17β-östradiol och östron. Summan för den relativa toxiciteten (nM E2eq<sub>kemi</sub>) för i) samtliga inkluderade analyser, och för ii) endast detekterade halter.

		Uppmätt ER-aktivitet, östradiolekvivalenter, pg E2eqv./L	Uppmätt ER-aktivitet, östradiolekvivalenter pM	Bisfenol A, ng/L	Etinylöstradiol, ng/L	17β - östradiol, ng/L	östron, ng/L	Summa, östradiolekv., från kemisk analys, pM E2eq. <sup>a</sup>	Summa, detekterade östradiolekv., från kemisk analys, pM E2eq. <sup>b</sup>
	Relativ toxicitet <sup>c</sup>	-		2,5*10 <sup>-5</sup>	1,25	1	0,01		
	Provpunkt								
Borås	Inkommande	91 700	337	na <sup>d</sup>	na <sup>d</sup>	na <sup>d</sup>	na <sup>d</sup>	na <sup>e</sup>	na <sup>e</sup>
	Utgående	7610	27,9	63,7	<0,1	<0,1	<0,1	0,8	0,007
	Recipient	114	0,419	16,7	<0,1	<0,1	<0,1	0,8	0,0023
Eskilstuna	Inkommande	55 800	205	113,8	<0,1	<0,1	24,6	1,7	0,922
	Utgående	5818	21,4	168,4	<0,1	<0,1	10,3	1,2	0,399
	Recipient	1295	4,75	12,9	<0,1	<0,1	1,3	0,8	0,049
Gävle	Inkommande	41 333	152	248,9	<0,1	<0,1	44,4	2,5	1,669
	Utgående	3577	13,1	112,8	<0,1	<0,1	10,5	1,2	0,401
	Recipient	172	0,631	10	<0,1	<0,1	0,3	0,8	0,012
Lidköping	Inkommande	68 533	252	258	<0,1	<0,1	37,2	2,2	1,404
	Utgående	8423	30,9	69,7	<0,1	<0,1	1,4	0,8	0,059
	Recipient	1036	3,80	<10	<0,1	<0,1	0,3	0,8	0,011
Uppsala <sup>f</sup>	Inkommande	199 500	732	na <sup>d</sup>	<50	<50	73	397,1	2,700
	Utgående	2900	10,6	na <sup>d</sup>	<5	<5	<5	39,6	0 <sup>g</sup>
	Recipient	951	3,49	na <sup>d</sup>	<5	<5	<5	39,6	0,001
Västervik	Inkommande	31 833	117	na <sup>d</sup>	na <sup>d</sup>	na <sup>d</sup>	na <sup>d</sup>	na <sup>e</sup>	na <sup>e</sup>
	Utgående	9997	36,7	58,6	<0,1	<0,1	5	1,0	0,191
	Recipient	128	0,470	16,9	<0,1	<0,1	0,24	0,8	0,011

<sup>a</sup>För analyser där ingen detektion erhållits (<LOD), inkluderar summahalten LOD-värdet

<sup>b</sup>Summahalten inkluderar endast analyser där detektion erhållits.

<sup>c</sup>Faktor för relativ toxicitet är tagen från Gutendorf och Westendorf (2001).

<sup>d</sup>na, not analyzed, inte analyserad

<sup>e</sup>na, not applicable – summan kan ej beräknas

<sup>f</sup>Analyserna är genomförda på ALS laboratorium med en annan detektionsgräns.

<sup>g</sup>Denna summa (för detekterade substanser) blir 0 eftersom inga substanser detekterats.