FORMAS

Ett forskningsråd för hållbar utveckling
A Research Council for Sustainable Development

Svenskt kommunalt avloppsvatten och dess påverkan på vattenlevande organismer

En systematisk översikt

Sakkunniga
Magnus Breitholtz, ordförande, professor i ekotoxikologi, Stockholms universitet.
Bethanie Carney Almroth, professor i ekotoxikologi, Göteborgs universitet.
Joakim Larsson, professor i miljöfarmakologi, Göteborgs universitet.
Karin Wiberg, professor i organisk miljökemi, Sveriges lantbruksuniversitet.

Adjungerad
Berndt Björlenius, B2 processteknik.

Formas
Tanja I. Näslund, projektledare.
Sten Anttila, biträdande projektledare.
Arvid Bring, biträdande projektledare.
Charlotte Åberg, informationsspecialist.

Rapport: F1:2022
ISBN: 978-91-540-6162-4
Diarienummer: 2018-02683

Stockholm, 4 april 2022.

Förord

Att sammanställa kunskap från vetenskapliga artiklar är ett viktigt verktyg för att säkerställa att beslut tas på solid vetenskaplig grund. Systematiska översikter kan i detta sammanhang vara ett viktigt komplement till andra beslutsunderlag. Inom miljöområdet behöver vi fortsätta att utveckla arbetet med systematiska analyser och sammanställningar, bland annat för att stärka den vetenskapliga basen men också för att minska osäkerheten i samband med viktiga miljöpolitiska beslut.

Det finns många viktiga och nödvändiga åtgärder som behöver genomföras inom miljöområdet, men vi behöver använda resurserna effektivt för att nå målen i Agenda 2030. I den här systematiska översikten om hur svenskt avloppsvatten påverkar vattenlevande organismer har vi kunnat visa att exponering för konventionellt renat avloppsvatten aktiverar mekanismer som tyder på skadliga effekter på organismer, och att ytterligare rening kan minska dessa effekter. Men det finns vetenskapliga osäkerheter i resultaten, och evidensbasen skulle behöva stärkas genom mer forskning och med forskning som har annan inriktning och frågeställningar.

Rådet för evidensbaserad miljöanalys har beslutat om genomförandet och fastställt slutsatser i den här översikten. Jag är stolt över att vi på Formas kan bidra med nytt vetenskapligt underlag till beslutsfattare, och därmed bidra till ett miljöarbete som bygger på vetenskaplig grund. Jag vill rikta ett stort tack till rådet, och till den expertgrupp som ansvarat för de vetenskapliga bedömningarna och slutsatserna. Jag vill också tacka Naturvårdsverket som är mottagare av rapporten och som bistått med värdefulla expertkunskaper.

Ingrid Petersson

Generaldirektör

Innehåll

1 Inledning 12

2 Bakgrund 14

2.1 Avloppsrening i ett sammanhang 14
2.2 Miljömål, policy och regelverk 14
2.3 Behovet av avancerad avloppsrening 15
2.4 Påverkan på vattenlevande organismer 17
2.5 Mätmetoder och testning 18
2.6 Forskning om svenskt avloppsvatten 19
2.7 Reningsteknik 21
2.8 Avancerad rening i Sverige 26
2.9 Ungefärliga kostnader för införande av avancerad rening 28

3 Metod 31

3.1 Frågeställning 31
3.2 Urvalskriterier 32
3.3 Sökning av litteratur 32
3.4 Urval av litteratur 34
3.5 Dataextraktion 34
3.6 Evidensgranskning 35
3.7 Metaanalyser 35
3.8 Olika typer av statistiska resultat 37
3.9 Evidensgradering 38
3.10 Kunskapsluckor 39
3.11 Bindningar och jäv 39

4 Resultat 40

4.1 Identifiering och urval av studier 40
4.2 Sammanfattning av de ingående studierna, organismer och studiedesign 41
4.3 Effekter av konventionellt renat avloppsvatten jämfört med referens- eller kontrollvatten 41
4.4 Effekter av ozonering som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten 64
4.5 Effekter av aktiverat kol som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten 76
4.6 Effekter av behandlingsvåtmarker som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten 82
4.7 Övrig avancerad behandling 87

5 Slutsatser och evidensgradering 88

5.1 Effekter av konventionellt renat avloppsvatten jämfört med referens- eller kontrollvatten 88
5.2 Effekter av ozonering som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten 89
5.3 Effekter av aktiverat kol som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten 90
5.4 Effekter av behandlingsvåtmarker som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten 90
5.5 Forskningsinsatser 91

6 Kunskapsluckor 92

7 Diskussion 94

7.1 Resultat och slutsatser 94

7.2 Underlagets brister och förtjänster 96
7.3 Koppling till substanser 99
7.4 Beslutskontext..... 100
8 Ordförklaringar 102
9 Referenser.....104

Sammanfattning

Bakgrund

Flera svenska kommunala reningsverk har den senaste 10-årsperioden investerat i mer avancerad rening av avloppsvattnet för att ytterligare rena bort oönskade substanser. Det finns dock fortfarande osäkerheter om hur vattenlevande organismer påverkas av konventionellt renat avloppsvatten, och om mer avancerad rening är nödvändig.

Naturvårdverket publicerade 2017 ett regeringsuppdrag avseende avancerad rening av avloppsvatten för avskiljning av läkemedelsrester och andra oönskade ämnen [43]. I den rapporten konstaterades ett behov av att införa avancerad rening på reningsverk utifrån försiktighetsprincipen. Detta utifrån risken för långsiktiga effekter av konstant exponering av låga halter läkemedelssubstanser med eventuella negativa effekter på organismer i den akvatiska miljön.

Naturvårdsverket har efterfrågat mer underlag om påverkan från renat avloppsvatten på vattenlevande organismer, i form av en systematisk översikt. I den här systematiska översikten utreder vi hur exponering för svenskt avloppsvatten påverkar vattenlevande organismer.

Metod

Vi har genomfört en grundlig litteratursökning i flera olika databaser, sökmotorer och webbplatser, med mål att hitta all relevant forskning. Litteratursökningen resulterade i 3387 unika sökträffar, varav 35 vetenskapliga artiklar uppfyllde urvalskriterierna och är inkluderade i översikten.

För att inkluderas i översikten var kraven att artiklarna studerat vattenlevande organismer under exponering av konventionellt renat avloppsvatten från svenska reningsverk. Jämförelsealternativen var antingen opåverkat vatten (referens- eller kontrollvatten) eller avloppsvatten med avancerad rening som tillägg till den konventionella reningen. De effekter som studerades skulle vara skadliga, indikera på skada eller påverkan på vattenlevande organismer eller ekosystem. Laboratoriestudier, burstudier i fält och fältprover ingick i urvalskriterierna.

Information om studieupplägg, ingående jämförelsealternativ, typ av undersökta vattenlevande organismer, utfallsmått, tidsperiod, plats, medelvärde, standardavvikelse mm. hämtades från artiklarna och sammanställdes i databaser.

Resultaten i dessa artiklar har granskats enligt ett granskningsformulär framtaget av US Environmental Protection Agency (motsvarande Naturvårdsverket i USA) i vilken metodologiska problem identifieras.

Sammanvägningar av resultat i metaanalyser har genomförts på data från fiskar. I de fall metaanalyser inte har varit lämpliga att genomföra har resultaten beskrivits i narrativa (verbala) synteser.

Slutsatser har formulerats utifrån resultat från metaanalyser och narrativa synteser. De övergripande slutsatserna har evidensgraderats, det vill säga vi har beskrivit hur säkra vi är på slutsatserna utifrån ett antal kriterier.

Resultat

Merparten av de 35 artiklarna har studerat subletala (skadliga men inte direkt dödliga) effekter hos fiskar som exponerats för renat svenskt avloppsvatten i akvarier på laboratorium. Utöver fisk har även musslor, hoppkräftor, sländor, bakterier och alger studerats i de inkluderade artiklarna. Tre trofinvåer finns därmed representerade i underlaget: primärproducenter (bakterier och alger), primärkonsumenter (musslor, hoppkräftor och sländor) och sekundärkonsumenter (fiskar).

Fältförsök har även utförts i studierna, antingen genom att organismer har placerats nedströms reningsverk eller att organismer har samlats in från fält.

Merparten av publikationerna som analyserat avancerad rening av avloppsvatten har studerat effekter av ozonerat avloppsvatten eller avloppsvatten behandlat med aktiverat kol. Behandlingsvåtmark som extra reningssteg har utvärderats för fyra våtmarker i mellersta Sverige.

Resultaten från den här översikten visar att konventionellt renat svenskt avloppsvatten (mekanisk, kemisk och biologisk rening) påverkar vattenlevande organismer på sätt som indikerar skada. Detta är särskilt tydligt i fisk, bland annat genom aktivering av avgiftningssystem och störningar på hormonell reglering av reproduktion jämfört med fiskar exponerade för opåverkat vatten. Tillägg av avancerad rening av avloppsvattnet minskar denna påverkan helt eller till viss del.

Mycket av forskningen baseras på laboratorieförsök, vilka konsekvenser den påverkan som dokumenterats har på populationsrelevanta mått (till exempel dödlighet, reproduktion) hos vilda populationer har endast undersökts i begränsad utsträckning.

Det saknas i tillräcklig omfattning kontrollerade fältstudier, som burstudier i fält, samt forskning på organismer tillhörande andra trofinivåer än sekundärkonsumenter, speciellt vad avser avancerad rening.

Underlaget är i sin helhet litet med få observationer, mer forskning är motiverat för att täcka det behov av vetenskapligt underlag som beslutsfattare har inför framtida beslut om avloppsrening.

Slutsatser

Den här systematiska översikten har resulterat i följande slutsatser:

1. Exponering för konventionellt renat svenskt avloppsvatten medför att vattenlevande organismer i större utsträckning påverkas på sätt som indikerar skada jämfört med exponering för opåverkat vatten.
   Vi är *säkra* på slutsatsen baserat på det vetenskapliga underlaget som ingår i översikten.

2. Ozonering som tilläggsbehandling minskar påverkan på vattenlevande organismer jämfört med exponering för konventionellt renat avloppsvatten.
   Vi är *ganska säkra* på slutsatsen baserat på det vetenskapliga underlaget som ingår i översikten.

3. Aktiverat kol som tilläggsbehandling minskar påverkan på vattenlevande organismer jämfört med exponering för konventionellt renat avloppsvatten.

Vi är *ganska säkra* på slutsatsen baserat på det vetenskapliga underlaget som ingår i översikten.

4. Det vetenskapliga underlaget för att bedöma behandlingsvåtmarker som tilläggsbehandling och dess påverkan på vattenlevande organismer är *otillräckligt*.

5. Baserat på det underlag som ingår i översikten är det tydligt att mer forskning med svenskt avloppsvatten på alla trofinivåer behövs.

De resultat som ligger till grund för slutsatserna och resonemanget kring evidensgraderingen redovisas i kapitel fem i översikten. Den första slutsatsen och evidensgraderingen bygger på att vi har data från alla tre trofinivåer som stödjer slutsatsen. Makroalgers tillväxt och hoppkräftors överlevnad påverkas negativt och hos fisk ses en aktivering av avgiftningssystem och störningar på hormonell reglering vid exponering för konventionellt renat avloppsvatten. Bakteriefloran är även påverkad nedströms reningsverk.

Med tillägg av avancerad rening i form av ozonering eller aktiverat kol observeras i fisk en minskad störning på hormonell reglering för reproduktion och lägre aktivering av avgiftningssystem. Men då det inte finns tillräckligt med data från primärproducenter och -konsumenter har vi valt en lägre evidensgraderingsnivå för slutsats två och tre.

Den systematiska översikt som presenteras här utgör ett underlag för att bedöma såväl behov som nytta av avancerad rening vid svenska kommunala reningsverk. Då det vetenskapliga underlaget inte är tillräckligt omfattande och robust för att dra mer säkra slutsatser bör emellertid fler informationskällor än effektstudier av svenska avloppsvatten vägas in i kommande beslut om kommunal avloppsrening.

Beslutsfattare kan exempelvis komplettera översikten med studier som undersöker halter av olika kemikalier i vattendrag förorenade av kommunalt avloppsvatten (renat med konventionell eller med tillägg av avancerad teknik) - och som jämför exponeringsnivån med kända/predikterade effektnivåer för olika kemikalier. Till detta kommer även information som tydliggör regionala skillnader i Sverige vad gäller exempelvis befolkningstäthet och vad som kännetecknar de mottagande vattendragen runt om i landet. Resultat från internationell forskning, med liknande kontext som Sverige (exempelvis befolkningstäthet, kemikalie- och läkemedelsanvändning), som undersöker avloppsvattnets effekter på vattenlevande organismer är också ett komplement som bör beaktas.

För berörda beslutsfattare på olika forskningsråd och andra forskningsfinansiärer hänvisar vi till de kunskapsluckor som vi identifierat och redovisat i ett eget kapitel i översikten.

Summary

Background

Several Swedish municipal wastewater treatment plants have invested in more advanced wastewater treatment over the past 10 years to further remove unwanted substances. However, there are still uncertainties about how aquatic organisms are affected by conventionally treated wastewater, and whether more advanced treatment is necessary.

As tasked by the government, the Swedish Environmental Protection Agency published a report in 2017 on advanced wastewater treatment for the removal of pharmaceutical residues and other undesirable substances [43]. The report found that there was a need to introduce advanced treatment at sewage treatment plants based on the precautionary principle. This due to the risk of long-term effects of constant exposure to low levels of pharmaceutical substances with possible adverse effects on organisms in the aquatic environment.

The Swedish Environmental Protection Agency has asked for a systematic review providing more information on the impact of treated wastewater on aquatic organisms. In this systematic review, we investigate how exposure to Swedish wastewater affects aquatic organisms.

Method

We have conducted a thorough literature search in several different databases, search engines and websites, with the goal of locating all relevant research. The literature search resulted in 3,387 unique search hits, of which 35 scientific articles met the selection criteria and are included in the review.

To be included in the systematic review, the articles must have studied aquatic organisms during exposure to conventionally treated wastewater from Swedish wastewater treatment plants. The comparator options were either unpolluted water (reference or control water) or wastewater with advanced treatment in addition to conventional treatment. The effects studied should have been harmful or have indicated damage to or impact on aquatic organisms or ecosystems. Laboratory studies, cage studies in the field and field samples were included in the selection criteria.

Information regarding study design, comparator alternative, type of aquatic organisms examined, outcome measures, time period, location, mean, standard deviation, etc. were taken from the articles and compiled in a database.

The outcomes reported in the articles have been reviewed according to a form produced by the U.S. Environmental Protection Agency that identifies methodological problems.

Results were pooled for fish in meta-analyses. In cases where meta-analyses were not appropriate, the results were described in narrative (verbal) syntheses. Conclusions have been formulated based on results from meta-analyses and narrative syntheses.

The overall conclusions have been graded, meaning that we have described the certainty of our conclusions based on a number of criteria.

Results

Most of the 35 articles have studied sublethal (harmful but not directly fatal) effects of fish exposed to treated Swedish wastewater in aquaria in laboratories. In addition to fish, mussels, copepods, damselflies, bacteria and algae have also been studied in the included articles. Three trophic levels are thus represented in the review: primary producers (bacteria and algae), primary consumers (mussels, copepods and dragonfly) and secondary consumers (fish).

Field trials have also been carried out in the studies, either by placing organisms downstream of treatment plants or by collecting organisms from the field.

Most of the publications that analyzed advanced wastewater treatment have studied the effects of ozone-treated wastewater or wastewater treated with activated carbon. Constructed wetlands as an additional purification step have been evaluated for four wetlands in central Sweden.

The results from this systematic review show that conventionally treated Swedish wastewater (mechanical, chemical and biological purification) affects aquatic organisms in ways that indicate damage. This is particularly evident in fish, including activation of detoxification systems and disturbances on hormonal regulation of reproduction compared to fish exposed to unaffected water. The addition of advanced wastewater treatment reduces this impact in whole or to some extent.

Much of the research is based on laboratory experiments, and the impact on population-relevant measures (e.g. mortality, reproduction) in wild populations has only been investigated to a limited extent.

There are not enough controlled field studies, such as cage studies in the field, or research on organisms belonging to trophic levels other than secondary consumers, in particular with regard to advanced treatment.

The evidence base is small in its entirety with few observations. More research is justified to meet the need for scientific knowledge that policymakers must have to make decisions on wastewater treatment.

Conclusions

This systematic review has resulted in the following conclusions:

1. Exposure to conventionally treated Swedish wastewater causes aquatic organisms to be more affected in ways that indicate damage compared to exposure to unpolluted water.
   We are *certain* of the conclusion based on the scientific material included in the systematic review.

2. Ozonation as an adjunct treatment reduces the impact on aquatic organisms compared to exposure to conventionally treated wastewater.
   We are fairly *certain* of the conclusion based on the scientific material included in the systematic review.

3. Activated carbon as an adjunct treatment reduces the impact on aquatic organisms compared to exposure to conventionally treated wastewater.
   We are fairly *certain* of the conclusion based on the scientific material included in the systematic review.

4. The scientific material for assessing constructed wetlands as additional treatment and their impact on aquatic organisms is *insufficient*.

5. Based on the research included in the systematic review, it is clear that more research on Swedish wastewater at all trophic levels is needed.

The results that form the basis for the conclusions and reasoning regarding the evidence grading are presented in Chapter 5 of the review. The conclusion no. 1 and evidence grading are based on the fact that we have data from all three trophic levels that support the conclusion. Macroalgae growth and the survival of copepods are adversely affected and in fish, an activation of detoxification systems and disruptions of hormonal regulation are observed when exposed to conventionally treated wastewater. The bacterial flora is also affected downstream wastewater treatment plants.

With the addition of advanced purification by ozonation or activated carbon, a reduced disruption of hormonal regulation for reproduction and lower activation of detoxification systems is observed in fish. However, in the absence of sufficient data from primary producers and consumers, we have chosen a lower level of evidence grading for conclusions 2 and 3.

The systematic review provides a basis for assessing both the needs and benefits of advanced treatment at Swedish municipal wastewater treatment plants. As the scientific evidence is not sufficiently comprehensive and robust, more sources of information other than studies of Swedish wastewater should be considered in future decisions on municipal wastewater treatment in order to draw more definitive conclusions.

For example, policymakers could supplement the systematic review with studies examining levels of different chemicals in waters contaminated by municipal wastewater (treated using conventional or with additional advanced technology) and comparing the level of exposure with known/predicted power levels for different chemicals. In addition, information that clarifies regional differences in Sweden in terms of, for example, population density and what characterizes the receiving waters around the country should be included. Results from international research, with a similar context to Sweden (such as population density, chemical and pharmaceutical use), which investigates the wastewater's effects on aquatic organisms is also a complement that should be considered.

For relevant policymakers at various research councils and funding organizations, we refer to the knowledge gaps that we have identified and reported in a separate chapter in the review.

1 Inledning

Konventionellt renat kommunalt avloppsvatten innehåller oönskade substanser som läkemedelsrester, industrikemikalier, kemikalier som ingår i kosmetika, rengöringsprodukter, pesticider, biocider mm, vilka var för sig och i kombination kan ha negativa effekter på vattenlevande organismer av olika slag. Vissa substanser är svåra att bryta ner och kan lagras och ackumuleras i djur och natur. Exempel på skadliga effekter kan vara beteendestörningar eller nedsatt reproduktionsförmåga hos fiskar. Direkta effekter på enskilda arter kan i sin tur påverka hela ekosystem. Detta innebär att det kan finnas negativa effekter som är svåra att överblicka.

Konventionell rening av avloppsvatten innehåller vanligtvis mekanisk, kemisk och biologisk behandling, med syftet att ta bort näringsämnen och en del smittsamma mikroorganismer (exempelvis bakterier). Målet med avancerad rening, som tillägg till konventionell rening, är att ta bort vissa kemikalier (till exempel läkemedel) och smittoämnen som kan finnas kvar efter konventionell behandling.

Ett viktigt beslutsproblem är därmed om och under vilka omständigheter avancerad rening av avloppsvatten bör införas vid kommunala avloppsreningsverk. Forskningsresultat om hur vattenlevande organismer påverkas av olika behandlingsalternativ kan här vara informativa. Detta gäller framför allt forskning avseende svenska avloppsreningsverk.

Från och med 2018 ska Formas, på uppdrag av regeringen, bidra till att Sveriges miljömål uppnås genom att identifiera var i miljöarbetet det finns behov av vetenskapligt grundad kunskap, det vill säga områden där kunskapsläget är omtvistat eller otillräckligt känt. Inom dessa områden ska vi ta fram relevanta och angelägna forskningssammanställningar. Dessa forskningssammanställningar ska vi sedan göra tillgängliga för beslutsfattare och andra som arbetar med miljömålen på myndigheter, länsstyrelser och i kommuner.

Syftet med denna systematiska översikt är att analysera forskning där man studerat hur svenskt kommunalt avloppsvattnet som genomgått konventionell rening påverkar vattenlevande organismer. Ett ytterligare syfte är att sammanställa forskning som undersöker hur tillägg av mer avancerad rening (ozonering eller aktiverat kol) påverkar vattenlevande organismer.

I den utsträckning som forskningsresultat saknas eller inte är tillförlitliga, så kan den systematiska översikten vara informativ i ett annat sammanhang genom att relevanta kunskapsluckor specificeras. Detta kan i sin tur motivera riktade forskningsmedel. Detta är också viktig information till forskare var mer forskning behövs för att täcka behovet av kunskap som finns hos beslutsfattare.

Projektet har initierats internt av Formas, men har sin upprinnelse i ett möte 2012 mellan Mistras råd för evidensbaserad miljövård och representanter för olika intressenter. Vid detta möte väcktes frågan om effekter av läkemedelsrester i avloppsvatten på organismer i akvatisk miljö av Havs- och vattenmyndigheten och av Kemikalieinspektionen. Förnyade kontakter togs 2018 av Formas med Havs- och vattenmyndigheten, Naturvårdsverket samt med forskare som medverkat i forskningsprogrammet MistraPharma.

Frågan bedömdes vara viktig att utreda, men man menade att inte bara läkemedelsrester utan även andra potentiellt miljöfarliga ämnen i avloppsvatten bör ingå i frågeställningen. Fokus ligger i denna systematiska översikt därför på att sammanställa forskning som studerar effekter av exponering för avloppsvatten oberoende av substans.

Av specifikt intresse, framfört av både intressenter och forskare, var att utreda påverkan av svenskt avloppsvatten på vattenlevande organismer. Detta beslutades även av rådet för evidensbaserad miljöanalys, som beslutar om vilka forskningssammanställningar Formas ska göra. Denna systematiska översikt är således begränsad till forskning som studerat svenskt avloppsvatten.

2 Bakgrund

I detta kapitel beskriver vi de lagar och bestämmelser som finns om avloppsrening, hur kemikalier riskbedöms i samhället och hur vattenlevande organismer kan påverkas av avloppsvatten som släpps ut i deras livsmiljö. Vi beskriver även de olika reningsstegen som används på de kommunala avloppsreningsverken i Sverige samt gör en genomgång av de olika typer av avancerad rening som finns tillgängliga idag.

2.1 Avloppsrening i ett sammanhang

Produktionen och användningen av kemikalier har ökat dramatiskt [10, 63] sedan andra världskriget, inte minst på grund av den storskaliga användningen av plast inom flera olika områden. I takt med en förbättrad levnadsstandard och befolkningsmängd globalt samt industrins uppfinningsrikedom har produktionen och användningen av kemikalier också ökat för en rad andra användningsområden som till exempel läkemedel, biocider och växtskyddsmedel.

Spridning av kemikalier till den yttre miljön återspeglar produktion och användning av kemikalier i samhället i stort. Källorna är många och bilden är komplex och många gånger svår att få grepp om. Utöver utsläpp från punktkällor, såsom industriella verksamheter, avfallsanläggningar, kraftvärmeverk och kommunala avloppsreningsverk, så finns även olika diffusa utsläpp, till exempel från trafik och användning av konsumtionsprodukter.

Vattendrag, sjöar och hav anses vara viktiga recipienter och slutdestinationer för många kemikalier, bl.a. genom avrinning från land och deposition från luft, men inte minst via utsläpp av avloppsvatten från såväl industrier som kommunala avloppsreningsverk.

2.2 Miljömål, policy och regelverk

Den europeiska miljöpolitiken vilar på principerna om försiktighet, förebyggande och åtgärdande av förorening vid källan och att förorenaren betalar. Europeiska kommissionen presenterade i oktober 2020 en ny kemikaliestrategi för hållbarhet, med ambition och målsättningar för kemikaliepolitiken under kommande år. Strategin innehåller bland annat åtgärder som rör hormonstörande ämnen, farliga ämnen i varor, och särskilt i varor som importeras till EU, kombinationseffekter och svårnedbrytbara kemikalier såsom per- och polyfluoroalkyl substanser (PFAS).

Syftet med strategin är att förbättra skyddet för människor och miljön från skadliga kemikalier, bland annat genom att förenkla och förstärka lagstiftningen samt att kemikalieindustrin ökar takten på utvecklingen av säkra och hållbara kemikalier. Strategin är en del av en nollutsläppsvision för en giftfri miljö som meddelades i EU-kommissionens politiska agenda ”den gröna given”.

För att nå dessa mål finns på kemikalieområdet en lång rad olika EU-regelverk som syftar till att säkerställa att olika kemikaliegrupper tillverkas, importeras och används på ett för människa och miljö säkert sätt, till exempel Biocidförordningen (EG 528/2012) och REACH (EC 1907/2006). Utöver detta finns EU-direktiv som mer allmänt syftar till att skydda eller förbättra EU:s alla

vatten. I dessa direktiv listas även ett antal prioriterade ämnen som bör övervakas i ytvatten, till exempel i Ramdirektivet för vatten (2000/60/EG) samt Ramdirektiv om en marin strategi (2008/56/EG).

I Sverige finns det sedan 1999 också 16 miljökvalitetsmål som beskriver det tillstånd i den svenska miljön som miljöarbetet ska leda till. Ett av dessa mål - ”Giftfri Miljö” - är tydligt kopplat till användningen av kemikalier och anger att:

”Förekomsten av ämnen i miljön som har skapats i eller utvunnits av samhället ska inte hota människors hälsa eller den biologiska mångfalden. Halterna av naturfrämmande ämnen är nära noll och deras påverkan på människors hälsa och ekosystemen är försumbar. Halterna av naturligt förekommande ämnen är nära bakgrundsnivåerna.”

Sverige har också en lång tradition av att både identifiera tidigare okända kemikalier och att övervaka redan kända och prioriterade kemikalier i miljön. Den svenska miljöövervakningen startade 1978 och omfattar många aktörer på olika nivåer, såsom statliga myndigheter, kommuner och verksamhetsutövare med flera, och styrs av flera olika lagstiftningar på såväl nationell som EU-nivå.

Även nationellt finns föreskrifter med liknande syfte som ovan nämnda EU-direktiv, till exempel Naturvårdsverkets föreskrifter om rening och kontroll av utsläpp av avloppsvatten från tätbebyggelse (NFS 2016:6). Här finns dock endast krav på att studera förekomst av vissa kemiska ämnen, såsom halt av kväve och fosfor.

2.3 Behovet av avancerad avloppsrening

Kraven på punktkällor, som till exempel industriella verksamheter, avfallsanläggningar och kraftvärmeverk, har under de senare decennierna lett till förbättrad rening och minskade utsläpp till såväl luft som vatten. Emellertid har kraven på kontroll och åtgärder för att hantera utsläpp från kommunala avloppsreningsverk inte hängt med i samhällsutvecklingen. De krav som finns är med några få undantag än idag främst designade för att hantera utsläpp av kväve och fosfor. Detta trots att vi idag vet att de kommunala avloppsreningsverken utgör en central punktkälla som integrerar många olika former av utsläpp från såväl privata som industriella aktiviteter och verksamheter i samhället.

I Sverige och i många andra industrialiserade länder diskuteras därför behovet av att införa nya och mer avancerade reningstekniker på kommunala reningsverk, som utöver kväve och fosfor också ska kunna avlägsna de kemikalier som återfinns i avloppsvattnet, inte minst läkemedelsrester. En effektiv avloppsrening, som har förmågan att avlägsna en betydande del av de kemikalier som annars kan nå och förorena våra ekosystem, är på många sätt en önskvärd strategi. Detta behövs för att samhället ska kunna efterleva den lagstiftning som finns på området och i förlängningen minimera riskerna med kemikalier i miljön och nå de högt ställda miljömålen.

Finns det då några risker eller avigsidor med aktuella avancerade reningstekniker? En baksida är att ett storskaligt införande av avancerade reningstekniker medför en stor kostnad, som slutligen hamnar på vattenkonsumenterna. Kostnadsökningen för den avancerade reningen kan beräknas till motsvarande 10–15 procent av dagens taxa för vatten och avlopp (VA). Införande av avancerad rening kan också medföra negativ miljöpåverkan i form av uppkomst av skadliga biprodukter och

ökat material- och energiförbrukning. Det är således centralt att nyttan med ny avloppsreningsteknik väger upp kostnaden och negativ miljöpåverkan.

Parallellt kan det ibland vara mer kostnadseffektivt att jobba med olika alternativa åtgärder för att få ner antalet och halten av kemiska föroreningar som når svenska avloppsreningsverk, till exempel genom hårdare reglering av produktion, import och användning av kemikalier.

För att överhuvudtaget kunna fatta beslut om investeringar av nya och mer avancerade reningstekniker är det nödvändigt att först ta reda på om utsläpp av kemikalier från svenska avloppsreningsverk är ett reellt problem i de vattendrag, sjöar mm som det renade avloppsvattnet rinner ut i (recipienterna). Dessutom måste man undersöka i vilken utsträckning som olika typer av avancerad rening kan minska detta problem. Med andra ord, är dagens utsläpp ett reellt problem och hur mycket kan detta problem minskas med avancerad rening?

För att kunna göra en vetenskapligt välgrundad bedömning och svara på den frågan krävs det att det finns ett tillräckligt stort antal vetenskapliga artiklar som har studerat tillståndet för organismer som lever i svenska vatten där kommunalt avloppsvatten släpps ut. Eller att det finns laboratorieförsök med relevanta testorganismer som exponerats för både renat kommunalt avloppsvatten och rent vatten eller avloppsvatten med avancerad rening som tillägg.

För att kunna besvara dessa frågor med stöd av vetenskapliga resultat krävs följande:

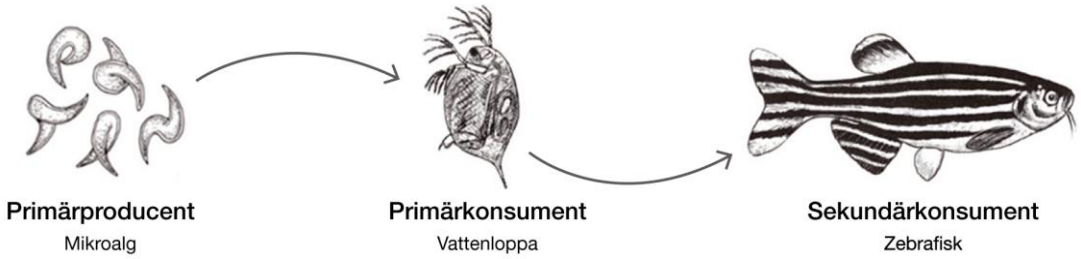
1. Det finns flera av varandra oberoende resultat, helst framtagna av olika forskargrupper.
2. Resultaten kommer från olika typer av kontexter, till exempel från flera olika ställen i Sverige där de lokala villkoren skiljer sig åt till exempel vad gäller innehållet i inkommande avloppsvatten och mottagande recipienter.
3. Mätmetoderna är tillförlitliga med avseende på den aktuella forskningsfrågan.
4. Studieuppläggen har en lämplig forskningsdesign med avseende på frågeställningen och har en minimerad risk för uppkomst av statistisk bias (snedvridna resultat).
5. Rapportering av resultaten är tillräckligt utförlig och detaljerad för att en kritisk granskning ska vara möjlig samt för att relevanta sammanvägningar ska vara möjliga att utföra.

2.4 Påverkan på vattenlevande organismer

Kemikalierelaterad miljöövervakning hanteras främst genom kemisk analys av enskilda prioriterade ämnen, men även kemiska ämnen som eventuellt kan utgöra ett hot mot miljön kan ingå i screeningprogram. I miljöövervakningsprogrammet Kust och Hav studeras dessutom hälsostatusen hos vissa vattenlevande organismer såsom fisk och kräftdjur som lever i denna miljö.

Sverige började redan på 1970- och 1980-talet med att använda ekotoxikologiska tester med vattenlevande organismer för att karaktärisera komplexa industriella avloppsvatten [42]. Denna metodik används för samma ändamål även idag. Dock saknas det lagstiftning som kräver ekotoxikologisk testning av såväl kommunala som industriella avloppsvatten. Sådana lagar saknas även för de vatten som det renade avloppsvattnet flödar ut i (recipienterna). Krav kan emellertid ställas i specifika fall i miljöärenden som hanteras genom miljöbalken.

Inom regulatorisk riskbedömning där det finns krav på att studera effekter på vattenlevande organismer följer man principen att använda organismer från tre olika trofinivåer (födonivåer) i en tänkt näringskedja. Vanligtvis används en mikroalg som representant för primärproducenter, ett kräftdjur som primärkonsument och en fiskart som sekundärkonsument, se figur 1.



Figur 1. Vanligt använda testorganismer som representerar olika trofinivåer i en näringskedja.
Illustration: Bengt-Erik Bengtsson.

Kring dessa trofinivåer har olika internationella standardiseringsorgan (till exempel OECD, ISO) tagit fram en rad standardiserade testmetoder för att bedöma giftigheten av industriella eller kommunala avloppsvatten. Bedömningarna gäller såväl enskilda kemiska ämnen som kombinationer av flera ämnen (komplexa föroreningscocktails).

Traditionellt har dessa tester fokuserat på dödliga effekter och korta exponeringstider, så kallade akuta tester. Det finns dock även tester med längre exponeringstider, så kallade kroniska tester (ca 10 procent av livslängden), som syftar till att studera till exempel tillväxt- och reproduktionsstörningar hos kräftdjur och fisk.

För mikroalger studeras nästan uteslutande effekter på populationstillväxt och exponeringstiden är i normalfallet två till tre dagar. Eftersom generationstiden för de flesta fiskarter är mycket lång och det är alltför dyrt att genomföra kroniska tester, har en rad testmetoder utvecklats som fokuserar på valda delar i fiskens livscykel, till exempel tidiga livsstadier och reproduktionsstadiet. Det ligger i sakens natur att ju längre exponeringstider, desto dyrare och – inte sällan – mer komplexa blir de ekotoxikologiska testerna att genomföra.

Fiskar spelar en viktig roll i riskbedömningar av kemikalier eftersom de utgör en central del av de akvatiska ekosystemen. Fiskar är också en viktig matkälla för oss människor och sportfiske är en

omfattande fritidsaktivitet i Sverige. Fiskar är dessutom särskilt relevanta testorganismer för att fånga upp möjliga effekter av läkemedel som i de allra flesta fall är avsedda att påverka människor.

Fiskar är, liksom vi människor, ryggradsdjur och delar i mycket större utsträckning än exempelvis alger och vattenloppor de målmolekyler (till exempel receptorer, enzymer) som vi vet att läkemedlen kan interagera med [24]. Om man inte utför tester på fisk, fångas inte de specifika subletala (skadliga men inte direkt dödliga) effekter upp som många läkemedel kan förväntas ha, vilket riskerar att miljörisker med många läkemedel missas.

Samtidigt finns det ett särskilt djuretiskt perspektiv att ta hänsyn till för fisk, eftersom det inom EU finns en generell ansats att undvika onödig användning av djurförsök. Som en följd av detta har testmetoder där man studerar effekter i fiskembryon utvecklats under senare decennier då de embryonala stadierna inte har samma lagkrav som juvenila och fullt utvecklade fiskar.

Effekter som studeras i ekotoxikologiska tester är exempelvis inverkan på genuttryck och proteiner, beteendeförändringar, morfologiska förändringar, reproduktionsförmåga och dödlighet.

2.5 Mätmetoder och testning

Effekter på vattenlevande organismer studeras främst i kontrollerade försök i laborativ miljö. I dessa studier är syftet i normalfallet att ta fram effektkoncentrationer (LC/EC50, NOEC/LOEC) för enskilda kemiska ämnen, vilka används antingen för proaktiva riskbedömningar inom till exempel REACH eller för att ta fram gränsvärden för prioriterade ämnen inom Ramdirektivet för vatten (så kallade EQS-värden, Environmental Quality Standards).

Även inom forskningen används standardiserade testmetoder för att studera ekotoxikologiska effekter av olika kemikalier eller kemikalieblandningar. Utifrån sina unika frågeställningar väljer dock ofta forskare att utveckla egna metoder eller att modifiera standardtesterna så att de anpassas till frågorna som ska besvaras. Detta kan vara ett problem om ambitionen är att väga samman resultat från olika studier.

Inom den ekotoxikologiska forskningen finns det i många fall ett intresse av att förstå de toxikologiska mekanismerna bakom effekter som observeras på exempelvis tillväxt och reproduktion. I den vetenskapliga litteraturen finns därför en uppsjö av exempel på forskningsstudier där olika genetiska, biokemiska eller molekylära metoder har använts som komplement till de mer traditionella testvariablerna som studeras i de standardiserade testerna.

Under senare år, inte minst för att svara upp mot behovet av att identifiera hormonstörande effekter av kemikalier, har också vissa standardiserade testmetoder inom OECD vidareutvecklats. Dessa inkluderar numera även förslag på hur biokemiska och molekylära metoder kan utföras som komplement till den mer traditionella testningen.

All ekotoxikologisk testning på laboratorier är förknippad med olika former av osäkerheter. Dessa osäkerheter kan bero på hur tillförlitligt ett specifikt test är och hur väl det genomförs. Det kan också bero på hur relevant ett test är för det objekt (art, population eller ekosystem) man i förlängningen vill skydda i en riskbedömning [29]. De osäkerheter som är kopplade till tillförlitlighet har framförallt att göra med experimentell design, vilket påverkar den statistiska

bedömningen i databearbetningsfasen, men har också med det praktiska utförandet av experimenten att göra.

Standardisering av testmetoder har delvis som syfte att minimera dessa osäkerheter. Detta ska dock inte tolkas som att icke-standardiserade tester och försök som utvecklats av forskare och som används i vetenskapliga studier per automatik är otillförlitliga. Sådana tester kan vara väl så tillförlitliga och relevanta men har av naturliga skäl inte validerats utifrån de processer och krav som ställs av respektive standardiseringsorgan.

De osäkerheter som är kopplade till relevans har mer att göra med vilken typ av data som används i en riskbedömning. Exempel på låg relevans kan vara att data för endast en av de tre trofinivåerna finns vid en riskbedömning. Eller att endast akuta data (dödliga effekter och korta exponeringstider) finns, medan kroniska data saknas. Ytterligare ett exempel på minskad relevans är att ta in ett djur eller en alg på laboratorium jämfört med att studera organismerna i dess naturliga miljö.

De organismer som används i den ekotoxikologiska testningen ska också representera ett komplext ekosystem med olika arter med olika roller, levnadssätt och känslighet för kemikalier och andra vattenparametrar (till exempel pH och temperatur). Att utse och använda endast några få representanter för ett komplext ekosystem gör också att det skapas en osäkerhet kring huruvida den mest känsliga arten i det tänkta ekosystem som ska skyddas verkligen har studerats. I ett ekosystem interagerar dessutom olika arter med varandra, vilket naturligtvis kan påverka känsligheten för en enskild art.

Ibland används så kallade mesokosm-försök, som är ett ekosystem i miniatyr där flera arter introducerats, under mer kontrollerade former på laboratorier för att studera effekter av kemikalier. Det finns dock inga standardiserade testmetoder med mesokosmer och det finns ingen lagstiftning som kräver att sådana system ska användas för att studera effekter av kemikalier.

För att hantera osäkerheter kopplade till både tillförlitlighet och relevans använder man i regulatorisk riskbedömning normalt sett olika former av extrapolerings- eller osäkerhetsfaktorer (riskbedömningen blir mer konservativa genom att olika faktorer multipliceras till riskkvoten, som därmed blir större). Idag diskuteras också behovet av att införa en extra osäkerhetsfaktor i riskbedömningar av enskilda kemikalier, för att ta hänsyn till den komplexa kemikalieblandning som råder i miljön och risken för att kombinationseffekter med andra kemikalier kan uppstå [57].

Även om de flesta tester är utvecklade för att studera den exponering som sker direkt från vattenmassan så finns det även testmetoder som studerar exponering av toxiska substanser som finns i sediment. Generellt sett är det svårare och mer komplext att utföra denna typ av tester jämfört med direkt exponering i vatten, varför användandet av sedimenttester inte alls är lika vanligt förekommande som tester med vattenexponering.

2.6 Forskning om svenskt avloppsvatten

Ett flertal forskningsprogram och forskningsprojekt har studerat hur svenskt kommunalt avloppsvatten påverkat olika vattenlevande organismer. Dessa organismer har studerats på olika biologiska organisatoriska nivåer, alltifrån gener, celler, vävnader till individer. I vissa av dessa program har man även studerat effekter på vattenlevande organismer som placerats i burar

uppströms- och nedströms utlopp av avloppsvatten men också på individer eller populationer som lever i dessa miljöer. Ett viktigt exempel på program som bör nämnas är MistraPharma (https://www.mistrapharma.se/).

Fördelen med att studera effekter på mer komplexa kemikalieblandningar som till exempel avloppsvatten är att effekter av alla förekommande kemiska ämnen fångas upp. Det kan vara effekter från naturliga ämnen, syntetiska kemikalier (varav vissa kan vara okända), transformationsprodukter, och kombinationseffekter av den blandning av kemiska ämnen som finns.

En utmaning i denna typ av studier är att ta reda på vilken eller vilka kemikalier som ligger bakom de effekter som observeras. Det finns flera olika strategier för att systematiskt härleda vilka kemikalier som orsakar effekterna [42]: man kan exempelvis dela upp sin komplexa blandningar av föroreningar i olika fraktioner och testa i vilken/vilka fraktion(er) som effekterna uppstår, varpå kemisk analys av en mindre komplex blandning tar vid. Dessa strategier är dock ofta mycket tidsödande och kostsamma eftersom de kräver en iterativ användning av både kemisk analys och någon form av ekotoxikologisk testning.

Flera typer av studieupplägg har använts i forskningsprogrammen och forskningsprojekten:

1. Laboratoriestudier där exponeringen sker i olika behållare som till exempel akvarier. I dessa studier exponeras de vattenlevande organismerna för avloppsvatten som renats i olika steg, med olika reningsmetoder och olika kombinationer av reningsmetoder. Syftet här är att undersöka hur de vattenlevande organismerna påverkas av den kombination av olika kemikalier i avloppsvattnet som inte renats bort i de testade reningsmetoderna. Fördelen med denna design är att exponeringen för avloppsvatten är kontrollerad. Samtidigt är relevansen ofta lägre än i fältförsök.

2. Fältexperiment där exponeringen sker på olika avstånd från utloppet av det renade avloppsvattnet såväl uppströms som nedströms. Vanligtvis finns de vattenlevande organismerna i utplacerade burar men kan också samlas in på plats, till exempel bottenlevande organismer som inte förflyttar sig särskilt snabbt eller långt. Vid studier av till exempel fisk som kan förflytta sig snabbt är exponeringshistoriken betydligt mer osäker. Syftet med denna försöksdesign är att undersöka hur organismerna påverkats av de olika exponeringsalternativen: (a) uppströms där det naturligt förekommande vattnet inte innehåller renat avloppsvatten samt (b) nedströms där det renade avloppsvattnet blandats ut med det naturligt förekommande vattnet. Ju längre nedströms, desto mindre exponering för kemikalier i avloppsvattnet förväntas, dels p.g.a. högre utspädning, dels p.g.a. andra processer som minskar koncentrationen av kemikalier i vattnet (till exempel nedbrytning, adsorption etc.). I vissa fall är utloppet inte i ett rinnande vattendrag utan en sjö eller i havet, vilket komplicerar exponeringsbedömningen.

2.7 Reningsteknik

De kommunala reningsverken har utvecklats successivt sedan slutet av 1800-talet. Drivkraften har varit nya vetenskapliga slutsatser om påverkan på människors hälsa eller påverkan på mottagande vattendrag för det renade avloppsvattnet. Nya reningssteg har etappvis byggts till för att avlägsna allt fler grupper av föroreningar som började med grovt material och partiklar (mekanisk rening), följt av organiskt material (biologisk rening), fosfor (kemisk rening) och senast kväve (utökad biologisk rening), se figur 2.

Figur 2. Konventionell reningsmetod av avloppsvatten på typiskt svenskt kommunalt reningsverk.

Nu står reningsverken inför införandet av avancerad rening av mikroföroreningar, som till exempel läkemedelsrester.

2.7.1 Mekanisk rening

Avloppsvattnet som flödar in till reningsverken renas först mekaniskt med hjälp av galler eller silar, sandfång och försedimenteringsbassänger. Utan den mekaniska reningen skulle föremål och partiklar följa med i avloppsvattnet in i reningsverket och orsaka slitage, proppar och andra driftproblem. Detta skulle i sin tur försämra den efterföljande biologiska och kemiska reningen.

I vissa fall integreras kemisk rening med den mekaniska reningen. Framför allt är det fosforföreningar som fälls ut ur avloppsvattnet med denna metod men även avskiljning av lösligt och partikulärt organiskt och oorganiskt material ökar vid kemisk rening. Den totala uppehållstiden i en förbehandling med en kombination av kemisk och mekanisk rening ligger runt 2–4 timmar. Efter denna förbehandling leds vattnet vidare till den biologiska reningen.

2.7.2 Biologisk rening

I den biologiska reningen finns mikroorganismer, framför allt bakterier, som bryter ned det organiska materialet. Bakterierna är framselekterade i reningsverket och bildar antingen slamflockar (slammassa) som hålls svävande i avloppsvattnet i en så kallad aktivslamprocess eller så bildar bakterierna en biofilm på ett bärarmaterial som placerats i reningsbassängerna.

Bakterierna bryter ned delar av det organiska materialet, varvid koldioxid, vatten och närings- och spårämnen frigörs. Samtidigt byggs en ny biomassa upp i form av slam. Efter passage av en aktivslambassäng följer slammet med avloppsvattnet för att avskiljas genom att det sjunker till botten i en sedimenteringsbassäng. En stor del (99 procent) av det sedimenterade slammet pumpas tillbaka till inloppet av den biologiska reningen där det blandas med nytt avloppsvatten. Detta kallas slamrecirkulation.

I de fall där en biofilm av bakterier används på bärare skavs ett visst överskott av biofilmen kontinuerligt av och följer med avloppsvattnet för att separeras i ett senare reningssteg.

2.7.3 Kemisk rening

I det kemiska reningssteget avskiljs fosfor från avloppsvattnet. Genom att tillsätta aluminium- eller järnsalt så fälls fosfor ut till ett svårlösligt metallfosfat i avloppsvattnet. Samtidigt med bildningen av metallfosfat fälls metallhydroxid ut och bildar geléartade flockar i form av slam. Flockarna binder de utfällda metallfosfaterna samt andra lösta ämnen som finns i vattnet. Det innebär att inte bara löst fosfor utan även organiskt bunden fosfor och en del lösligt material avskiljs vid kemisk fällning.

2.7.4 Utökad biologisk rening

Under 1980-talet uppmärksammades döda havsbottnar längs Sveriges kuster vilket hänfördes till utsläpp av kväve från jordbruk, energi- och transportsektorn samt reningsverk. Krav på kväverening infördes under 1990-talet för kustnära eller kustpåverkande reningsverk större än 10 000 person(ekvivalent)er, längs Sveriges kust, från norska gränsen upp till Norrtälje.

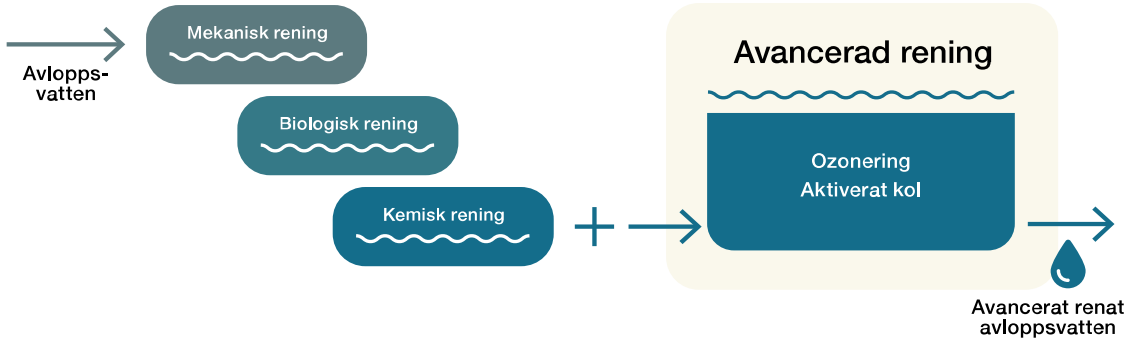
De införda kraven på kväverening uppnåddes genom att utöka volymen i de biologiska reningsstegen med två till fyra gånger. Uppehållstiden för det aktiva slammet, den så kallade slamåldern, kunde då förlängas för att möjliggöra kvävereningen. Senare studier har visat att den utökade biologiska kvävereningen kan förbättra avskiljning av exempelvis läkemedelsrester med upp till 20 procent, jämfört med reningsverk utan biologisk kvävereduktion [67].

Ett annat sätt att utöka den biologiska reningen är att införa ett andra biosteg med bärare för biofilm. Forskning visar att vissa läkemedelssubstanser kan oxideras eller avskiljas helt över ett andra biofilmsteg [22, 68], men den genomsnittliga avskiljningen av exempelvis läkemedelsrester i reningsverket ökar bara från 50 till 60 procent, vilket gör det andra biosteget mindre intressant jämfört med bredare avancerade reningsmetoder såsom ozonering och aktiverat kol.

2.7.5 Avancerad rening

Diskussionen om införandet av avancerad rening av avloppsvatten startade som en följd av att forskare runt om i världen under 1990-talet började upptäcka hormonstörande effekter i vilda djur, till exempel feminisering av fiskar. Detta kunde kopplas till utsläpp av både industriella kemikalier och läkemedelsrester som helt eller delvis passerat de traditionella reningsstegen och nått sjöar och vattendrag.

Den avancerade reningen läggs i slutet av reningsprocessen då innehållet av partiklar och organiskt material är lågt efter de föregående reningsstegen. Partiklar och organiskt material kan annars sätta igen, minska effektiviteten eller öka resursanvändningen i reningssteget med avancerad rening, se figur 3.



Figur 3. Tillägg av avancerad rening, exempelvis ozonering eller aktiverat kol, efter konventionell rening.

En rad olika tekniker är teoretiskt tänkbara för att bryta ned eller avskilja läkemedelsrester och andra organiska mikroföroreningar. Metoder med ozonering och/eller aktiverat kol har i flera studier i dagsläget utkristalliserats som huvudkandidater för tillämpbar avancerad rening [15, 17, 66]. Dessa metoder fungerar brett på många substanser och betraktas som generella metoder för att avskilja eller bryta ner organiska ämnen.

Även biofilmsystem med bakterier på rörliga bärare, som MBBR (moving bed biofilm reactor), kan oxidera (bryta ned) vissa mikroföroreningar. Detta system kan dock bara bryta ned ett fåtal substanser, som till exempel kontrastmedel som används inom hälso- och sjukvården, som ozonering har begränsad effekt på [27].

Särskilt anpassade/designade våtmarker (behandlingsvåtmark) är ytterligare ett behandlingsalternativ som tillägg till befintliga reningsverk. Denna metod har under de senaste tio åren förts fram som en tänkbar och kostnadseffektiv reningsteknik för att avlägsna läkemedelsrester och andra kemiska ämnen från avloppsvatten. Avskiljningen av läkemedelsrester är dock begränsad och varierar mycket mellan ämnen och årstid. Ämnen som inte bryts ned i behandlingsvåtmarken kan möjligtvis också spridas vidare i djur och natur.

De olika reningsmetoderna har även testats i olika kombinationer. Ny tekniker och metoder utvecklas hela tiden, i framtiden kan andra metoder vara mer aktuella än de vi diskuterat här.

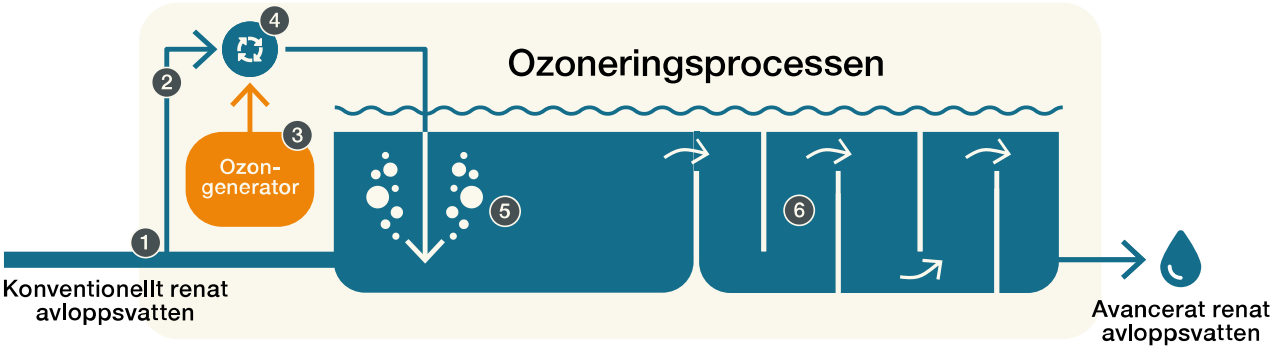
Ozonering

Ozon är en mycket giftig och reaktiv gas, med blå färg och intensiv lukt. Ozon reagerar med ämnen genom oxidation vilket innebär att substanserna bryts ned och tappar sin funktion. Ozon i tillräcklig mängd och under rätt processförhållanden kan helt eller delvis oxidera många organiska föreningar så att de tappar sin avsedda biologiska effekt.

Så här kan processen exempelvis fungera med ozontillsats till avloppsvatten, se figur 4.

1. Avloppsvattnet kommer in i reaktortanken genom ett rör från den biologiska reningen.
2. En del av avloppsvattnet avleds i en sidoström för att blandas med ozongas.
3. I ozongeneratorn omvandlas syrgas till ozon. Ozonet leds sedan till en injektor.
4. I injektorn blandas ozongasen med sidoströmmen så att ozonet enkelt kan fördelas i avloppsvattnet.

5. Sidoströmmen återförs till det stora vattenflödet genom en lans som sprider ozonet i vattnet.
6. Vattnet får flöda upp och ner genom reaktortanken för att ge ozonet tid att reagera med substanser och förbrukas helt, innan vattnet slutligen går vidare till nästa reningssteg.



Figur 4. Ozoneringsprocess

Man strävar efter att ha ett så lågt ozonöverskott som möjligt i avloppsvattnet, för att på så sätt spara resurser, kostnader och minska mängden restozon i luft och avloppsvatten.

Efter ozonering passerar avloppsvattnet ett sandfilter med bakterier, där de biologiskt nedbrytbara produkter som bildats vid ozoneringen bryts ned. Ozoneringen bryter ned flera olika typer av kemiska bindningar bland annat de särskilt förorenade ämnena i föreskriften HVMFS 2019:25. Undantag är många PFAS-ämnen (högfluorerade ämnen) och mikroplaster, för vilka ozonets verkan är begränsad. Ozonering kan ha en desinficerande effekt och ibland anförs ozonering ha en positiv effekt på att reducera mängden bakterier, även av dem med antibiotikaresistens.

Vid ozonering finns en risk för bromatbildning om bromid finns i vattnet. I Sverige gäller det speciellt vid kustnära avloppsreningsverk där bromidinnehållande havsvatten riskerar att rinna in i ledningsnäten.

Oron att det vid ozonering skapas farliga biprodukter – transformationsprodukter – är den vanligaste invändningen mot ozonering. Stabila metaboliter (biologiska nedbrytningsprodukter) och transformationsprodukter från ozoneringen kan vara många och kan bildas i höga halter. I uppföljningen av den avancerade reningen är det nästan uteslutande modersubstanserna som analyseras.

Kemisk analys av alla tänkbara biprodukter efter ozonering är i det närmaste ogörlig och därför har den kemiska analysen av framför allt läkemedelssubstanser kompletteras med ekotoxikologiska tester där olika vattenlevande organismer exponeras för olika typer av avancerat renat avloppsvatten.

Aktiverat kol

Aktiverat kol har en stor förmåga att binda till sig organiska molekyler. Denna bindningsprocess kallas adsorption och är en utbredd och allmän använd teknik för att avskilja organiska ämnen från vätskor och gaser.

Två huvudformer av aktiverat kol används i avloppsvattenbehandling: pulveriserat aktiverat kol (PAC) och granulerat aktiverat kol (GAC). GAC har en större partikeldiameter än PAC och kan därför binda mer organiskt material. Dock binder exempelvis läkemedelsrester bättre och stabilare till PAC än GAC, då partikelstorleken är mindre vilket medför en ökad interaktion mellan PAC och föroreningarna.

Behandling med GAC utförs normalt i filterbäddar, i mindre avloppsreningsverk ofta med två filter i serie och i större anläggningar med flera filter parallellt. PAC däremot doseras till avloppsvattnet och det görs antingen i ett befintligt reningssteg, vanligen i det biologiska reningssteget, eller i ett kompletterande reningssteg.

Under reningen av avloppsvattnet förbrukas det aktiverade kolet och det måste antingen regenereras för återanvändning eller energiåtervinnas genom förbränning. PAC kan endast användas en gång och måste därefter förbrännas medan GAC kan regenereras upp till fem gånger. Efter varje regenerering behöver 5–10 procent nytt kol fyllas på för att täcka förlusterna vid regenereringen.

För att bättre utnyttja tillsatt PAC recirkuleras det separerade PAC-slammet tillbaka till kontakttankarna där ytterligare föroreningar kan adsorberas. Det förbrukade och separerade PAC-slammet pumpas till slamhanteringen för senare separat förbränning. PAC-slammet återvinns eller reaktiveras inte på grund av hanterings- och behandlingssvårigheter. I Sverige är det vanligt att avloppsslam används som gödsel på åkrar. Detta innebär att PAC måste användas i ett separat reningssteg för att förhindra att PAC-slammet hamnar i det ordinarie slammet som sprids på åkrar.

Forskning och utveckling pågår för att om möjligt regenerera GAC på plats på reningsverken för att på så sätt minska resursanvändningen för bland annat transporter. Ett annat sätt att minska konsumtionen av GAC är att låta filtren vara i drift längre än vad den kemiska absorptionskapaciteten egentligen stipulerar. Med tiden sker i GAC-filtren en påväxt av bakterier som har potential att bryta ned vissa mikroföroreningar.

Behandlingsvåtmarker

Behandlingsvåtmarker finns idag på flera platser i landet och efterbehandlar avloppsvatten från avloppsreningsverk och ökar reduktionen av framför allt kväve och fosfor men även andra organiska föreningar.

Dessa anlagda behandlingsvåtmarker utgörs av dammar och översilningsytor och flera olika mekanismer och egenskaper bidrar till att rena avloppsvattnet. Den biologiska nedbrytningen är den viktigaste mekanismen men även växterna i behandlingsvåtmarkerna är viktiga för nedbrytningen eftersom de utgör viktiga kontaktytor mellan kemiska ämnen och mikroorganismer.

Kemiska ämnen kan också avskiljas från avloppsvattnet via fastbindning till partiklar och andra ytor (sorption) och sedimentation. Allt fler vetenskapliga studier visar att behandlingsvåtmarker inte bara minskar halten av kväve och fosfor i det behandlade avloppsvattnet, utan även många kemiska ämnen, så som läkemedelsrester, nanopartiklar och metaller [12, 51].

Även om behandlingsvåtmarker inte bedöms vara en lika effektiv metod som till exempel ozonering och aktiverat kol för att rena bort kemiska ämnen som exempelvis läkemedelsrester, så

kan dessa vara ett tillräckligt bra alternativ för platser där avancerad rening inte är en kostnadseffektiv lösning. I två svenska studier har exempelvis reningseffektiviteten avseende läkemedelsrester studerats såväl vinter- som sommartid i behandlingsvåtmarkerna i Eskilstuna, Oxelösund, Trosa och Nynäshamn [12, 51]. Sammantaget visade studierna att reningskapaciteten var avsevärt bättre sommartid jämfört med vintertid.

Dock finns det en risk för att ämnen som inte bryts ned i behandlingsvåtmarken sprids vidare i djur och natur. Till skillnad från de andra avancerade reningsmetoderna där de oönskade ämnena bryts ned i processer på själva reningsverket.

2.8 Avancerad rening i Sverige

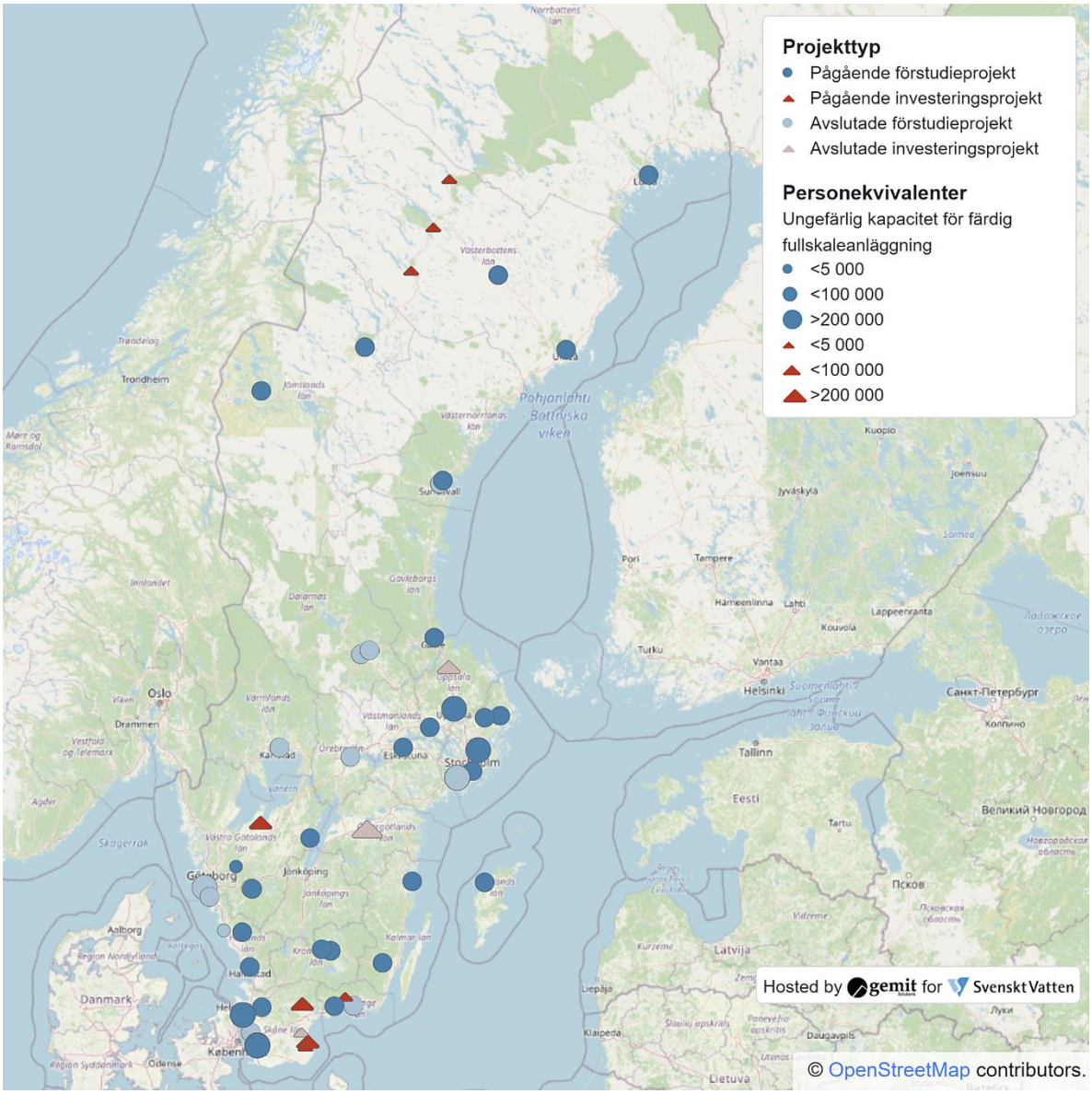
Naturvårdsverket har under 2000-talet genomfört två regeringsuppdrag om läkemedelsrester och andra mikroföroreningar [43, 67]. Slutsatserna i dessa uppdrag var att det fanns ett behov av att införa avancerad rening på reningsverk utifrån försiktighetsprincipen och att dagens reningsverk inte är konstruerade för att bryta ned läkemedelsresterna och andra farliga ämnen.

Stockholm Vatten AB drev ett av de första stora projekten kring läkemedel i miljön i Sverige 2005-2010 [68]. Formas och Vetenskapsrådet (VR) har stöttat forskning på området vid svenska universitet genom en rad projekt. Det enskilt största svenska forskningsprojektet inom området - MistraPharma, som finansierades av Mistra - drevs under åren 2008-2015, där även pilotstudier av avancerad reningsteknik utfördes [53].

Sedan 2014 har den svenska regeringen via Miljödepartementet och i förlängningen Havs- och vattenmyndigheten samt Naturvårdsverket satsat och administrerat delfinansiering av ett antal förstudie- och investeringsprojekt rörande avancerad avloppsrening runt om i Sverige [16, 44, 52]. Svenska erfarenheter av avancerad rening av mikroföroreningar i kommunalt avloppsvatten börjar således bli alltmer omfattande.

Framför allt har rening av läkemedelsrester studerats i laboratorier och i pilotskala, men sedan ett par år, även i fullskala i reningsverk. Studierna innehåller begränsad uppföljning av andra ämnen än läkemedelsrester, främst på grund av kostnads- och tidsskäl, då analyserna av läkemedelsrester är arbetsintensiva och därmed kostsamma.

I dagsläget, år 2021, har över 40 förstudier av avancerad rening på svenska reningsverk genomförts. Förstudierna följer upp förekomsten av läkemedelsrester i avloppsvattnet och utvärderar lämpliga reningsmetoder teoretiskt och i vissa fall även praktiskt med laboratorieförsök eller pilotförsök på respektive reningsverk, se figur 5.



Figur 5. Avslutade och pågående projekt läkemedelsrening.

Den första svenska fullskaleanläggningen med avancerad rening av kommunalt avloppsvatten uppfördes i Knivsta [69] där allt konventionellt renat avloppsvatten ozonbehandlades mellan augusti 2015 och februari 2016, men på grund av bristande finansiering blev anläggningen inte permanent.

Den första permanenta anläggningen med avancerad rening, Nykvarns reningsverk i Linköping, togs i drift 2018. Totalt är idag (år 2021) tio svenska fullskaleanläggningar med avancerad rening under design, uppbyggnad, i drifttagning eller i drift. I sex av dessa tio reningsverk har avancerad rening redan tagits i drift: Linköping, Simrishamn (Stengården), Simrishamn (Kivik), Tierp, Kristianstad (Degeberga) och Bräkne-Hoby, se tabell 1.

Tabell 1. Svenska reningsverk med planerade eller färdigbyggda reningssteg med avancerad rening.

Aktiverat kol	Ozonering	Ozonering och aktiverat kol
Kristianstad (Degeberga) 2 000 pe	Linköping (Nykvarn) 149 700 pe	Simrishamn (Stengården) 23 500 pe
Simrishamn (Kivik) 7 500 pe		Tierp (44 % till avancerad rening) 6 600 pe
Simrishamn (St Olof) 1 000 pe		Ronneby (Bräkne-Hoby) 3 500 pe
		Vilhelmina
		Storuman
		Sorsele – process ej vald än

Storleken för den avancerade reningen uttrycks som belastning av personekvivalenter (pe).

2.9 Ungefärliga kostnader för införande av avancerad rening

De nya avancerade reningsstegen kräver investeringar i bassänger, utrustning, lokaler mm. Dessutom ökar driftkostnaden på reningsverket för elenergi, kemikalier, personal och andra resurser. Investerings- och driftkostnaderna för den avancerade reningen beror i stor utsträckning på anläggningens storlek men också geografiska placering. Totalkostnaden kan till exempel vara tre till fyra gånger högre per behandlad volym i ett avloppsreningsverk för 2 000 personer än för ett reningsverk med 100 000 personer.

Även reningsgraden som skall uppnås av den avancerade reningen påverkar kostnaden. Hittills har en branschstandard med målet att uppnå 80 procent reningsgrad utvecklats i Sverige, Schweiz och Tyskland. De flesta studier och utredningar har därför utförts med denna reningsgrad som mål. Det första större pilotprojektet i Sverige satte upp ett högre reningsgradmål på 95 procent vilket ökade de beräknade kostnaderna, speciellt för aktiverat kol [68]. Den höga reningsgraden bemöttes då av kritik från forskare och branschfolk på grund av de ökade kostnaderna och svårigheterna med att uppnå en så hög reningsgrad. Med tiden har dock nya drivkrafter och motiv vuxit fram som kan motivera en högre reningsgrad. Exempelvis undersöks möjligheterna att använda det avancerat renade vattnet inom industri och samhälle, bevattning och infiltration till grundvatten för att motverka regional vattenbrist. Förutom miljörisker kan även hälsorisker komma att påverka utformningen av den avancerade reningen och eftersträvade reningsgrad.

En första kostnadsmodell för avancerad rening togs fram till ett regeringsuppdrag 2008 [67]. Enligt denna och med uppdaterade data från fullskaledrift i bl.a. Knivsta och Simrishamn hamnar totalkostnaden på mellan 0,4–1,0 SEK/m³ i reningsverk för 100 000 personekvivalenter. Den lägre kostnaden gäller företrädesvis för ozonering och den högre för GAC [67].

Då ca 9 miljoner av Sveriges 10 miljoner invånare är anslutna till kommunala reningsverk och resterande 1 miljon invånare är anslutna till enskilda avlopp blir kostnaden för avancerad rening vid reningsverk i hela Sverige 0,9–2,3 miljarder per år, år enligt den första kostnadsmodellen, vilket motsvarar mellan 100 till 250 SEK per person och år. Årskostnaden för hela Sveriges vatten och

avloppshantering uppgår till 15 miljarder år 2008. Kostnadsökningen för att införa och driva den avancerade reningen motsvarar 6–15 procent enligt den äldsta kostnadsmodellen från 2008.

I underlaget till ett motsvarande regeringsuppdrag från 2017 [43] redovisas lägre specifika totalkostnader än tidigare för ozonering respektive GAC för anläggningar för 100 000 personekvivalenter: 0,2 respektive 0,5–0,7 SEK/m^3. Författarna uttrycker en osäkerhet i underlaget eftersom det då saknades svenska fullskaleanläggningar. Vidare är ”vissa kostnader för planering, installation och platsspecifika anläggningskostnader” inte medräknade. Dessutom är kostnader för aktiverat kol hämtade från Tyskland och Schweiz, vilka har betydligt lägre priser än Sverige [7].

Användes dessa något lägre specifika kostnader i modellen från 2017 skattas totalkostnaden för hela Sverige till mellan 0,45 och 1,6 miljarder per år, vilket motsvarar 50 och 180 SEK per person och år. Motsvarande kostnadsökning för att införa och driva den avancerade reningen uppgår då till mellan 3–11 procent.

Under 2021 gjordes en genomgång av det ekonomiska utfallet för byggda svenska fullskaleanläggningar med avancerad rening och budgetberäkningar utförda i förstudier av avancerade reningssteg vid svenska reningsverk. Dessutom gjordes en sammanställning av tillgängliga kostnadsdata från de länder i Europa som kommit längst i implementering eller utredning av avancerad rening [60].

Tillgängliga ekonomiska data från de svenska fullskaleanläggningarna är mycket begränsad, vilket förklaras med att uppföljning pågår och sammanställningar inte hunnit göras. I de svenska förstudierna återfinns betydligt fler och mer detaljerade data än från de svenska fullskaleinstallationerna, men de består av uppskattade värden, inte verkliga utfall.

Baserat på de tillgängliga data från fullskaleinstallationerna och förstudierna beräknades drift-, underhålls-, investerings- och totalkostnader för svenska anläggningar. Den genomsnittliga totalkostnaden beräknades till mellan 0,7 och 2,0 SEK/m^3 för reningsverk med en belastning av 100 000 personekvivalenter (pe). Den lägre kostnaden gäller företrädesvis ozonering och den högre för kombinationen ozonering och GAC. Enbart GAC skattas i medeltal till 1,3 SEK/m^3 för reningsverk med 100 000 pe anslutna.

Totalkostnaden för installation av avancerade rening i Sveriges samtliga 445 reningsverk, förtecknade i den svenska miljöportalen, har beräknats med tre olika modeller som tagits fram i rapporten ovan [60], samt med en fjärde modell baserad på europeiska data. Beräkningarna gjordes för varje enskilt reningsverk, med var och en av de fyra olika modellerna. Årskostnaden varierade från knappt en halv miljard (450 miljoner) till drygt två miljarder kronor per år mellan de fyra modellerna. Detta motsvarar mellan 54 till 273 SEK per person och år för den anslutna befolkningen. Om enbart svenska data används hamnar årskostnaden på mellan 0,8 och 2,3 miljarder, motsvarande 99 respektive 273 SEK per person och år. Kostnadsökningen för att införa och driva den avancerade reningen uppgår då till mellan 4–11 procent jämfört med dagens årskostnad för vatten och avloppshantering, som uppgår till drygt 20 miljarder per år [59].

Vad skulle det då sammanfattningsvis kosta att införa avancerad rening i hela Sverige? Baserat på det två ovan nämnda regeringsuppdragen och årets uppföljning av svenska fullskaleverk och utförda förstudier så beräknas kostnadsökningen ligga mellan 0,8 miljard och 2,3 miljarder kronor

per år. Detta motsvarar mellan 99 och 273 SEK per person och år. Kostnadsökningen för att införa och driva den avancerade reningen uppgår då till mellan 4 och 11 procent.

Variationen i kostnaden beror till viss del på vilken typ av rening som införs, exempelvis är ozonering billigare att införa än GAC. Dock råder det stora osäkerheter i dessa beräkningar då det finns få svenska exempel. Vidare är prisnivån ca 25 procent högre i Sverige än i Centraleuropa, där fullskaleanläggningar börjar tas i drift och fler kostnadsreferenser finns.

3 Metod

Att genomföra en systematisk översikt innebär att man identifierar, samlar in och sammanställer forskningsresultat från flera olika studier. Resultaten granskas med avseende på relevans och tillförlitlighet (evidensgranskning) och vägs samman för ett definierat beslutsproblem.

Beslutsproblemet består oftast av ett val mellan två alternativa åtgärder. Ett möjligt val kan vara att vidta en specifik åtgärd eller att låta bli att göra något. Men valet kan även avse två eller flera alternativa åtgärder.

Innan arbetet påbörjas med att genomföra en systematisk översikt skrivs en genomförandeplan. I denna plan beskrivs de moment man avser att genomföra och hur. Genomförandeplanen för denna översikt har granskats av externa experter utsedda av Stockholm Environment Institute (SEI) och är publicerad på Formas hemsida (https://www.formas.se/analys-och-resultat/rapporter/2019-06-05-hur-paverkas-vattenlevande-organismer-av-avloppsvatten.html). Genomförandeplanen har följts med undantag av att en extra evidensgraderingsnivå (nivån ganska säker) har lagts till i översikten.

Slutligen så komprimeras de sammanvägda och evidensgranskade resultaten till slutsatser. Dessa slutsatser evidensgraderas vilket innebär att vi beskriver hur säkra vi är på slutsatserna.

Även den systematiska översikten har granskats av externa experter utsedda av Stockholm Environment Institute (SEI). Ullrika Sahlin, docent på Lunds universitet, har konsulterats i vissa statiska frågor. Granskningskommentarer och hur vi har hanterat dom återfinns i bilaga I.

3.1 Frågeställning

Det är oklart hur vattenlevande organismer, som exempelvis fiskar, påverkas av den blandning av resterande substanser som avloppsvatten innehåller vid återförsel till naturen. Frågan är om konventionell rening av avloppsvatten är acceptabel med tanke på hur vattenlevande organismer skulle kunna påverkas. En annan relaterad fråga är om avancerad rening som tillägg till konventionell rening skulle kunna minska denna påverkan. Det finns därmed tre olika alternativ som vattenlevande organismer kan exponeras för:

A. Konventionellt renat avloppsvatten (mekanisk, kemisk och biologisk behandling) där syftet är att ta bort näringsämnen och patogener (sjukdomsframkallande ämnen).
B. Vatten som inte avsevärt påverkats av konventionellt renat avloppsvatten.
C. Avloppsvatten som behandlats med avancerad teknik som tillägg till konventionell rening. Syftet med avancerad rening är att ta bort vissa kemikalier (exempelvis läkemedel) som finns kvar efter konventionell rening.

Beslutsproblemet, som intressenter kan stå inför, är med andra ord om avancerad rening bör införas som tillägg till konventionell rening. Vid bedömning av effekten är två jämförelser informativa i den här forskningssamanställningen: A mot B respektive A mot C.

Den primära frågan som den systematiska översikten således utreder är om vattenlevande organismer påverkas av konventionellt renat avloppsvatten som släpps ut från reningsverken i

Sverige. Den sekundära frågan är om tillägg av avancerad rening till den konventionella reningen minskar denna påverkan.

3.2 Urvalskriterier

När man avgör om ett resultat i en studie ska ingå i översikten, går man grundligt igenom studien och bedömer om urvalskriterierna uppfylls. För att ett resultat i en studie ska inkluderas i vår översikt krävs att samtliga kriterier nedan är uppfyllda:

Populationen i studien måste vara vattenlevande organismer.

Interventionen i studien måste vara konventionellt renat avloppsvatten (mekanisk, kemisk och biologisk).

Jämförelsealternativ måste vara ett av följande två alternativ:

(a) vatten som inte avsevärt påverkats av konventionellt renat avloppsvatten.

eller

(b) avloppsvatten som behandlats med avancerad teknik som tillägg till konventionell rening.

Utfallen i studien måste avse skadliga effekter eller effekter som kan indikera skada eller påverkan på vattenlevande organism eller ekosystem. Såväl påverkan av individer som systempåverkan omfattas. Inga begränsningar avseende utfallsvariaber har gjorts, vilket innebär att alla utfallsvariabler har accepterats.

Upplägget i studien måste antingen vara

(a) laboratoriestudier där vatten från fält har använts.
(b) fältstudier där organismer (biota) har placerats ut i fält (till exempel i burar).
(c) fältstudier där prover av organismer (biota) har tagits på minst två platser i närheten av aktuellt reningsverk (exempelvis upp och nedströms, och/eller olika avstånd nedströms).

Endast resultat från studier som baserats på exponering för svenska avloppsvatten har inkluderats då denna avgränsning specifikt efterfrågades av intressenter och forskare och beslutades av rådet för evidensbaserad miljöanalys. Endast studier skrivna på svenska eller engelska ingår i underlaget. Studier som entydigt studerar effekter som kan kopplas till näringsämnen i avloppsvatten har uteslutits.

3.3 Sökning av litteratur

Ett viktigt steg i en systematisk översikt är att söka efter relevanta publicerade vetenskapliga studier där resultat redovisas. Dessa sökningar genomfördes av en informationsspecialist i samarbete med de sakkunniga i projektet.

Att identifiera sökord för alla vattenlevande organismer ansågs vara nästintill omöjligt, därför användes i stället sökord för olika typer av vatten där vattenlevande organismer förekommer (ocean, lake, river mm). Dessa sökord fångar främst in fältstudier, eftersom studier som utförs i laboratorium sällan innehåller ord som ”ocean” eller ”lake” i titel eller sammanfattning. Därför utarbetades två olika söksträngar, en söksträng för att fånga in studier utförda i fält och en annan för studier utförda med avloppsvatten i laboratorium. Den bibliografiska databasen Scopus användes när söksträngarna arbetades fram, se söksträngar i bilaga A. Söksträngarna testades mot åtta relevanta studier, så kallade ”benchmark articles”, se bilaga B.

Om någon av de relevanta studierna inte fångades in av sökningen, ändrades söksträngarna tills samtliga av de relevanta artiklarna fångades in. Sökningar genomfördes i de fem bibliografiska databaserna som listas i tabell 2. Söksträngarna anpassades till den specifika syntax som varje databas har. Sökningarna begränsades inte med avseende på publiceringsdatum eller dokumenttyp. Innan färdigställandet av den systematiska översikten genomfördes förnyad litteratursökning för att säkerställa att nyutkommen forskning inkluderades.

Tabell 2. Bibliografiska databaser

Databas	**Sökfält**	**Prenumeration och tillgång**
Scopus	Title, Abstract, Keywords	Tillgång via Formas prenumeration
Web of Science Core Collection	Topic	Formas prenumeration inkluderar: Science Citation Index Expanded; Social Sciences Citation Index; Arts & Humanities Citation Index; Conference Proceedings Citation Index- Science; Conference Proceedings Citation Index- Social Science & Humanities; Emerging Sources Citation Index
Academic Search Premier	Title, Abstract, Subject Terms, Author-Supplied Keywords	Tillgång via Formas prenumeration på EBSCOs plattform
CAB Abstracts	Title, Abstract, Heading Words	Tillgång via Formas prenumeration på Ovids plattform
ProQuest Natural Science Collection	Title, Abstract, All subjects & indexing	Formas prenumeration inkluderar: AGRICOLA; Agricultural Science database; Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts; Biological Science database; Biological Science index; Earth, atmosphere & Aquatic Science database; Environmental Science database; Environmental Science index; Meteorological & Geoastrophysical Abstracts

Sökningar har även genomförts i sökmotorn Google Scholar på svenska med nedanstående sökord, se tabell 3. Sökningen genomfördes med hjälp av datorprogrammet Publish or Perish som gör det möjligt att exportera referenser från de 1000 första träffarna i Google Scholar.

Tabell 3. Sökning i Google Scholar

Sökfält	**Sökord**
Title words:	avloppsvatten OR reningsverk OR avloppsreningsverk
Any of the words:	vattenlevande organismer recipienter recipient fisk musslor kräftor plankton alger fauna akvatisk sjö sjöar hav sötvatten flod bäck

Sökningar gjordes dessutom på relevanta webbplatser, se bilaga C. Dessa söksträngar anpassades till webbplatsens sökfunktion. Slutligen kontaktades centrala personer på myndigheter, i organisationer och i de sakkunnigas forskarnätverk för att finna ytterligare relevanta studier och rapporter.

3.4 Urval av litteratur

Sammanfattningarna i de artiklar som hittades i sökningarna granskades och bedömdes parvis av kanslipersonal på Formas. De som ingick i paret gjorde detta oberoende av varandra med hjälp av de urvalskriterier som hade fastställts av projektets sakkunniga. De två granskarna kommunicerade inte med varandra förrän bedömningen om urval gjorts klar och sedan jämfördes bedömningarna. Om båda var överens om att urvalskriterierna hade uppfyllts, så beställdes artikeln i fulltext för vidare granskning. Samma sak gällde vid oenighet, då beställdes studien också i fulltext för ny granskning. Om båda var överens om att kriterierna inte var uppfyllda, så exkluderades studien.

I nästa steg granskades fulltextstudierna och bedömdes av projektets sakkunniga. Även detta urval genomfördes på samma sätt, parvis och oberoende av varandra. Om sakkunnig var författare eller medförfattare till en given studie, ingick hon/han inte i granskningsparet. Vid oenighet om artikeln skulle ingå eller inte i översikten diskuterades den av paret eller hela projektgruppen innan beslut fattades. Exkluderingsskälen vid fulltextgranskning har dokumenterats, se bilaga E.

3.5 Dataextraktion

Information om studieupplägg, ingående jämförelsealternativ, typ av undersökta vattenlevande organismer, utfallsmått, tidsperiod, plats, medelvärde, standardavvikelse mm. hämtades från den publicerade artikeln, standardiserades och lades in i databaser, se bilaga J, av Formas kanslipersonal. Inmatningen kontrollerades av ytterligare en person på Formas och därefter av sakkunniga. När nödvändiga uppgifter saknades kontaktade vi artikelförfattare för kompletteringar.

Deskriptiv statistik var ett speciellt svårt problem i den här översikten. I de flesta fall redovisades denna statistik på ett ofullständigt sätt i de inkluderade studierna. Det var ofta oklart hur många analysenheter som beräkningarna i artikeln baserades på, exempelvis hur många fiskar som studerades. Oftast redovisades figurer utan kvantitativa data såsom medelvärde, standardavvikelse mm. Och när sådant funnits med var det oklart om exempelvis den redovisade spridningen avsåg standardavvikelsen eller standardfelet.

Problemen med den bristfälliga deskriptiva statistiken hanterades på olika sätt: (1) med hjälp av optisk läsning (WebPlotDigitizer) extraheras centralmått (medelvärde) och spridningsmått (standardavvikelse) från figurer, (2) med utgångspunkt i p-värden, standardfel och

konfidensintervall samt antal analysenheter räknades de saknade deskriptiva måtten fram, (3) artikelförfattare kontaktades för kompletterande information och förklaringar.

Extraherade data sammanställdes i databaser, se bilaga J, vilken kan uppdateras om nya resultat kommer till och revideras om felaktigheter identifierats. Resultat som är relevanta för slutsatserna i rapporten har sammanställts i tabeller och metaanalyser. Detta gjordes av Formas kanslipersonal och kontrollerades av projektets sakkunniga.

3.6 Evidensgranskning

För att granska utfallen i artiklarna och bedöma hur stor osäkerheten är använde vi en modifierad variant av granskningsformuläret IRIS (https://www.epa.gov/iris), se bilaga F, framtaget av US Environmental Protection Agency (motsvarande Naturvårdsverket i USA). Detta formulär används för att identifiera metodologiska problem, exempelvis med avseende på urval, fördelning till olika exponeringsalternativ, genomförande, mätning, beräkning och rapportering.

Projektets sakkunniga granskade utfallen i artiklarna parvis och oberoende av varandra. Om sakkunnig var författare eller medförfattare till en given studie, ingick hon/han inte i granskningsparet. Inom varje domän finns ett antal frågor som de sakkunniga besvarade med ja, nej, oklart eller ej tillämpbart. Utifrån dessa svar bedömde de sakkunniga den sammanvägda risken för domänen till bra, tillräckligt, saknas, inte rapporterat eller kritiskt bristfällig. Efter bedömning av samtliga domäner graderade de sakkunniga tillförlitligheten för varje utfall till hög, medium, låg eller icke informativ. Vid oenighet om tillförlitligheten av utfallet diskuterades studien av paret innan ett konsensusbeslut fattades. Tillförlitligheten för utfallen i artiklarna är redovisade i bilaga F. I de fall inte alla granskade utfall i artikeln fick samma gradering redovisas det avvikande specifika utfallet i en egen kolumn i bilagan.

Samtliga artiklar är inkluderade i översikten men i de fall där tillförlitligheten är bedömd som låg har känslighetsanalyser utförts. Detta innebär att metaanalyser har utförts med och utan resultatet som bedömts ha låg tillförlitlighet. Detta görs för att analysera om resultatet med låg tillförlitlighet påverkar det sammanvägda resultatet. I de fall resultat med låg tillförlitlighet endast ingått i verbala (narrativa) synteser beskrivs resultatet och att resultatet har låg tillförlitlighet.

Snedvridna resultat på grund av att resultat inte publiceras har inte bedömts då det krävs ett stort antal artiklar för att utföra en sådan analys på ett tillförlitligt sätt.

3.7 Metaanalyser

Metaanalyser görs på data från studier som utförts på ett likvärdigt sätt. Lite förenklat innebär en metaanalys att man summerar effekterna i de enskilda studierna och dividerar med antalet studier. Det man får fram är ett slags medelvärde. Det finns emellertid ytterligare en sak man gör och det är att vikta studierna mot spridningen och antalet observationer (individuella resultat) i de enskilda studierna. Ju större spridning och ju färre observationer, desto mindre väger en enskild studie när man räknar fram det sammanvägda resultatet.

Uttryckt med statistiska termer innebär en vanlig metod att de enskilda effekterna vägs samman med hjälp av den inversa variansen för varje studieresultat avseende samplingfördelningen (ett

dividerat med standarfelet i kvadrat). Det är också denna metod vi använt oss av i rapporten[1]. Vi redovisar den sammanvägda effekten i form av 95-procentiga konfidensintervall. Ett konfidensintervall på 95 procent innebär att vi är till 95 procent övertygade om att populationseffekten ligger inom intervallestimatets gränser.

I den här översikten har metaanalyser utförts på resultat med sekundärkonsumenter, fiskar, från studier utförda i laborativ miljö. Studier utförda på fiskar i fält, antigen med fältprover eller burstudier, har inte vägts samman med de laborativa studierna då exponeringskoncentrationerna inte är kända i dessa fall.

Inom de laborativa studierna finns skillnader i form av olika exponeringskoncentrationer av avloppsvatten, exponeringstid och fiskart. När olika exponeringskoncentrationer av avloppsvatten har använts i en studie så har det resultatet med den mest likvärdiga exponeringskoncentrationen som övriga studier används när sammanvägningar har gjorts. Då vi vill ha svar på om en viss rening talar för eller emot en påverkan på vattenlevande organismer bedömde vi att dessa sammanvägningar kunde genomföras på det sättet trots skillnader i exempelvis koncentration och tid för exponering.

Resultaten från primärproducenterna och primärkonsumenterna har sammanställts i tabeller och ett resonemang kring resultaten har genomförts av de sakkunniga i verbala synteser.

Metaanalyserna har utförts med programvaran Review Manager 5.4. I detta program har medelvärde, standardavvikelse och antal fiskar som ingått för varje exponering matats in. Programvaran räknar därefter ut effektstorlekar, punktestimat och konfidensintervall, för varje exponeringsjämförelse och effektstorlekarna redovisas med standardiserade medelvärdesskillnader eftersom det är skaloberoende. Uttryckt med statistiska termer så räknas den standardiserade medelvärdesskillnaden ut genom att det sammanvägda medelvärdet divideras med en poolad standardavvikelse[2].

Den parametern vi vill skatta är medelvärdet hos fiskarna efter exponering av avloppsvatten. Därför sattes n=totalt antal fiskar per exponering i metaanalyserna. Om det finns interaktionseffekter fiskar emellan inom respektive akvarium, så kan detta underminera antagandet om oberoende och identiskt fördelade stokastiska variabler. Om interaktionseffekterna har en betydelsefull storlek, så kan man antigen justera för detta inom ramen för de statistiska modeller som man använder eller minska tillförlitligheten i samband med evidensgranskning och evidensgradering. Dom sakkunniga i projektet har bedömt att interaktionseffekterna mellan fiskarna i ett akvarium är av mindre betydelse för de utfallsmått som vi analyserade i metaanalyserna, det vill säga genuttryck, proteinproduktion och enzymaktivitet. Interaktionseffekten för dessa utfallsmått bedöms därför som låg och ingen justering av n ansågs nödvändig. Författarna till de inkluderade studierna inklusive granskare på de tidskrifter som artiklarna är publicerad i har gjort samma bedömningar då medelvärde och standardavvikelse rapporterat i studierna är baserade på totalt antal fiskar.

[1] Varje enskilt resultat har vikten $w_i = 1/(se_{\bar{x}_i})^2$, den sammanvägda effekten från alla resultat är $\bar{x}_{IV} = \sum w_i \bar{x}_i / \sum w_i$ och standardfelet för den sammanvägda effekten är $se(\bar{x}_{IV}) = 1/\sqrt{\sum w_i}$. Därefter kan konfidensintervallet för den sammanvägda effekten räknas fram på konventionellt sätt.

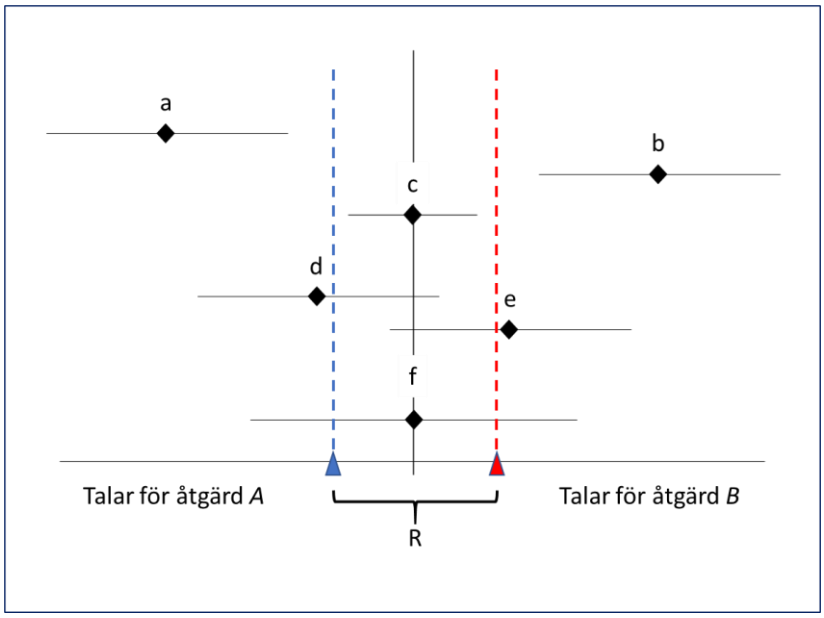
[2] Se Statistical algorithms i Review Manager

Känslighetsanalyser, det vill säga metaanalyser med och utan resultat från studier med låg tillförlitlighet enligt evidensgranskningen, utfördes för att se om det sammanvägda resultatet påverkades av resultatet klassad med låg tillförlitlighet.

Subgruppsanalyser utfördes i de fall där olika kombinationer av avancerad rening har studerats.

3.8 Olika typer av statistiska resultat

I figur 6 illustreras sex olika typer av möjliga statistiska resultat där åtgärd *A* jämförts med åtgärd *B*. De horisontella linjerna symboliserar konfidensintervall. De svarta fyrhörningarna i mitten av linjerna visar punktskattningarna avseende skillnader i utfall mellan åtgärderna.



Figur 6: Olika typer av statistiska resultat

Resultat som ligger till vänster om den vertikala mittlinjen talar för åtgärd A medan resultat som ligger till höger om denna linje talar för åtgärd B (och därmed även emot åtgärd A). Den vertikala linjen mitt i figuren är ”ingen effekt linjen”. Om ett konfidensintervall överlappar den linjen är det ingen skillnad mellan åtgärderna ifall inte region R är definierat. Centrerat kring den vertikala linjen finns en region R inom vilken skillnaderna i utfall mellan de två åtgärderna är så pass små att de bedöms sakna praktisk betydelse. Storleken på region R fastställs av sakkunniga. Skillnader som ligger utanför regionen är så pass stora att de kan sägas vara meningsfulla. De sex olika typerna av resultat kan förklaras på följande sätt:

a. Det är statistiskt säkerställt att åtgärd A medför bättre utfall än åtgärd B. Detta följer av att konfidensintervallet ligger till vänster om regionens vänstra gränsvärde.
b. Det är statistiskt säkerställt att åtgärd B medför bättre utfall än åtgärd A. Detta följer av att konfidensintervallet ligger till höger om region Rs högra gränsvärde.
c. Det är statistiskt säkerställt att utfallen från åtgärd A och åtgärd B är likvärdiga. Detta följer av att konfidensintervallet ligger inom region Rs två gränsvärden.

d. Det är statistiskt säkerställt att åtgärd A inte ger sämre utfall än åtgärd B, men kan leda till bättre utfall. Detta följer av att konfidensintervallet ligger till vänster om region Rs högra gränsvärde.
e. Det är statistiskt säkerställt att åtgärd B inte ger sämre utfall än åtgärd A, men kan leda till bättre utfall. Detta följer av att konfidensintervallet ligger till höger om region Rs vänstra gränsvärde.
f. I statistisk mening är resultatet inkonklusivt eftersom konfidensintervallet överlappar regionens båda gränsvärden. Resultatet säger alltså ingenting om hur utfallen från åtgärd A respektive utfallen från åtgärd B skiljer sig åt. Det går inte att dra någon slutsats.

3.9 Evidensgradering

Slutsatser formuleras utifrån resultaten från metaanalyser och verbala (narrativa) synteser. Dessa slutsatser evidensgraderas, vi beskriver hur säkra vi är på slutsatserna. Detta görs utifrån den statistiska osäkerheten, hur många studier det finns, evidensgranskningen och hur resultaten skiljer sig åt mellan studierna, se bilaga G. Slutsatserna baseras på resultat som bedömts inneha medel eller hög tillförlitlighet enligt evidensgranskningen, se bilaga F. Evidensgraderingen utfördes tillsammans av hela projektgruppen i ett konsensusförfarande. Evidensgraderingen av slutsatserna har följande nivåer:

- Vi är mycket säkra

  Bygger på studier med hög eller medelhög tillförlitlighet utan försvagande faktorer vid en samlad bedömning.

- Vi är säkra

  Bygger på studier med hög eller medelhög tillförlitlighet med förekomst av försvagande faktorer vid en samlad bedömning.

- Vi är ganska säkra

  Bygger på studier med hög eller medelhög tillförlitlighet med flera försvagande faktorer vid en samlad bedömning.

- Vi är osäkra

  Bygger på studier med hög eller medelhög tillförlitlighet med kraftigt försvagande faktorer vid en samlad bedömning.

- Inkonklusivt

  När studier saknas, tillgängliga studier har låg tillförlitlighet eller där studier av likartad kvalitet visar motsägande resultat, anges det vetenskapliga underlaget som otillräckligt.

Ju högre evidensgradering, desto mindre sannolikt är det att redovisade resultat kommer att påverkas av nya forskningsrön inom överblickbar framtid.

Evidensgraderingsnivån vi är ganska säkra har lagts till efter att genomförandeplanen var godkänd. Detta var ett konsensusbeslut i projektgruppen för att bättre redovisa säkerheten i slutsatserna.

3.10 Kunskapsluckor

Kunskapsluckor definieras med utgångspunkt i de svenska intressenternas specifika informationsbehov. En kunskapslucka kan bero på att det saknas resultat av relevans för intressenterna eller att befintliga resultat är metodologiskt alltför undermåliga för att vara av värde för intressenterna. Kunskapsluckorna har konkretiserats av projektets sakkunniga i samråd med representanter från Naturvårdsverket.

3.11 Bindningar och jäv

Alla sakkunniga redovisar eventuella bindningar och jäv som kan tänkas påverka deras objektivitet. Detta sker innan ett uppdrag påbörjas, samt vid eventuella förändringar. I diskutabla fall bedöms bindningar och jäv tillsammans med avdelningschef på Formas. Om Formas bedömer att en tilltänkt sakkunnig är jävig, kan han eller hon inte anlitas som sakkunnig i projektet. Ingen granskar artiklar som de själva är medförfattare till. Författarna till denna rapport redovisar inga bindningar eller jäv som påverkar deras objektivitet.

4 Resultat

I detta kapitel sammanställs resultatet av litteratursökningen. Ingående studier och studieresultat som slutsatserna baseras på beskrivs och sammanfattas. Resultatredovisningarna i kapitlet är i första hand uppdelade efter jämförda typer av renat avloppsvatten och trofinivåer (födonivåer).

Resultaten från primärproducenter och primärkonsumenter har sammanställts i tabeller och ett resonemang kring resultaten har utförts av de sakkunniga i verbala synteser. Metaanalyser har utförts på resultat från sekundärkonsumenterna, fiskarna. I de fall de sakkunniga har bedömt att utfall i de ingående artiklarna har låg tillförlitlighet har känslighetsanalyser genomförts för att analysera om resultatet med låg tillförlitlighet påverkar det sammanvägda resultatet. Slutsatserna har evidensgraderats, det vill säga vi beskriver hur säkra vi är på slutsatserna.

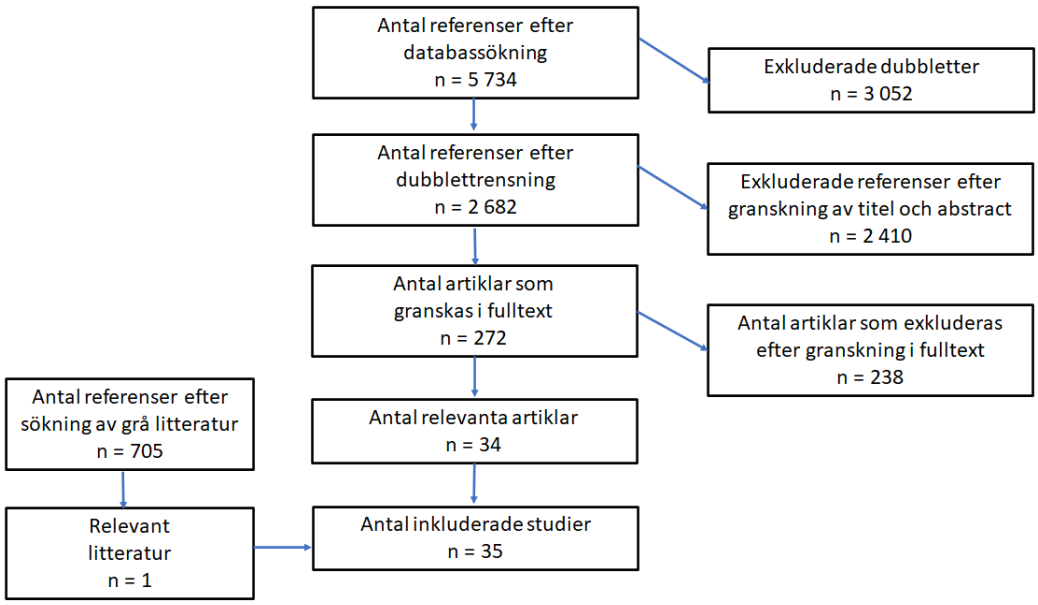
4.1 Identifiering och urval av studier

Databassökningen identifierade 2682 artiklar med preliminärt relevanta resultat. Av dessa bedömde vi, med stöd av informationen i artikelns sammanfattning, att 296 var tillräckligt intressanta för att beställa och granska i fulltext. Efter denna granskning återstod 34 artiklar som uppfyllde urvalskriterierna, se figur 7.

Sökning efter så kallad grå litteratur (svenska rapporter – myndighetsrapporter, publikationer från svenska lärosäten och dylikt) genererade 705 publikationer av vilka en vetenskapligt publicerad artikel uppfyllde urvalskriterierna för att ingå i resultatredovisningen, se figur 7.

Samtliga artiklar som vi ville ha i fulltext fick vi tag på.

Totalt genererade sökningen 3387 referenser och utav dessa uppfyllde 35 vetenskapliga artiklar urvalskriterierna.



Figur 7: Flödesschema

4.2 Sammanfattning av de ingående studierna, organismer och studiedesign

Underlaget omfattar i sin helhet 35 vetenskapligt publicerade artiklar där de flesta studierna undersökt hur fiskar påverkas av olika typer av renat avloppsvatten (22 studier) [1-6, 8, 20, 23, 25, 31, 36, 39, 40, 46-50, 54, 58, 61]. Merparten av dessa studier har exponerat fiskar för vatten inhämtat nedströms avloppsreningsverk i akvarier på laboratorium (13 studier) [1, 2, 4, 8, 20, 23, 25, 40, 48, 50, 54, 58, 61], se tabell 4.

Den näst mest frekventa undersökningsmetoden är fiskar placerade i burar (7 studier) [3-6, 31, 36, 61] på olika avstånd från avloppsreningsverk. Fiskar normalt förekommande i dessa typer av vatten har undersökts i fyra studier [39, 46, 47, 49], se tabell 4.

De effekter som har studerats är reproduktion, könsmognad, embryotoxicitet, utveckling, aktivering av proteiner, enzymer och gener, metaboliska förändringar i blodplasma, könskvoter, histologi, beteendeförändringar och fysiologiska attribut så som vikt, längd, påverkan på inre organ mm.

Utöver fisk har även bakterier (8 studier) [9, 11, 18, 26, 34, 35, 40, 70], hoppkräftor (3 studier) [12, 40, 41], sländor (2 studier) [55, 56], musslor (2 studier) [37, 38], makroalger (2 studier) [12, 40] och mikroalger (1 studie) [40] studerats. Dessa organismer har antigen studerat på laboratorium under exponering av avloppsvatten eller efter insamling i sin naturliga miljö, se tabell 4. Mortalitet (dödlighet), utveckling, tillväxt, ämnesomsättning, förekomst av antibiotikaresistensgener och fysiologiska attribut har analyserats.

Tabell 4: Studiedesign per organism

Organism	Laboratoriestudier	Burstudier i fält	Fältprover
Fiskar	13	7	4
Hoppkräftor	3		
Sländor	2		
Musslor			2
Alger (mikro-, makro-)	2		
Bakterier	2		6

N.B. en artikel kan ha studerat flera typer av organismer eller använt olika studiedesign.

4.3 Effekter av konventionellt renat avloppsvatten jämfört med referens- eller kontrollvatten

Konventionellt renat avloppsvatten och dess påverkan på vattenlevande organismer har studerats i samtliga 35 artiklar. Jämförelsealternativen har varit referensvatten eller kontrollvatten, där kontrollvatten har varit kranvatten eller modifierat kranvatten (exempelvis kranvatten utan klor). Referensvatten har antingen varit vatten uppströms ett avloppsreningsverk eller vatten från andra sjöar eller vattendrag som bedömts opåverkade av denna typ av föroreningar.

Samtliga tre trofinivåer (födonivåer) som normalt ingår i miljöriskbedömning av enskilda kemikalier och avloppsvatten finns representerade i detta kapitel:

- Primärproducenter (mikroalger, makrolager, bakterier),
- Primärkonsumenter (hoppkräftor, sländor, musslor) samt
- Sekundärkonsumenter (zebrafisk, regnbåge, abborre, spigg).

Då merparten av studierna analyserat effekter på fisk har metaanalyser utförts på resultat från dessa studier. Studier som analyserat effekter i andra organismer än fisk lämpade sig inte för metaanalyser på grund av att det antingen fanns för få studier som hade analyserat effekter i samma organism eller att utfallsvariablerna, det vill säga vilka effekter som hade analyserats, skiljde sig åt mellan studierna.

Effekterna redovisas i form av skillnader jämfört med den påverkan som exponering för rent vatten medfört. Resultaten är uppdelade efter trofinivå (födonivå).

Resultat

1. Bakteriefloran och förekomst av resistenta bakterier/resistensgener i recipienter påverkas av konventionellt renat avloppsvatten.
2. Makroalgers tillväxt försämras i närvaro av konventionellt renat avloppsvatten.
3. Hoppkräftors dödlighet ökar vid hög koncentration av konventionellt renat avloppsvatten.
4. Musslors BMI, GSI, ålder mm är påverkad nedströms reningsverk.
5. Sländors fettsyrametabolism påverkas av konventionellt renat avloppsvatten.
6. Fisk exponerade för konventionellt renat avloppsvatten uppvisar förändringar som indikerar att östrogenexponering har skett (ökade nivåer av vitellogenin-protein, vitellogenin-mRNA och LSI).
7. Fisk exponerade för konventionellt renat avloppsvatten uppvisar förändringar som indikerar att exponering för toxiska substanser har skett (ökad CYP1A1-enzymaktivitet, CYP1A1-mRNA och LSI).
8. Fisk exponerade för konventionellt renat avloppsvatten uppvisar förändringar som indikerar att oxidativ stress har skett (ökad enzymaktivitet av glutathione reductase).
9. Fiskar placerade i burar nedströms reningsverk har indikationer på exponering för östrogen och fler oxidativa skador.
10. Viltfångade fiskar nedströms reningsverk visar inga indikationer på att vara påverkade av avloppsvatten med undantag för lägre GSI i sexuellt mogna honor.

Inkonklusiva resultat

1. Det går inte att bedöma om mikroalgers tillväxt påverkas av konventionellt renat avloppsvatten.
2. Det går inte att bedöma om reproduktionshormoner, reproduktion, beteende och tillväxt i fisk påverkas av konventionellt renat avloppsvatten.

4.3.1 Effekter på organismer inom trofinivå primärproducenter

Bakterier har studerats i totalt åtta artiklar. I sju av dessa artiklar [9, 11, 18, 26, 34, 35, 70] har bakterier studerats med avseende på om avloppsvatten bidrar till att gynna antibiotikaresistens hos bakterier eller om exponering för avloppsvatten förändrar sammansättningen av bakteriefloran nedströms reningsverk. För detta ändamål har sediment, musslor eller vatten insamlade i fält

används. Referensvatten (uppströms och längre nedströms reningsverken) och referensprover (sediment och musslor uppströms och längre nedströms reningsverken) utgjorde kontrollalternativ.

Utöver ovanstående sju artiklar har akut toxicitet för bakterier, genom att studera bakteriers bioluminiscensförmåga (förmåga att omvandla energi till ljus som skickas ut från bakterien), analyserats i Lundström m.fl. (2010) [40]. För detta ändamål användes avloppsvatten från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm. Modifierat kranvatten användes som kontrollalternativ och experimenten utfördes på laboratorium.

Lundström m.fl. (2010) [40] studerade även mikro- och makroalger med avseende på tillväxt efter exponering för avloppsvatten från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm. Experimenten utfördes på laboratorium med modifierat kranvatten som kontrollalternativ.

Antibiotikaresistens, bakterieflora och toxicitet för bakterier

Berglund m.fl. (2015) [9] studerade antibiotikaresistensgener i sediment på olika avstånd uppströms och nedströms Nykvarnsverket i Linköping. Förekomsten av olika resistensgener var genomgående högre nedströms reningsverket än uppströms.

Bighiu m.fl. (2019) [11] analyserade förekomst av bakterier, *E. coli* och enterokocker, i musslor. För detta ändamål sattes musslor ut i burar på olika avstånd nedströms Kungsängsverket i Uppsala. Som referensalternativ sattes burar med musslor uppströms reningsverket. Vattenprover togs parallellt. Förekomsten av såväl *E. coli* som enterokocker var högre vid alla fältprover nedströms reningsverket jämfört med uppströms, både i musslor och i vattenprover. Analyser gjordes sedan med avseende på resistensprofiler för ett urval av bakterieisolaten, men på grund av hur resultaten presenterades i artikeln kan inga slutsatser kring eventuell resistensselektion dras.

Khan m.fl. (2019) [34] analyserade antal odlingsbara koliforma bakterier, förekomst av olika bakteriearter samt förekomst av antibiotikaresistensgener i gram-negativa bakterier i vatten uppströms och på två platser nedströms reningsverket i Örebro. Koliforma bakterier i den mest exponerade fältprovet skiljde sig inte mot uppströms, däremot var den lägre längst nedströms (ute i Mälaren, sannolikt mycket låg exponering). Olika arter hittades vid de olika provtagningsplatserna, men på grund av avsaknad av replikering i analysen kan inga säkra slutsatser dras kring fynden. Författarna fann fler resistensgener nedströms än uppströms, men på grund av bristfällig kvantifieringsstrategi är det svårt att dra slutsatser kring om detta representerade en signifikant skillnad. Tillförlitligheten för utfallen i denna artikel bedömdes som låg, se bilaga F.

Kraupner m.fl. (2021) [35] undersökte om avloppsvatten från Ryaverket i Göteborg bidrog till att selektera fram multi-resistenta bakterier (*E. coli)*. Eftersom avloppsvattnet sterilfiltrerades, d.v.s. bakterier som fanns i avloppsvattnet filtrerades bort, innan bakteriesamhällen på laboratorium utsattes för det sterilfiltrerade avloppsvattnet kan man – till skillnad från övriga observationsstudier av resistensgener/bakterier i fältprover som redovisas här – dra slutsatser kring direkta effekter av kemikalier/antibiotika i avloppsvattnet. Inga effekter på selektion av resistenta *E. coli* kunde påvisas av konventionellt renat avloppsvatten (däremot observerades selektiva effekter av orenat avloppsvatten liksom av avloppsvatten från sjukhus). I övriga studier kan en ökning av resistens nedströms också, eller i sin helhet, bero på ”läckage” av redan resistenta tarmbakterier.

Hagberg m.fl. (2021) [26] analyserade bakteriefloran nedströms och på olika platser uppströms reningsverket i Knivsta i Uppsala. För detta ändamål placerades stenar ut på vilka tillväxt av bakterieflora i biofilmer på stenarna studerades, både med odlingsoberoende analys (total DNA) och efter odling på laboratorium. Bakteriefloran (förekomsten av olika taxa) skiljde sig åt uppströms jämfört med nedströms reningsverket.

Coll m.fl. (2020) [18] analyserade hur mikrobiella samhällen kan bryta ned olika kemikalier. För detta ändamål användes sediment från Fyrisån uppströms och nedströms Kungsängsverket i Uppsala. Syftet med studien var inte primärt att undersöka effekter av exponering för avloppsvatten, därför saknas replikering av sedimentproverna upp- och nedströms (delprover verkar ha poolats innan man tillsatte kemikalier). Några uppenbara skillnader kunde inte observeras i upp- och nedströmsprover från Fyrisån.

Zakrisson m.fl. (2014) [70] analyserade förekomsten av så kallade heterocystor hos en art av cyanobakterier i Himmerfjärden på olika avstånd nedströms reningsverk och i referensvatten. Inga statistiska skillnader observerades mellan fältprover nedströms reningsverk och i referensvatten. Tillförlitligheten för utfallen i denna artikel bedömdes som låg, se bilaga F.

Lundström m.fl. (2010) [40] analyserade bakteriers (*V. fischeri*) bioluminiscensförmågan. För detta ändamål användes konventionellt renat avloppsvatten (utan och med sandfilter) från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm. Kontrollvatten utgjorde referensalternativ. Inga statistiska säkerställda skillnader i bioluminiscensförmågan hos bakterierna detekterades mellan exponeringsgrupperna.

Sammantaget visar tre studier (Berglund m.fl. [9], Bigue m.fl. [11], Hagberg m.fl. [26]) att bakteriefloran är förändrad nedströms reningsverk, med olika utfallsmått (resistensgener, förekomst av *E. coli* och enterokocker, samt bred artförekomst). Berglund m.fl. [9] visar att förekomsten av resistenta bakterier är högre nedströms reningsverk.

Det går emellertid inte att konkludera om detta (till del) beror av en kemikalieexponering eller om det i sin helhet är ett resultat av ”läckage” av (resistenta) bakterier från reningsverken. Den enda studien som har en försöksdesign som möjliggör att man renodlat studerar selektion av resistens, Kraupner m.fl. [35], tyder inte på selektion av renat kommunalt avloppsvatten.

Mikro- och makro-alger

Lundström m.fl. (2010) [40] analyserade tillväxthämning av mikroalger (*P. subcapitata*) och makroalger (*C. tenuicorne*) efter exponering för konventionellt renat avloppsvatten (utan och med sandfilter) från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm. Kontrollvatten utgjorde referensalternativ. Inga statistiskt säkerställda skillnader på tillväxt av mikroalger mellan exponeringsgrupperna detekterades.

Däremot detekteras en tillväxthämning för makroalger efter exponering för konventionellt renat avloppsvattnet jämfört med exponering för kontrollvatten. En tillväxthämning på 50 procent av makroalgerna förväntades vid exponering för mellan 35.9 och 55.4 procent konventionellt renat avloppsvatten. För konventionellt renat vatten som även behandlats med ett sandfilter var detta spann mellan 49.2 och 66.5 procent avloppsvatten, se tabell 5.

Tabell 5: den exponeringskoncentration som krävs för en tillväxthämning hos makroalger på 50%

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell	35.9 till 55.4
Konventionell och sandfilter	49.2 till 66.5

Breitholtz m.fl. (2012) [12] observerade även en tillväxthämning av makroalg efter exponering för konventionellt renat avloppsvatten från fyra avloppsreningsverk i Mellansverige (Eskilstuna, Oxelösund, Trosa och Nynäshamn) jämfört med kontrollvatten, se tabell 6.

Tabell 6: den exponeringskoncentration som krävs för en tillväxthämning hos makroalger på 50%

Reningsverk	**Konfidensintervall 95%**
Eskilstuna	12 till 22
Oxelösund	4.2 till 10
Trosa	35 till 57
Nynäshamn	41 till 43

Sammantaget finns det ett stöd för att makroalgers tillväxt försämras i närvaro av konventionellt renat avloppsvatten jämfört med kontrollvatten. Det som försvagar underlaget är att det i vissa fall krävdes exponering för höga koncentrationer av avloppsvattnet för att en tillväxthämning skulle ske.

4.3.2 Effekter på organismer inom trofinivå primärkonsumenter

Hoppkräftor har studerats i tre artiklar med avseende på antingen individuell tillväxt eller populationstillväxt samt dödlighet. För detta ändamål användes avloppsvatten från Hammarby Sjöstadsverk (Lundström m.fl. (2010) [40] och Henriksdals reningsverk (Lundström m.fl. (2010) [41] i Stockholm samt reningsverken i Eskilstuna, Nynäshamn, Trosa och Oxelösund (Breitholtz m.fl. (2012) [12]. Effekterna jämfördes mot kontrollvatten eller referensvatten i experiment på laboratorium.

Blåmusslor har studerat i två artiklar i Larsson m.fl. (2016) [37] och Larsson m.fl. (2018) [38] med avseende på fysiologiska attribut och genetik. Blåmusslor samlades in utanför reningsverken i Trosa/Nynäshamn, Kristineberg och Karlskrona och jämfördes mot blåmusslor från referensområden.

Sländor har studerats i två artiklar med avseende på ämnesomsättning i Späth m.fl. (2020) [55] och Späth m.fl. (2021) [56] under exponering av avloppsvatten från reningsverket i Umeå. Kontrollvatten utgjorde referensalternativ och experimenten utfördes på laboratorium.

Hoppkräftor

Tillväxt och dödlighet hos hoppkräftor (Lundström m.fl. 2010, [40]) samt populationstillväxt och förändring över tid från ett utvecklingsstadium till ett annat (Lundström m.fl. 2010, [41]) har undersökts i laboratorieexperiment. För detta ändamål användes konventionellt renat avloppsvatten från Hammarby Sjöstadsverk respektive Henriksdals reningsverk i Stockholm. Jämförelsealternativet var opåverkat bräckt vatten. Hoppkräftlarver exponerades för avloppsvatten i olika koncentrationer i behållare.

Toxicitet

Påverkan av konventionellt renat avloppsvatten testades med avseende på toxicitet. Efter sex dagars exponering för 100 procent avloppsvatten (med och utan sandfilter) var i stort sett alla larver och sexuellt omogna hoppkräftor döda i Lundström m.fl. 2010 [40]. Skillnad i dödlighet mellan larver och hoppkräftor som exponerats för avloppsvatten var statistiskt säkerställd jämfört med kontrollvatten. När det konventionellt renade avloppsvattnet späddes ut så minskade denna skillnad mellan exponeringsgrupperna.

I en annan artikel, Breitholtz m.fl. 2012 [12], studerades dödligheten hos hoppkräftor i samband med en utvärdering av behandlingsvåtmarker som tilläggsbehandling till konventionell rening. Undersökningar genomfördes på fyra olika orter och med olika koncentrationer av det konventionellt renade avloppsvattnet. Jämförelsealternativet bestod av opåverkat bräckt vatten.

Resultaten rörande dödlighet i denna artikel, innehåller sammantaget 16 möjliga jämförelser. Några direkta jämförelser i statistisk mening har inte genomförts, men intervallestimaten kan jämföras för att få en bild, se tabell 7 till 10.

Tabell 7: medelvärde vad gäller dödlighet, hoppkräftor, Eskilstuna

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	4.1 till 17.9
Konventionell 22.5%	6.5 till 21.5
Konventionell 45%	4.6 till 13.0
Konventionell 90%	91.8 till 100.2
Referensvatten	4.1 till 17.9

Tabell 8: medelvärde vad gäller dödlighet, hoppkräftor, Nynäshamn

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	9.7 till 26.3
Konventionell 22.5%	5.8 till 20.2
Konventionell 45%	7.9 till 24.1
Konventionell 90%	alla döda
Referensvatten	4.1 till 17.9

Tabell 9: medelvärde vad gäller dödlighet, hoppkräftor, Oxelösund

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	2.6 till 15.0
Konventionell 22.5%	0.2 till 9.8
Konventionell 45%	1.7 till 13.3
Konventionell 90%	6.5 till 21.5
Referensvatten	6.5 till 21.5

Tabell 10: medelvärde vad gäller dödlighet, hoppkräftor, Trosa

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	4.1 till 17.9
Konventionell 22.5%	6.5 till 21.5
Konventionell 45%	7.2 till 22.8
Konventionell 90%	91.8 till 100.2
Referensvatten	6.5 till 21.5

Av dessa 16 jämförelser är endast tre troligen statistiskt säkerställda resultat, nämligen då en 90 procent exponering jämförs med referensvatten i Eskilstuna (tabell 7), Nynäshamn (tabell 8) och Trosa (tabell 10) då intervallestimaten inte överlappar intervallestimatet för referensvatten.

I dessa fall talar resultaten för att dödligheten är högre när hoppkräftorna exponeras för konventionellt renat avloppsvatten i jämförelse med referensvattnet. Avvikande från detta är resultatet från Oxelösund där ingen ökad dödlighet observeras efter exponering av avloppsvatten, se tabell 9. Övriga resultat är inkonklusiva i och med att intervallestimaten avseende de olika koncentrationerna överlappar intervallestimatet för referensvattnet.

Sammantaget finns det ett stöd för att vid hög koncentration av konventionellt renat avloppsvatten så ökar dödligheten för hoppkräftor jämfört med exponering för opåverkat bräckt vatten. Det som försvagar underlaget är att inte samtliga undersökta avloppsvatten visar detta (effekt ses i fem utav sex undersökta avloppsvatten). Vid lägre koncentrationer går det inte att dra några slutsatser om huruvida det ena exponeringsalternativen är bättre än det andra.

Populationstillväxt och förändring från ett utvecklingsstadium till ett annat

Populationstillväxt och förändring från ett utvecklingsstadium till ett annat hos hoppkräftor undersöktes i Lundström m.fl. 2010 [41]. Den metod som användes var en stadiestrukturerad matrismodell för geometrisk tillväxt, där tillväxtkvoten (λ) anger populationens tillväxt eller minskande över tid. En kvot över 1.0 tyder på en tillväxt över tid medan en kvot under 1.0 indikerar en krympande population. Konfidensgränser på 95 procent visas i tabell 11. Konfidensgränser anger grovts sett inom vilket intervall som författarna med 95 procents säkerhet anser att den ”verkliga” tillväxtkvoten ligger, men är inte samma sak som konfidensintervall.

Tabell 11: Populationstillväxt som lambda (λ)

Behandling	**Konfidensgränser 95%**
Konventionell 3%	1.32 till 1.98
Konventionell 15%	1.36 till 1.93
Konventionell 75%	0.30 till 1.14
Referensvatten	1.44 till 2.10

För de lägre koncentrationerna (3 och 15 procent) av konventionellt renat avloppsvatten, så överlappar konfidensgränsintervallen motsvarande intervall för opåverkat vatten. Detta betyder att det inte går att säga om det ena exponeringsalternativet är bättre än det andra. Resultaten avseende populationstillväxt efter exponerings för lägre koncentrationer av konventionellt renat vatten jämfört med det opåverkade vattnet är således inkonklusiva.

För den högre koncentrationen (75 procent) av konventionellt renat avloppsvatten, så är konfidensgränsintervallet lägre än för opåverkat vatten vilket betyder att populationstillväxten efter exponering för konventionellt renat vatten är lägre jämfört med det opåverkade vattnet.

I samma artikel, Lundström m.fl. 2010 [41], studerade man även hoppkräftornas utveckling från ett stadium till ett annat med hjälp av hazardkvoter. De statistiska jämförelserna gjordes mot det bräckta vattnet, referensalternativet.

En hazardkvot som ligger under 1.0, tyder grovt sett på att utvecklingen från ett stadium till ett annat går långsammare för djur som exponerats för det konventionellt renade avloppsvattnet. I tabell 12 visas utvecklingen från larvstadium till kräftstadium (ej sexuellt mogna). Eftersom samtliga konfidensintervall överlappar 1.0, så är samtliga resultat inkonklusiva.

Tabell 12: Hazardkvot från larvstadium till kräftstadium – konventionell rening jämfört med naturligt vatten

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 3%	0.74 till 1.44
Konventionell 15%	0.67 till 1.33
Konventionell 75%	0.78 till 1.55

I tabell 13 redovisas konfidensintervall avseende hazardkvoter för utveckling från larvstadium till det stadium där kräftorna är sexuellt mogna. Den övre gränsen för samtliga intervallestimat är lägre än 1.0, vilket tyder på att utvecklingen från larvstadium till kräftstadium där kräftorna är sexuellt mogna går långsammare för de djur som exponerats för det konventionellt renade avloppsvattnet

Tabell 13: Hazardkvot från larvstadium till sexuell mognad – konventionell rening jämfört med naturligt vatten

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 3%	0.39 till 0.80
Konventionell 15%	0.36 till 0.77
Konventionell 75%	0.33 till 0.71

Utvecklingshämning (LDR) studerades även i Breitholtz m.fl. (2012) [12], se tabell 14–17. Samtliga hoppkräftor var döda efter exponering för 90 procent avloppsvatten från reningsverken i Eskilstuna, Nynäshamn, Trosa och Oxelösund. Vid lägre koncentrationer av avloppsvatten observerades en högre utvecklingstakt av hoppkräftor efter exponering av avloppsvatten från Eskilstuna, Trosa och Nynäshamn, se tabell 14–15, 17. Detta observerades inte efter exponering av avloppsvatten från Oxelösund, där är resultaten inkonklusiva då konfidensintervallen överlappar konfidensintervallet för referensvattnet, se tabell 16.

Tabell 14: medelvärde vad gäller LDR, hoppkräftor, Eskilstuna

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	37.0 till 59.0
Konventionell 22.5%	54.0 till 76.0
Konventionell 45%	75.5 till 92.5
Konventionell 90%	alla hoppkräftor döda
Referensvatten	14.1 till 33.9

Tabell 15: medelvärde vad gäller LDR, hoppkräftor, hoppkräftor, Nynäshamn

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	36.0 till 60.0
Konventionell 22.5%	53.0 till 77.0
Konventionell 45%	75.1 till 92.9
Konventionell 90%	alla hoppkräftor döda
Referensvatten	14.1 till 33.9

Tabell 16: medelvärde vad gäller LDR, hoppkräftor, hoppkräftor, Oxelösund

Behandling	Konfidensintervall 95%
Konventionell 11.25%	81.8 till 96.2
Konventionell 22.5%	75.8 till 92.2
Konventionell 45%	87.3 till 98.7
Konventionell 90%	46.0 till 62.0
Referensvatten	64.0 till 84.0

Tabell 17: medelvärde vad gäller LDR, hoppkräftor, Trosa

Behandling	Konfidensintervall 95%
Konventionell 11.25%	69.5 till 88.5
Konventionell 22.5%	56.0 till 78.0
Konventionell 45%	67.0 till 87.0
Konventionell 90%	alla hoppkräftor döda
Referensvatten	56.0 till 78.0

Sammantaget visar dessa studier att i högre koncentrationer av avloppsvatten observeras en minskad populationstillväxt av hoppkräftor. Samt en minskad utveckling av hoppkräftor från larvstadium till sexuell mognad vid exponering för avloppsvatten.

Musslor

Larsson m.fl. (2016) [37] samlade in blåmusslor i närheten av reningsverk (Askö, Karlskrona, Kristinehamn) samt från referensområden med syfte att undersöka om den genetiska differentieringen påverkats av de olika typerna av exponering. Det mått man använde var H_E (average expected heterozygosity). Konfidensintervallen visas i tabell 18. Ett konfidensintervall som överlappar noll innebär att ingen skillnad på H_E mellan musslor utanför reningsverk jämfört med musslor från referensområden observeras.

Tabell 18: Blåmusslor insamlade nära reningsverk respektive referensplats

H_E (average expected heterozygosity)	**Medelvärdesskillnad Konfidensintervall 95%**
Askö	0.00 till 0.04
Karlskrona	-0.03 till 0.01
Kristinehamn	-0.04 till 0.00

Inga statistiskt säkerställda skillnader (95%) mellan musslor insamlade nära respektive långt ifrån reningsverket med avseende på H_E observerades då samtliga konfidensintervall överlappar noll, se tabell 18.

Blåmusslor i närheten av reningsverk (Himmerfjärden) samt i områden långt ifrån utsläppen (Askö) samlades in och analyserades i ytterligare en studie (Larsson m.fl. 2018) [38]. Syftet var att undersöka hur fysiologiska och histologiska markörer kan ha påverkats av exponering av avloppsvatten. Konfidensintervallen visas i tabell 19.

Tabell 19: Blåmusslor insamlade nära reningsverk respektive referensplats

Utfallsmått	**Medelvärdesskillnad Konfidensintervall 95%**
Ålder	0.03 till 0.77
Kroppsviktsindex (BMI)	-2.76 till -0.84
Längden på skalet	6.31 till 9.09
Torr vävnadsvikt	61.94 till 98.72
Könsorganens utveckling (GD)	-0.95 till 0.07
Könsorgansindex (GSI)	-0.08 till -0.02

Statistiskt säkerställda skillnader (95%) mellan musslor insamlade nära respektive långt ifrån reningsverket finns avseende ålder, skalets längd och torrvikt, där närheten till reningsverket ger högre värden, som till exempel längre skal hos de musslor som fanns nära reningsverken. Motsatta och statistiskt säkerställa (95%) resultat observerades avseende kroppsviktsindex (BMI) och könsorgansindex, där BMI och könsorgansindex var lägre hos musslor nära reningsverken. Resultaten rörande utveckling av könsorganen samt andelen honor var inte statistiskt säkerställda (intervallestimatet för andel honor var -0.15 till 0.14) då intervallestimaten överlappar noll.

Inga skillnader vad gäller vävnadsskador på matsmältningskörtel, gälar eller könsorgan var statistiskt säkerställda (95%) då samtliga konfidensintervall överlappar noll, se tabell 20.

Tabell 20: Blåmusslor insamlade nära reningsverk respektive långt från reningsverk

Utfallsmått (histological lesions)	**Proportionsskillnad Konfidensintervall 95%**
Vävnadsskador på matsmältningskörtel	-0.24 till 0.00
Vävnadsskador på gälar	-0.00 till 0.28
Vävnadsskador på könsorgan	-0.04 till 0.25

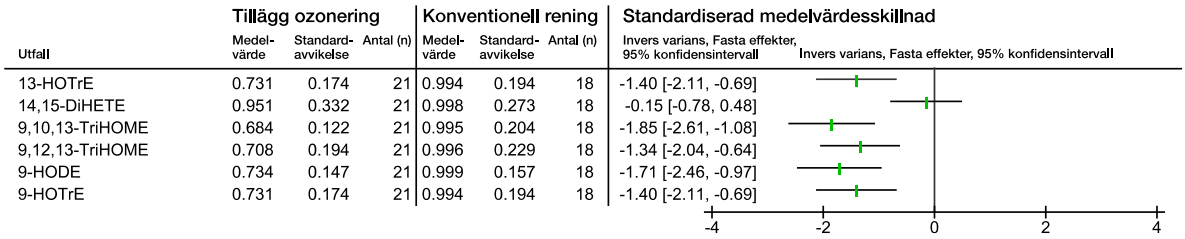
Däremot tyder intervallestimatet, rörande medelvärden av antal celler som innehåller en extra kärna med skadade kromosomfragment (micronuclei), på ökad skada hos de musslor som samlats in långt från reningsverket. Intervallestimatet går från -0.30 till -0.02.

Sammantaget visar dessa studier att vissa skillnader kunde observeras hos musslor nedströms reningsverk och referensområden avseende ålder, skalets längd, torrvikt, BMI och GSI. Inga skillnader vad gäller vävnadsskador eller genetisk differentiering (H_E) detekterades.

Sländor

Späth m.fl. analyserade fettsyra-metabolism (ämnesomsättning) i sländlarver (Späth m.fl. 2020) [55] och i olika utvecklingsstadier från larver till sländor (Späth m.fl. 2021) [56]. För detta ändamål användes avloppsvatten från reningsverket i Umeå. Referensalternativ utgjorde kontrollvatten och experimenten utfördes på laboratorium.

Lägre koncentration av fettsyror i sländor observerades efter exponering för konventionellt renat avloppsvatten i jämförelse med kontrollvatten i Späth m.fl. 2020. Undantag är 14,15-DiHETE där ingen skillnad mellan behandlingsalternativen detekterades då intervallestimatet överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), se figur 8.



Figur 8: standardiserad medelvärdesskillnad, fettsyrakoncentration, konfidensintervall 95%

Även i Späth m.fl. 2021 [56] observerades skillnader i fettsyrakoncentration mellan larver exponerade för konventionellt renat avloppsvatten och kontrollvatten. Dock analyserades inte samma fettsyror (med undantag för 9-HODE där samma effekter observerades) i båda artiklarna.

4.3.3 Effekter på organismer inom trofinivå sekundärkonsumenter

Fiskar har studerats i 22 artiklar med avseende på reproduktion och utveckling, aktivering av molekyler och metaboliska förändringar, histologi och fysiologiska attribut mm. Studierna har utförts på laboratorium på zebrafisk eller regnbåge exponerade för konventionellt renat avloppsvatten och kontrollvatten. Alternativt har regnbåge placerats ut i burar nedströms och uppströms reningsverk. Abborre och spigg har fiskats utanför reningsverk och i referensvatten.

Studierna har delats upp i detta kapitel på

- Laboratoriestudier
- Burstudier i fält
- Fältprover

Laboratoriestudierna skiljer sig åt med avseende på vilka utfallsvariabler (vilka effekter) som studerats, exponering (både gällande koncentration av avloppsvattnet och tid för exponering) och fiskart (zebrafisk, regnbåge). Trots dessa skillnader har bedömningen gjorts att vissa resultat där samma utfallsvariabel har studerats har kunnat vägas samman i metaanalyser.

När olika exponeringskoncentrationer av avloppsvatten har använts i en studie så har resultatet från den mest likvärdiga koncentrationen som övriga studier används när sammanvägningar har gjorts. Då vi vill ha svar på om en viss rening talar för eller emot en påverkan på vattenlevande organismer bedömde vi att dessa sammanvägningar kunde genomföras på det sättet. Syftet var inte att beräkna specifika effektmått utan att få en överblick över vilket exponeringsalternativ resultaten talar för.

Däremot har fältförsök (burstudier och fältprover) och laboratoriestudier som analyserat samma utfallsvariabel inte vägts samman i metaanalyser då exponeringskoncentrationerna inte går att bedöma i fältförsöken.

I metaanalyserna har storleken för varje exponeringsgrupp satts till det totala antal fiskar för varje jämförelse då det är medelvärdet hos fiskarna vi vill analysera. De sakkunniga har bedömt att interaktionseffekter, det vill säga risken att fiskarna i ett akvarium påverkar varandra, för de utfallsmått (exempelvis genuttryck) som vi analyserar i metaanalyserna är av mindre betydelse och ingen justering av n ansågs nödvändig. Även författarna till de enskilda studierna baserar resultaten på totalt antal fiskar.

De studerade effekterna har delats upp i följande grupper:

- Indikation på östrogenexponering
- Störning av reproduktionshormoner, reproduktion, beteende och tillväxt
- Indikation på exponering för toxiska substanser - dioxin
- Oxidativ stress och påverkan på ”avgiftningssystem”

Laboratoriestudier

Exponeringsförsök i laboratorium har skett i akvarier där fiskarna exponerats för konventionellt renat avloppsvatten. Effekterna jämfördes mot fiskar som exponerats för kontrollvatten, så som kranvatten eller modifierat kranvatten. De fiskar som studerats är zebrafisk och regnbåge.

Indikation på östrogenexponering (regnbåge, zebrafisk)

För att mäta östrogen-liknande påverkan i fisk används biomarkörer (en biologisk mätbar indikator av ett biologiskt tillstånd) som visar om en östrogenexponering har skett. Till dessa biomarkörer hör vitellogenin-protein, zona pellucida proteiner (ZP) och leversomatiskt index (LSI).

Vitellogenin (protein och mRNA) produceras normalt endast i honor under kontroll av kroppseget östrogen men vid exponering för östrogena ämnen via exempelvis vattnet ökar nivåerna av vitellogeninprotein i juvenila honor och hannar samt i vuxna hannar. I vuxna honor kan nivåerna av vitellogenin gå antingen upp eller ner efter exponering för östrogen i vatten, beroende på dos och fas i reproduktionscykeln.

Zona pellucida består av glykoproteinerna ZP1, ZP2, ZP3 samt i vissa arter ZP4 som tillsammans bygger upp ett skyddande äggskal runt äggcellernas cellmembran. De kan också ha en funktion för att attrahera spermier. Hos de flesta arter tillverkas ZP proteiner under kontroll av östrogen i levern och transporteras sedan via blodet till könskörtlarna, på liknande sätt som för vitellogenin.

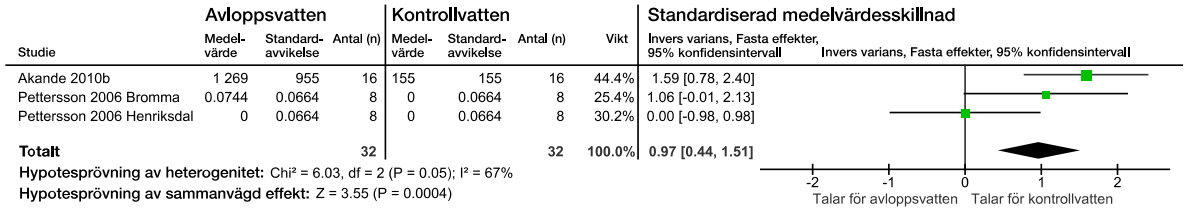
Leversomatiskt index (LSI) mäts i levervikt per kroppsvikt och är ett grovt mått på hur fisken kan ha påverkats av exponeringen för östrogen och toxiska substanser då leverns storlek och funktion kan ha ändrats. Exempelvis kan exponering för östrogen leda till produktion av proteiner och förstorad lever. LSI är inte ett lika känsligt mått som vitellogenin, och inte heller lika specifikt för just östrogenpåverkan.

Vitellogenin-protein

Akande m.fl. (2010) [2] och Pettersson m.fl. (2006) [48] analyserade vitellogenin-protein i zebrafisk respektive regnbåge. Fiskarna hade dessförinnan exponerats för konventionellt renat avloppsvatten från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm respektive Bromma reningsverk och Henriksdals reningsverk i Stockholm. Kontrollvatten utgjorde referensalternativ.

Resultatet som redovisas i Akande m.fl. talar för att konventionellt renat avloppsvatten aktiverar produktion av vitellogenin-protein medan båda resultaten från Pettersson m.fl. är inkonklusiva då intervallestimaten överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), se figur 9.

Vid sammanvägning av resultaten så blir nivån av vitellogenin-protein högre för de fiskar som exponerats för konventionellt renat avloppsvatten jämfört med kontrollvatten. Denna skillnad är statistiskt säkerställd vilket visar sig i att det sammanvägda intervallestimatet på 95 procent (Totalt, svart romb) inte överlappar mittlinjen (0.44, 1.51), se figur 9.



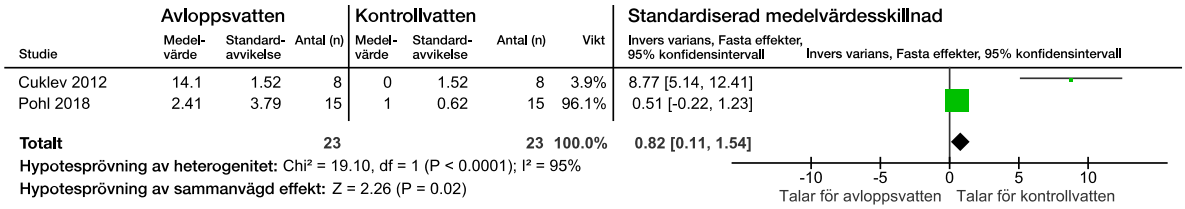
Figur 9: standardiserad medelvärdesskillnad, vitellogenin-protein, konfidensintervall 95%

Vitellogenin-mRNA

Cuklev m.fl. (2012) [20] och Pohl m.fl. (2018) [50] analyserade vitellogenin mRNA-nivåer, det vill säga transskript av vitellogenin-genen för att cellerna ska kunna producera vitellogenin-protein. Detta mättes i lever i regnbåge respektive zebrafisk. Fiskarna hade dessförinnan exponerats för konventionellt renat avloppsvatten från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm och Knivsta reningsverk i Uppsala eller kontrollvatten.

Resultatet som redovisas i Cuklev m.fl. talar för att konventionellt renat avloppsvatten aktiverar produktion av vitellogenin-mRNA, medan resultatet från Pohl m.fl. är inkonklusivt då intervallestimatet överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), se figur 10.

Vid sammanvägning av resultaten så blir nivån av vitellogenin-mRNA högre för de fiskar som exponerats för konventionellt renat avloppsvatten jämfört med kontrollvatten. Denna skillnad är statistiskt säkerställd vilket visar sig i att det sammanvägda intervallestimatet på 95 procent (0.11, 1.54) inte överlappar mittlinjen, se figur 10.



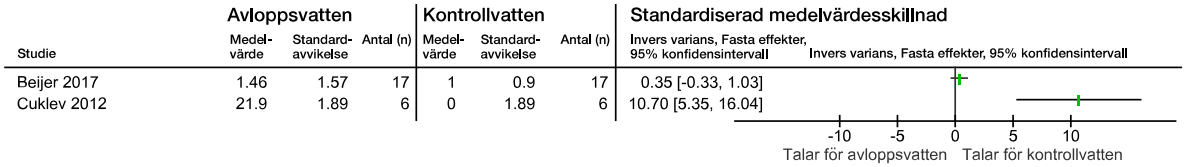
Figur 10: standardiserad medelvärdesskillnad, vitellogenin-mRNA (qPCR), konfidensintervall 95%

Zona pellucida

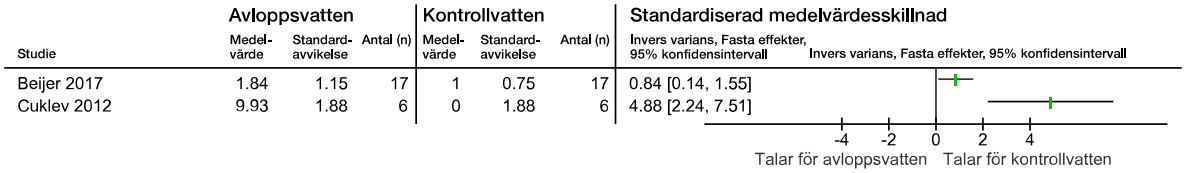
Beijer m.fl. (2017) [8] och Cuklev m.fl. (2012) [20] analyserade mRNA nivåer av ZP 1–3, d.v.s. transskript av ZP 1–3 genera för att cellerna ska kunna producera ZP-proteiner, i lever i regnbåge. Dessförinnan hade regnbågarna exponerats för konventionellt renat avloppsvatten från Käppala reningsverk på Lidingö respektive Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm. Kontrollvatten utgjorde referensalternativ.

Resultatet som redovisas i Cuklev m.fl. talar för att konventionellt renat avloppsvatten aktiverar produktion av ZP 1–3 mRNA medan Beijer m.fl. endast observerade detta för ZP2-mRNA. Resultaten för ZP1 och ZP3 som redovisas i Beijer m.fl. är inkonklusiva då intervallestimaten överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen) vilket kan bero på en för kort exponeringstid (fyra dagar) för ZP aktivering, se figur 11–13.

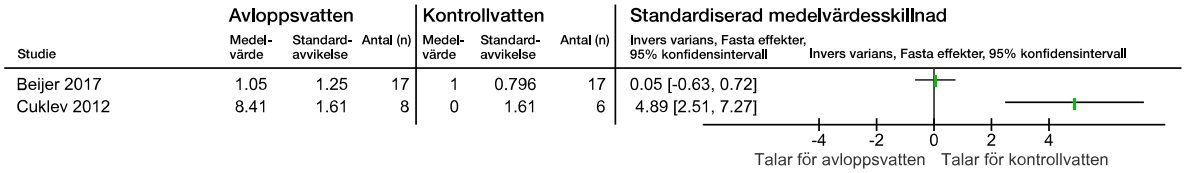
Tillförlitligheten till resultatet i Beijer m.fl. bedöms som låg på grund av den korta exponeringstiden och en sammanvägning av resultaten genomförs således inte.



Figur 11: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå ZP1, konfidensintervall 95%



Figur 12: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå ZP2, konfidensintervall 95%

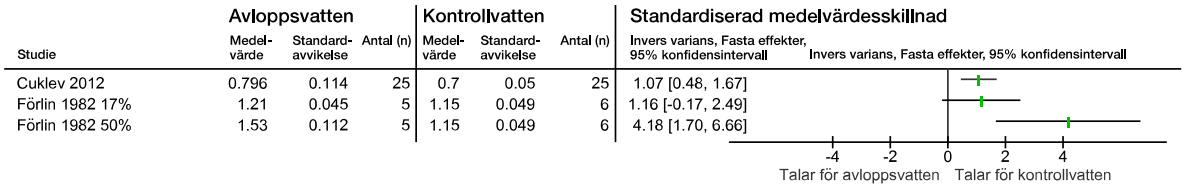


Figur 13: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå ZP3, konfidensintervall 95%

Leversomatiskt index (LSI)

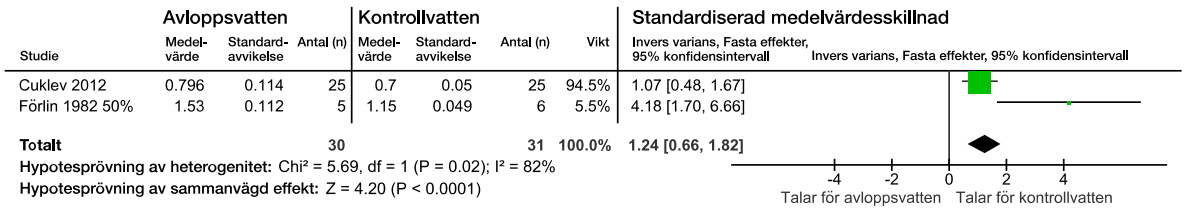
Förlin m.fl. (1982) [23] och Cuklev m.fl. (2012) [20] analyserade leversomatiskt index (LSI) i regnbåge efter exponering för konventionellt renat avloppsvatten från Ryaverket i Göteborg (17 och 50 procent avloppsvatten) respektive Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm (100 procent). Kontrollvatten utgjorde referensalternativ.

Resultaten som redovisas i Cuklev m.fl. och i Förlin m.fl. med 50 procent avloppsvatten talar för att konventionellt renat avloppsvatten medför en högre LSI i regnbåge jämfört med fisk exponerad för kontrollvatten. När regnbåge exponerades för 17 procent avloppsvatten i Förlin m.fl. var resultatet inkonklusivt då intervallestimatet överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), se figur 14.



Figur 14: standardiserad medelvärdesskillnad, LSI, konfidensintervall 95%

Om resultaten från Cuklev m.fl., som exponerat fiskarna för 100% avloppsvatten, vägs samman med gruppen av fiskar som exponerats för 50% avloppsvatten i Förlin m.fl. i en metaanalys så blir LSI högre för de fiskar som exponerades för konventionellt renat avloppsvatten jämfört med kontrollvatten. Denna skillnad är statistiskt säkerställd vilket visar sig i att ett intervallestimat på 95 procent (0.66, 1.82) inte överlappar mittlinjen, se figur 15.



Figur 15: standardiserad medelvärdesskillnad, LSI, konfidensintervall 95%

Sammantaget finns det ett stöd för att fisk exponerad för konventionellt renat avloppsvatten påverkas av östrogena substanser i avloppsvattnet, med ökade nivåer av vitellogenin-protein, vitellogenin-mRNA och LSI. Det som gör att underlaget försvagas är att de enskilda resultaten baseras på få studier.

Störning av reproduktionshormoner, reproduktion, beteende och tillväxt (zebrafisk)

Pohl m.fl. (2018) [50], Akande m.fl. (2010) [1] och Lundström m.fl. (2010) [40] analyserade reproduktionsrelaterade variabler i zebrafisk efter exponering för konventionell renat avloppsvatten och kontrollvatten.

Pohl m.fl. [50] analyserade reproduktionsrelaterade variabler, såsom äggproduktion och antalet befruktade ägg, efter exponering för konventionellt renat avloppsvatten från Knivsta reningsverk i Uppsala. Kontrollvatten utgjorde referensalternativ. Inga statistiskt säkerställda skillnader observerades mellan exponeringsgrupperna.

Akande m.fl. [1] observerade överlag små effekter på reproduktionsrelaterade variabler i vuxna zebrafiskar (hanar och honor), även om vissa statistiskt säkerställda skillnader avseende lekframgång, observerades vid exponering för konventionellt renat avloppsvatten från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm jämfört med kontrollvatten. Dock observerades ingen skillnad på antalet ägg mellan grupperna. Tillförlitligheten för utfallen i denna artikel bedömdes som låg, se bilaga F.

Lundström m.fl. [40] observerade en statistiskt säkerställd negativ effekt på kläckningstid i zebrafiskembryon exponerade för konventionellt renat avloppsvatten från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm (≥75 procent inblandning; utan och med sandfilter) i jämförelse med zebrafiskembryon exponerade för kontrollvatten.

Sammantaget visar dessa studier, som uteslutande utförts på zebrafisk, inte på någon tydlig påverkan av konventionellt renat avloppsvatten på reproduktionsrelaterade variabler såsom reproduktion, beteende och tillväxt.

Indikation på exponering för toxiska substanser – dioxiner (regnbåge, zebrafisk)

För att mäta dioxinliknande effekter i fisk används biomarkörer som indikerar att en exponering av toxiska substanser har skett. Till denna grupp av biomarkörer hör CYP1A1 och leversomatiskt index (LSI). Effekterna utlöses av plana organiska molekyler, till exempel polyklorerade dibenso-*p*-dioxiner och -furaner (samlingsnamn ”dioxiner”), dioxin-lika PCBer och PAH:er (polyaromatiska kolväten).

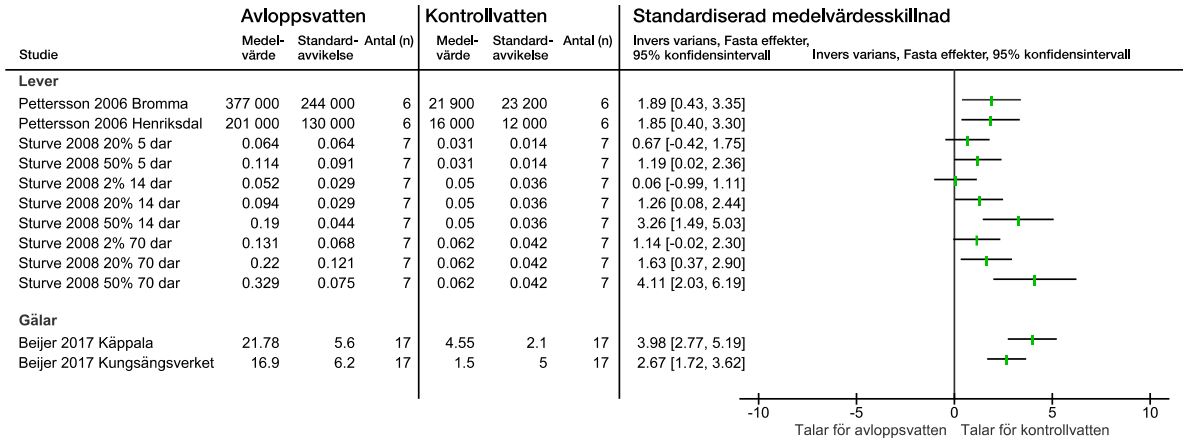
EROD är ett mått på aktivitet av CYP1A1 – ett avgiftningsenzym som aktiveras i fisk som exponeras för vissa stabila organiska ämnen, som till exempel dioxiner och PAH:er (polyaromatiska kolväten).

Leversomatiskt index (LSI) mäts i levervikt per kroppsvikt och är ett grovt mått på hur fisken kan ha påverkats av exponeringen för toxiska substanser då leverns storlek och funktion kan ha ändrats.

CYP1A1 enzymaktivitet (EROD)

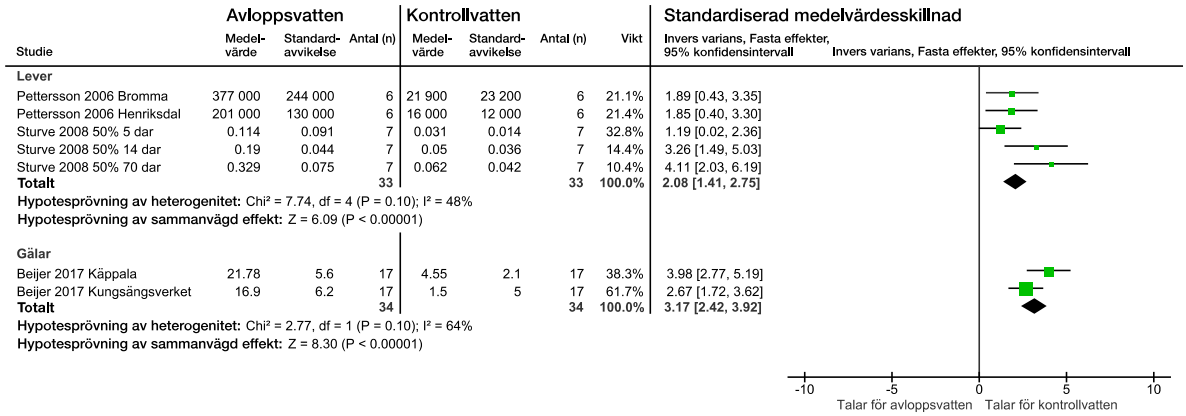
Beijer m.fl. (2017) [8], Pettersson m.fl. (2006) [48] och Sturve m.fl. (2008) [58] analyserade EROD (CYP1A1-enzymaktivitet) i gälar [8] och lever [48, 58] i regnbåge. Dessförinnan hade fiskarna exponerat för 100 procent konventionellt renat avloppsvatten från Käppala reningsverk på Lidingö och Kungsängsverket i Uppsala [8], Bromma och Henriksdals reningsverk i Stockholm [48]. Sturve m.fl. [58] exponerade fiskarna för olika koncentrationer (2, 20 eller 50 procent) av avloppsvatten från Ryaverken i Göteborg och över olika tid (fem, 14 eller 70 dagar). Kontrollvatten utgjorde referensalternativ.

Resultaten som redovisas i Beijer m.fl. talar för att konventionellt renat avloppsvatten medför en högre CYP1A1-enzymaktivitet i gälar i regnbåge jämfört med kontrollvatten, se figur 16. Resultaten som redovisas i Pettersson m.fl. samt de högre koncentrationerna och längre exponeringstiderna i Sturve m.fl. talar också för att konventionellt renat avloppsvatten medför en högre CYP1A1-enzymaktiviteten i lever i regnbåge jämfört med kontrollvatten. Resultaten i Sturve m.fl. med kortare exponeringstid (5 dagar, 20 procent avloppsvatten) och lägre koncentrationer (2 procent avloppsvatten) var inkonklusiva då intervallestimaten överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), se figur 16.



Figur 16: standardiserad medelvärdesskillnad, CYP1A1 enzymaktivitet (EROD), konfidensintervall 95%

När resultaten från Petterson m.fl (100 procent avloppsvatten) vägs samman med resultaten från de fiskar som exponerats för 50 procent avloppsvatten från Sturve m.fl. så blir CYP1A1-enzymaktiviteten högre i regnbåge som exponerats för konventionellt renat avloppsvatten jämfört med kontrollvatten. Högre enzymaktivitet ses även i gälar i Beijer m.fl. Denna skillnad är statistiskt säkerställd vilket visar sig i att de sammanvägda intervallestimaten på 95 procent inte överlappar mittlinjen (1.41, 2.75) respektive (2.42, 3.92), se figur 17.

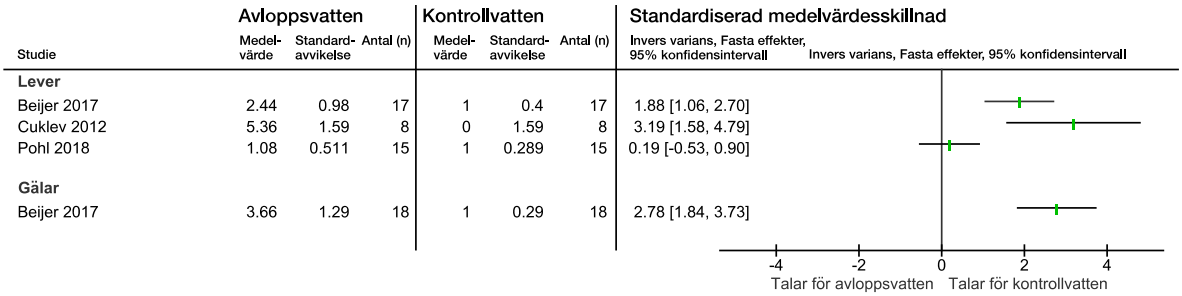


Figur 17: standardiserad medelvärdesskillnad, CYP1A1 enzymaktivitet (EROD), konfidensintervall 95%

CYP1A1-mRNA

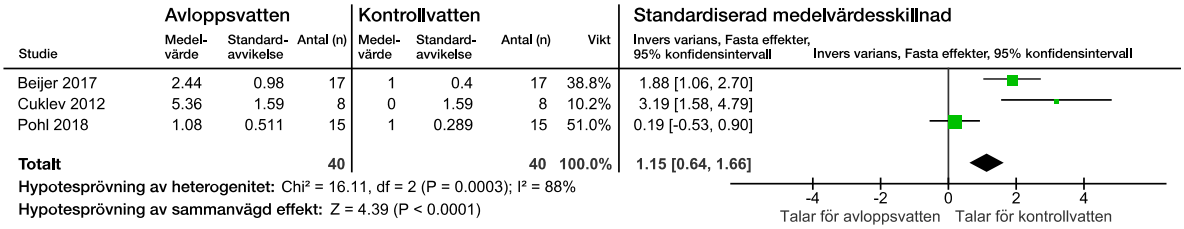
Beijer m.fl. (2017) [8], Cuklev m.fl. (2012) [20] och Pohl m.fl. (2018) [50] analyserade mRNA-nivåer av CYP1A1, det vill säga transskript som behövs för att producera CYP1A1 enzym. Dessa nivåer analyserades i lever [8, 20, 50] och gälar [8] i regnbåge [8, 20] och zebrafisk [50]. Dessförinnan hade fiskarna exponerats för konventionellt renat avloppsvatten från Käppala reningsverk på Lidingö, Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm respektive Knivsta reningsverk i Uppsala. Kontrollvatten utgjorde referensalternativ.

Resultaten i Beijer m.fl. och Cuklev m.fl. talar för att konventionellt renat avloppsvatten aktiverar produktion av CYP1A1-mRNA i jämförelse med kontrollvatten i både lever och gälar i regnbåge. Resultaten från Pohl m.fl. är inkonklusiva då intervallestimatet överlappar mittlinjen, se figur 18.



Figur 18: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå CYP1A1, konfidensintervall 95%

Vid sammanvägning av resultaten för lever så blir CYP1A1-mRNA nivåerna högre för de fiskar som exponerats för konventionellt renat avloppsvatten jämfört med kontrollvatten. Denna skillnad är statistiskt säkerställd vilket visar sig i att det sammanvägda intervallestimatet på 95 procent (0.64, 1.66) inte överlappar mittlinjen, se figur 19.



Figur 19: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå CYP1A, konfidensintervall 95%

Leversomatiskt index (LSI)

Se Figur 14 och 15.

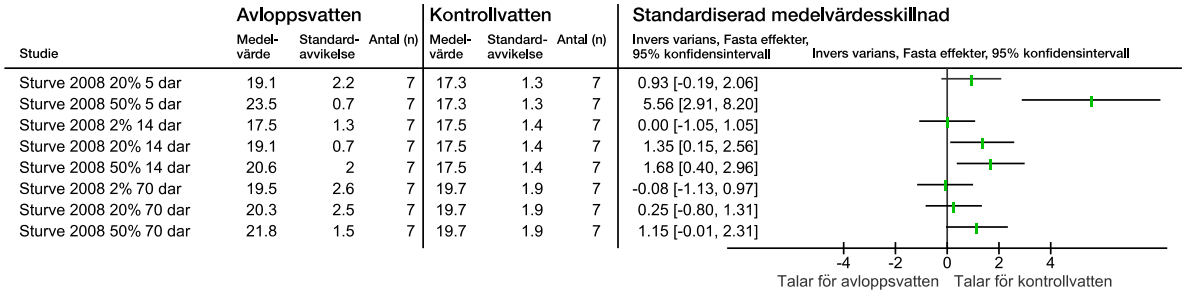
Sammantaget finns det ett stöd för att fisk exponerad för konventionellt renat avloppsvatten påverkats av toxiska substanser med ökad CYP1A1-enzymaktivitet (EROD), CYP1A1-mRNA och LSI.

Oxidativ stress och påverkan på ”avgiftningssystem” (regnbåge)

Inom denna grupp ingår exempelvis enzymer som är centrala för att skydda mot oxidativ stress (produktion av reaktiva syreföreningar som skadar celler eller organ) som enzymerna glutathione reductase (GR) och glutathione S-transferease (GST).

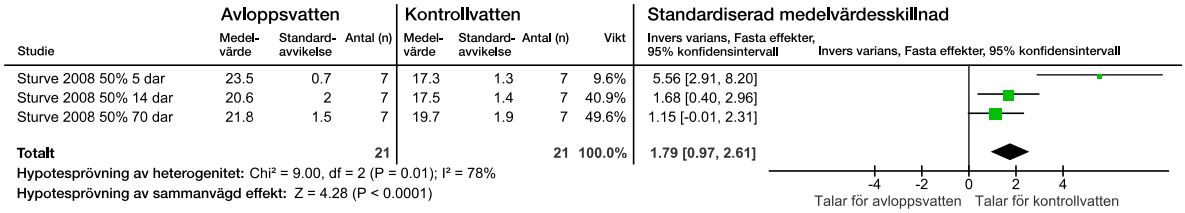
Sturve m.fl. (2008) [58] analyserade enzymaktivitet av glutathione reductase (GR) och glutathione S-transferease (GST) i lever i regnbåge. Dessförinnan hade fiskarna exponerats för konventionellt renat avloppsvatten från Ryaverken i Göteborg i olika koncentrationer (2, 20 eller 50 procent) och över olika tid (fem, 14 eller 70 dagar). Kontrollvatten utgjorde referensalternativ.

Resultaten i Sturve m.fl. talar för att konventionellt renat avloppsvatten medför en högre enzymaktivitet av GR jämfört med kontrollvatten, framförallt med hög koncentration av avloppsvatten, medan andra jämförelser var inkonklusiva då intervallestimaten överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), se figur 20.



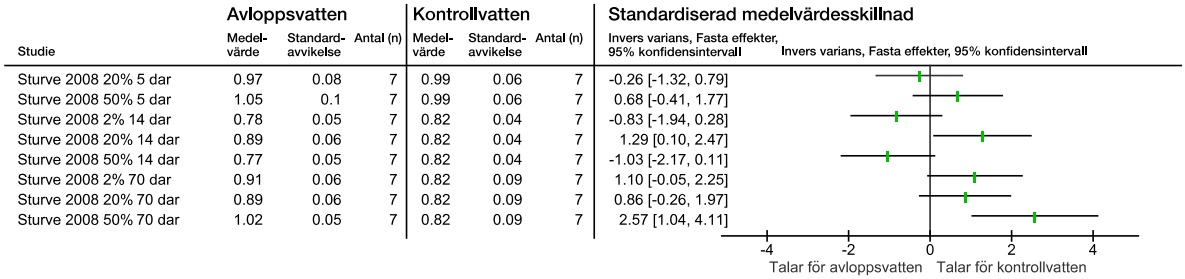
Figur 20: standardiserad medelvärdesskillnad, enzym-aktivitet glutathione reductase (GR), konfidensintervall 95%

När resultaten vägs samman från grupperna exponerade för 50 procent avloppsvatten så blir enzymaktivitet av GR högre i regnbåge exponerad för konventionellt renat avloppsvatten jämfört med kontrollvatten. Denna skillnad är statistiskt säkerställd vilket visar sig i att det sammanvägda intervallestimatet på 95 procent (0.97, 2.61) inte överlappar mittlinjen, se figur 21.



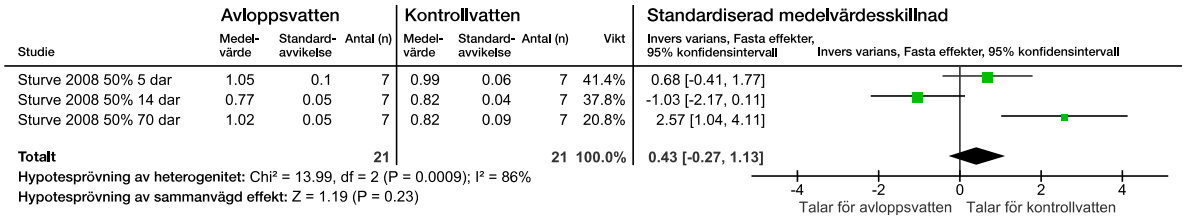
Figur 21: standardiserad medelvärdesskillnad, enzym-aktivitet glutathione reductase (GR), konfidensintervall 95%

För GST är de flesta jämförelser inkonklusiva då intervallestimaten överlappar mittlinjen, se figur 22.



Figur 22: standardiserad medelvärdesskillnad, enzym-aktivitet glutathione S-transferease (GST), konfidensintervall 95%

Vid en sammanvägning med resultaten med 50 procent avloppsvatten blir det ingen statistiskt säkerställd skillnad mellan exponeringsalternativen vilket visar sig i att det sammanvägda intervallestimatet på 95 procent överlappar mittlinjen (-0.27, 1.13) (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), se figur 23.



Figur 23: standardiserad medelvärdesskillnad, enzym-aktivitet glutathione S-transferease (GST), konfidensintervall 95%

Förlin m.fl. (1982) [23] observerade statistiskt säkerställda effekter på flera delar av MFO-systemet, (mixed-function oxidase), en grupp av enzymer som snabbar på oxidation, i fiskar som exponerats för konventionellt renat avloppsvatten i jämförelse med fiskar i kontrollvatten (bl.a. detekterades en ökning av PNA-O-demethylase och BP-hydroxylase aktivitet och minskad aktivitet av EM-N-demethylase).

Sammantaget finns det ett visst stöd för att konventionellt renat avloppsvatten innehåller substanser som leder till oxidativ stress har skett, med ökad enzymaktivitet av glutathione reductase (GR) hos regnbåge. Det som försvagar underlaget är att det baseras på en studie.

Burstudier i fält

I sju artiklar [3-6, 31, 36, 61] har regnbåge placerats ut i burar nedströms avloppsreningsverk. Som referensalternativ har regnbåge placerats ut i burar uppströms reningsverk eller längre nedströms reningsverk.

Indikation på östrogenexponering (regnbåge)

Larsson m.fl. [36] analyserade vitellogenin-protein i regnbåge nedströms Gråbo reningsverk i Göteborg. Som referensalternativ placerades burar med regnbåge uppströms reningsverket. Statistiskt säkerställt högre nivåer av vitellogenin-protein i regnbåge detekterades i fisk nedströms reningsverket jämfört med regnbåge uppströms reningsverket.

Svensson m.fl. [61] studerade östrogenaktivitet i flertalet kommunala och industriella avloppsvatten. Vitellogenin-proteinnivåer studerades i plasma i juvenila regnbågar, antingen i burförsök i fält eller i akvarium med avloppsvatten från reningsverken. Ökade vitellogeninhalter i plasma detekterades, såväl i bur- som akvarieförsök, efter exponering av konventionellt renat avloppsvatten i nästan samtliga fall. Dock saknas relevanta statistiska jämförelser, men det är tydligt att de östrogenlika responserna, om än varierande mellan olika reningsverk, är påtagliga i avloppsvatten från kommunala reningsverk men inte alls lika påtagliga i avloppsvatten från industriella verksamheter.

Störning av reproduktionshormoner, reproduktion, beteende och tillväxt (regnbåge)

Albertsson m.fl. (2007) [3] analyserade förändringar i protein- och gen-uttryck i regnbåge uppströms (referensvatten) och nedströms Gråbo reningsverk i Göteborg. Studien fokuserade främst på gener (CR/2013-HSD) och proteiner som är centrala för gonadutveckling (utveckling av äggstockar och testiklar) i mognande regnbågar. I studien detekterades en statistiskt säkerställd ökning av CR/2013-HSD mRNA nedströms reningsverket i jämförelse med fiskar från referensvattnet. Tillförlitligheten för utfallen i denna artikel bedömdes som låg, se bilaga F.

I en uppföljande studie av Albertsson m.fl. (2010) [4] observerades en statistiskt säkerställd ökning av mRNA nivåerna av samma gener (både A och B-formerna av CR/2013-HSD) i regnbåge nedströms Gässlösa reningsverk i Borås jämfört med regnbåge i referensvatten (uppströms). Denna effekt sågs även i leverceller som exponerades för extrakt av avloppsvatten men inte i leverceller exponerade för referensvatten.

Indikation på exponering för toxiska substanser – dioxin (regnbåge)

Jönsson m.fl. (2010) [31] analyserade CYP1A1-mRNA i gälar och lever i regnbåge nedströms Kungsängsverket i Uppsala och i referensvatten (uppströms). Statistiskt säkerställt högre nivåer av CYP1A1-mRNA detekterades både i lever och gälar i regnbåge nedströms reningsverket jämfört med regnbåge i referensvatten. Tillförlitligheten för utfallen i denna artikel bedömdes som låg, se bilaga F.

Oxidativ stress och påverkan på ”avgiftningssystem” (regnbåge)

Carney Almroth m.fl. (2008) [5] analyserade regnbåge nedströms Gässlösa reningsverk i Borås. Ökade nivåer av oxidativa skador (skador relaterade till produktion av reaktiva syreföreningar) med ökade nivåer av protein karbonyl och lipidperoxidas observerades i regnbåge nedströms reningsverket jämfört med regnbåge i referensvatten. Regnbåge nedströms reningsverket uppvisade också ökade nivåer av antioxidanter som en del av försvaret mot reaktiva oxidanter. Inga statistiskt säkerställda skillnader detekterades avseende enzymerna glutathione reductase (GR) och glutathione S-transferase (GST).

I en uppföljande studie av Carney Almroth m.fl. 2008 [6] observerades ökade nivåer av oxidativa skador i regnbåge nedströms Gässlösa reningsverk i Borås jämfört med regnbågsfisk uppströms och längre nedströms reningsverket.

Sammantaget finns det ett visst stöd för att fiskar placerade nedströms reningsverk har exponerats för östrogen eftersom gener och proteiner som är viktiga för könskörtelutveckling är påverkade. Fiskar placerade nedströms reningsverk uppvisar också fler tecken på oxidativ stress.

Fältprover

I fyra studier [39, 46, 47, 49] har abborre och spigg fångats i sjöar och vattendrag nedströms reningsverk. Dessa fiskar har jämförts mot fiskar från andra sjöar eller vattendrag som anses opåverkade av denna typ av föroreningar (referensvatten).

Indikation på exponering för östrogen (abborre)

Linderoth m.fl. (2006) [39], Noaksson m.fl. (2005) [46] och Noaksson m.fl. (2005) [47] analyserade leversomatiskt index (LSI) och gonadosomatiskt index (GSI) i sexuellt mogna (SM) och sexuellt omogna (SIM) abborrar uppfiskade utanför reningsverken Fornby vid Siljan, Tiken vid Tingsryd och Skinnskatteberg vid Nedre Vättern under olika delar av året och i Stockholm på hösten. Detta jämfördes mot fiskar från referensvatten.

Inga statistiskt säkerställda skillnader observerades på LSI i dessa studier.

När resultaten för GSI vägs samman i en metaanalys så talar det för att sexuellt mogna honor utanför reningsverken har ett lägre GSI i jämförelse med fiskar från referensvatten, se bilaga H,

figur 1. Denna skillnad är statistiskt säkerställd vilket visar sig i att det sammanvägda intervallestimatet på 95 procent inte överlappar mittlinjen (-0.68, -0.34).

Tillförlitligheten för utfallen i Linderoth m.fl. (2006) [39] bedömdes som låg, se bilaga F. Om känslighetsanalys genomförs och resultatet från Linderoth m.fl. tas bort från metaanalysen är skillnaden på GSI fortfarande statistiskt säkerställd (-0.55, -0.14), se bilaga H figur 2, med lägre GSI i fisk utanför reningsverken jämfört med fisk från referensvatten.

Störning av reproduktionssteroider, reproduktion, beteende och tillväxt (abborre, spigg)

Noaksson m.fl. [46, 47] har i två studier fiskat abborre utanför reningsverken Fornby vid Siljan, Tiken vid Tingsryd och Skinnskatteberg vid Nedre Vättern under olika delar av året. I dessa fiskar har de undersökt nivåer av hormonerna östradiol, testosteron och 17alfahydroxyprogesteron i sexuellt mogna och omogna fiskar. Inga statistiskt säkerställda skillnader kunde detekteras mellan abborrar som simmar utanför reningsverk jämfört med abborrar från referensvatten.

Petterson m.fl. [49] analyserade östradiol och testosteron i abborre och spigg i några få enstaka fiskar fångade utanför Utansjö reningsverk i Härnösand, i Kristianstad och i referensvatten. Då antalet fiskar var så få kan inga slutsatser dras. Tillförlitligheten för utfallen i denna artikel bedömdes som låg, se bilaga F.

Indikation på exponering för toxiska substanser – dioxin (abborre)

Noaksson m.fl. [47] analyserade CYP1A1-enzymaktivitet i abborre utanför reningsverken Fornby vid Siljan, Tiken vid Tingsryd och Skinnskatteberg vid Nedre Vättern och i referensvatten. Inga statistiskt säkerställda skillnader detekterades mellan fiskar som simmar utanför reningsverken jämfört med fiskar från referensvatten.

Sammantaget finns det inget stöd för att viltfångade fiskar nedströms reningsverk är påverkade av avloppsvatten med undantag för lägre GSI i sexuellt mogna honor.

4.4 Effekter av ozonering som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten

I tio artiklar [1, 4, 8, 20, 25, 40, 41, 50, 54, 55] har man undersökt hur vattenlevande organismer påverkas av avloppsvatten som renats med ozonering som tillägg till konventionell rening. Samtliga studier har exponerat organismerna för de olika typerna av avloppsvatten på laboratorium.

Samtliga tre trofinivåer som normalt ingår i miljöriskbedömning av enskilda kemikalier och avloppsvatten finns representerade i detta kapitel:

- Primärproducenter (bakterier, alger)
- Primärkonsumenter (hoppkräftor) samt
- Sekundärkonsumeter (regnbåge, zebrafisk)

Resultat

1. Makroalgers tillväxt försämras med ozonering som tillägg.
2. Hoppkräftors populationstillväxt ökar med ozonering som tillägg.
3. Fler hoppkräftor når kräftstadium från larvstadium med ozonering som tillägg.
4. Fler hoppkräftor når sexuell mognad från larvstadium med ozonering som tillägg.
5. Fisk exponerad för avloppsvatten med ozonering som tillägg har en lägre produktion av vitellogenin-mRNA och en lägre LSI. Detta indikerar på en lägre östrogenexponering med ozonering som tillägg.
6. Fisk exponerad för avloppsvatten med ozonering som tillägg har lägre produktion av CYP1A-mRNA. Detta indikerar på en lägre exponering för toxiska substanser med ozonering som tillägg.

Inkonklusiva resultat

1. Det går inte att bedöma om ozonering som tillägg, jämfört med konventionell rening, påverkar bioluminiscens hos bakterier.
2. Det går inte att bedöma om ozonering som tillägg, jämfört med konventionell rening, påverkar tillväxten hos mikroalger.
3. Det går inte att bedöma om ozonering som tillägg, jämfört med konventionell rening, påverkar förändringen över tid från larvstadium (överlevande) till sexuell mognad hos hoppkräftor.
4. Det går inte att bedöma om ozonering som tillägg, jämfört med konventionell rening, medför en förändring av sländors fettsyrametabolism.

4.4.1 Effekter på organismer inom trofinivå primärproducenter

Bakterier har studerats med avseende på förmåga att omvandla energi till ljus som skickas ut från bakterien (inhibering av bioluminiscens) i Lundström m.fl. (2010) [40]. Hos mikro- och makro-alger har tillväxthämning undersökts. Exponeringsalternativen har varit avloppsvatten som genomgått konventionell rening (utan och med sandfilter) eller med ozonering som tillägg till den konventionella reningen. Avloppsvattnet har kommit från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm.

Bakterier och alger

Lundstrom m.fl. [40] observerade ingen inhibering av bakteriernas bioluminiscens oavsett hur hög koncentration av avloppsvatten som man exponerade bakterierna för. Detta gällde för såväl det konventionellt renade avloppsvattnet som för det avloppsvatten som behandlats med ozon som tillägg. Det observerades inte heller någon minskad tillväxt hos mikroalger efter exponering av de båda typerna av renat avloppsvatten. Då inga skillnader detekterades går det inte att avgöra om det ena behandlingsalternativet är bättre än det andra.

För makroalger innebar exponering av avloppsvatten som renats med ozonering som tillägg en försämrad tillväxt jämfört med konventionellt renat avloppsvatten. Man genomförde ingen direkt statistisk jämförelse men genom att jämföra respektive konfidensintervall, så kan man se att de inte överlappar varandra, se tabell 21. Lägre koncentration av ozonbehandlat avloppsvatten krävdes för tillväxthämningen vilket talar emot ozonering av avloppsvattnet.

Tabell 21: den exponeringskoncentration som krävs för en tillväxthämning hos makroalger på 10% respektive 50% (båda jämförelsealternativ inkluderar sandfilter)

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell rening 10%	22.8 till 46.1
Ozonering som tillägg 10%	3.8 till 14.8
Konventionell rening 50%	35.9 till 55.4
Ozonering som tillägg 50%	22.4 till 39.7

Sammantaget finns det ett visst stöd för att ozonering som tillägg fungerar sämre än endast konventionell rening vad gäller tillväxt hos makroalger. Det som gör att underlaget försvagas är att det endast baseras på en studie.

4.4.2 Effekter på organismer inom trofinivå primärkonsumenter

Hoppkräftor har studerats med avseende på tillväxt och dödlighet i en artikel (Lundström m.fl. 2010) [40]. I en annan artikel undersöktes hoppkräftor med avseende på populationstillväxt samt förändring över tid från ett utvecklingsstadium till ett annat (Lundström m.fl. 2010) [41]. I båda studierna användes konventionellt renat avloppsvatten och avloppsvatten med ozonering som tillägg till den konventionella reningen från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm. Bräckt vatten utgjorde referensalternativ. Exponeringen genomfördes i vattenbehållare på laboratorium.

Sländor har studerat i en artikel med avseende på ämnesomsättning i Späth m.fl. (2020) [55] under exponering av konventionellt renat avloppsvatten och med ozonering som tillägg från reningsverket i Umeå. Kontrollvatten utgjorde referensalternativ och experimenten utfördes på laboratorium.

Hoppkräftor

Utvecklingshämning (LDR)

Vid test av utvecklingshämning (LDR), efter exponering av konventionellt renat avloppsvatten eller med ozonering som tillägg, var i stort sett alla sexuellt omogna hoppkräftor döda efter sex dagar med en koncentration på avloppsvattnet på 100 procent (Lundström m.fl. 2010) [40]. Vid utspädning av de båda typerna av avloppsvatten så skilde sig utvecklingen hos hoppkräftorna inte åt i jämförelse med referensexponeringen bestående av bräckt vatten. Det går därför inte avgöra om konventionellt renat avloppsvatten eller med ozonering som tillägg är bättre än det andra.

Populationstillväxt

I den andra artikeln (Lundström m.fl. 2010) [41] undersökte man populationstillväxt med hjälp av en stadiestrukturerad matrismodell för geometrisk tillväxt och tillväxtkvoten (λ). Inga statistiskt direkta jämförelser gjordes med avseende på konventionellt renat avloppsvatten och ozonering som tillägg. Men genom att titta på konfidensgränserna kan vissa slutsatser dras.

Man kan konstatera att i endast ett fall överlappar inte de två respektive konfidensgränserna varandra, nämligen vid en koncentration på 75 procent avseende konventionellt renat avloppsvatten respektive ozon (5 mg/l) som tillägg. För konventionell rening ligger det 95-procentiga intervallestimatet mellan 0.30 och 1.14 medan motsvarande för den lägre dosen av ozonering som tillägg ligger mellan 1.22 och 1.65, se tabell 22.

Eftersom en kvot över 1.0 tyder på en ökad tillväxt över tid, så talar detta resultat för ozonering som tillägg, med en ökad tillväxt av hoppkräfta efter exponering av avloppsvatten med ozonering som tillägg. Men eftersom det rör sig om en indirekt jämförelse, så bör resultatet betraktas som mycket osäkert.

Tabell 22: Populationstillväxt som lambda

Behandling	**Konfidensgränser 95%**
Konventionell 3%	1.32 till 1.98
Ozon (5 mg/l) 3%	1.51 till 1.96
Ozon (15 mg/l) 3%	1.46 till 1.86
Konventionell 15%	1.36 till 1.93
Ozon (5 mg/l) 15%	1.56 till 1.95
Ozon (15 mg/l) 15%	1.44 till 1.86
Konventionell 75%	0.30 till 1.14
Ozon (5 mg/l) 75%	1.22 till 1.65
Ozon (15 mg/l) 75%	1.10 till 1.55

Hoppkräftornas utveckling från ett stadium till ett annat

I samma artikel (Lundström m.fl. 2010) [41] undersöktes hoppkräftornas utveckling från ett stadium till ett annat med hjälp av hazardkvoter. En kvot över 1.0 tyder på en ökad tillväxt över tid medan en kvot under 1.0 indikerar en krympande population. Man analyserade dessutom larvstadium (överlevande) till sexuell mognad med samma metod. De statistiska jämförelserna gjordes uteslutande mot det bräckta vattnet. Detta innebär att konventionell rening endast jämförts indirekt mot ozonering som tillägg.

När det gäller utveckling från larvstadium till kräftstadium så medför ozonering som tillägg (både 5 och 15 mg/l) att fler når kräftstadium i jämförelse mot konventionellt renat avloppsvatten när exponering sker med koncentrationer på 15 eller 75 procent. Denna slutsats kan dras eftersom konfidensintervallen inte överlappar varandra i dessa fall, se tabell 23.

Resultatet är emellertid osäkert då det rör sig om en indirekt jämförelse, samt att det endast är en studie.

Tabell 23: Hazardkvot från larvstadium till kräftstadium – ozonering som tillägg samt konventionell behandling jämfört med bräckt vatten

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 3%	0.74 till 1.44
Ozon (5 mg/l) 3%	0.95 till 1.94
Ozon (15 mg/l) 3%	1.21 till 2.46
Konventionell 15%	0.67 till 1.33
Ozon (5 mg/l) 15%	1.78 till 3.86
Ozon (15 mg/l) 15%	2.05 till 4.23
Konventionell 75%	0.78 till 1.55
Ozon (5 mg/l) 75%	1.89 till 3.91
Ozon (15 mg/l) 75%	1.87 till 3.88

Vid utveckling från larvstadium till det stadium där kräftorna är sexuellt mogna så medför ozonering som tillägg att fler blir sexuellt mogna jämfört med konventionell rening. Detta observeras vid exponering av samtliga koncentrationer (3, 15 eller 75 procent) av avloppsvattnet, eftersom konfidensintervallen inte överlappar varandra, se tabell 24.

Resultatet är emellertid osäkert då det rör sig om en indirekt jämförelse, samt att det endast är en studie.

Tabell 24: Hazardkvot från larvstadium till sexuell mognad – ozonering som tilläggsbehandling samt konventionell rening jämfört med bräckt vatten

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 3%	0.39 till 0.80
Ozon (5 mg/l) 3%	1.21 till 2.55
Ozon (15 mg/l) 3%	1.27 till 2.66
Konventionell 15%	0.36 till 0.77
Ozon (5 mg/l) 15%	1.87 till 3.96
Ozon (15 mg/l) 15%	2.15 till 4.62
Konventionell 75%	0.33 till 0.71
Ozon (5 mg/l) 75%	1.51 till 3.21
Ozon (15 mg/l) 75%	1.49 till 3.12

I tabell 25 redovisas intervallestimaten avseende hazardkvoter för förändring från överlevande från larvstadium till sexuell mognad. I detta fall går det inte att bedöma om något exponeringsalternativ är bättre eller sämre än det andra då samtliga konfidensintervall överlappar varandra. Resultaten är därmed inkonklusiva eftersom det inte går att dra några slutsatser.

Tabell 25: överlevande från larvstadium till sexuell mognad – ozonering som tilläggsbehandling och konventionell rening jämfört med bräckt vatten

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 3%	0.79 till 5.64
Ozon (5 mg/l) 3%	0.76 till 4.14
Ozon (15 mg/l) 3%	0.31 till 2.18
Konventionell 15%	0.99 till 6.73
Ozon (5 mg/l) 15%	0.57 till 3.71
Ozon (15 mg/l) 15%	0.28 till 2.20
Konventionell 75%	1.44 till 9.06
Ozon (5 mg/l) 75%	0.91 till 4.96
Ozon (15 mg/l) 75%	0.54 till 3.03

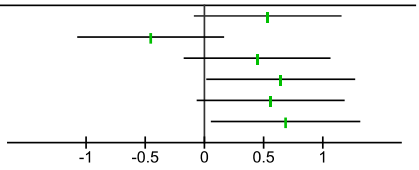
Sammantaget finns det ett visst stöd för att ozonering som tillägg fungerar bättre än endast konventionellt renat avloppsvatten vad gäller populationstillväxt och utveckling (till nästa stadium) hos hoppkräftor. Det som gör att underlaget försvagas är att det endast baseras på en studie.

Sländor

Späth m.fl. (2020) [55] analyserade fettsyra-metabolism (ämnesomsättning) i sländlarver. För detta ändamål användes konventionellt renat avloppsvatten och med ozonering som tillägg från reningsverket i Umeå. Referensalternativ utgjorde kontrollvatten och experimenten utfördes på laboratorium.

Inga skillnader avseende koncentration av fettsyror i sländor observerades mellan behandlingsalternativen då intervallestimaten överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen) med undantag för 9-HOTrE där en statistiskt säkerställd högre koncentration observerades vid exponering av avloppsvatten behandlat med ozonering som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten, se figur 24.

	Tillägg ozonering			Konventionell rening			Standardiserad medelvärdesskillnad
Utfall	Medel-värde	Standard-avvikelse	Antal (n)	Medel-värde	Standard-avvikelse	Antal (n)	Invers varians, Fasta effekter, 95% konfidensintervall
13-HOTrE	0.83	0.189	21	0.731	0.174	21	0.53 [-0.08, 1.15]
14,15-DiHETE	0.815	0.263	21	0.951	0.322	21	-0.45 [-1.07, 0.16]
9,10,13-TriHOME	0.735	0.102	21	0.684	0.122	21	0.44 [-0.17, 1.06]
9,12,13-TriHOME	0.82	0.143	21	0.708	0.194	21	0.64 [0.02, 1.27]
9-HODE	0.81	0.118	21	0.734	0.147	21	0.56 [-0.06, 1.18]
9-HOTrE	0.857	0.219	21	0.725	0.153	21	0.69 [0.06, 1.31]



Figur 24: standardiserad medelvärdesskillnad, fettsyrakoncentration, konfidensintervall 95%

4.4.3 Effekter på organismer inom trofinivå sekundärkonsumenter

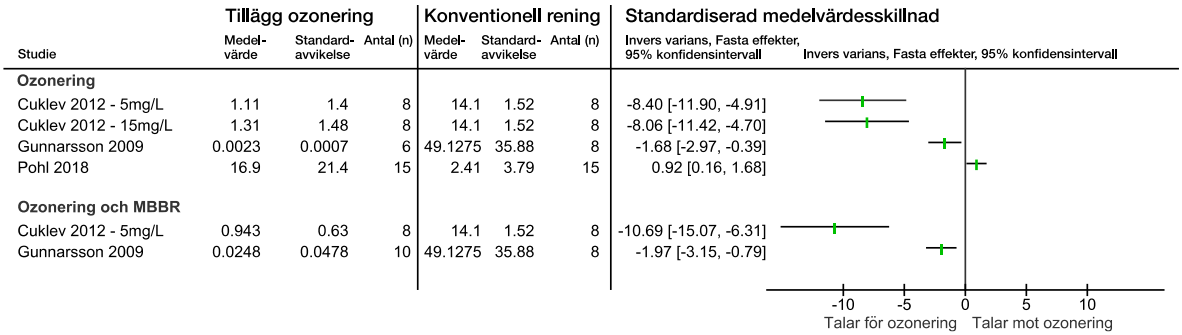
Indikation på östrogen exponering (regnbåge, zebrafisk)

Vitellogenin-mRNA

Cuklev m.fl. (2012) [20], Gunnarsson m.fl. (2009) [25] och Pohl m.fl. (2018) [50] analyserade mRNA nivåer av vitellogenin i regnbåge [20, 25] respektive zebrafisk [50]. Dessförinnan exponerades fiskarna för konventionellt renat avloppsvatten eller avloppsvatten med ozonering som tillägg från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm [20, 25] respektive Knivsta reningsverk i Uppsala [50].

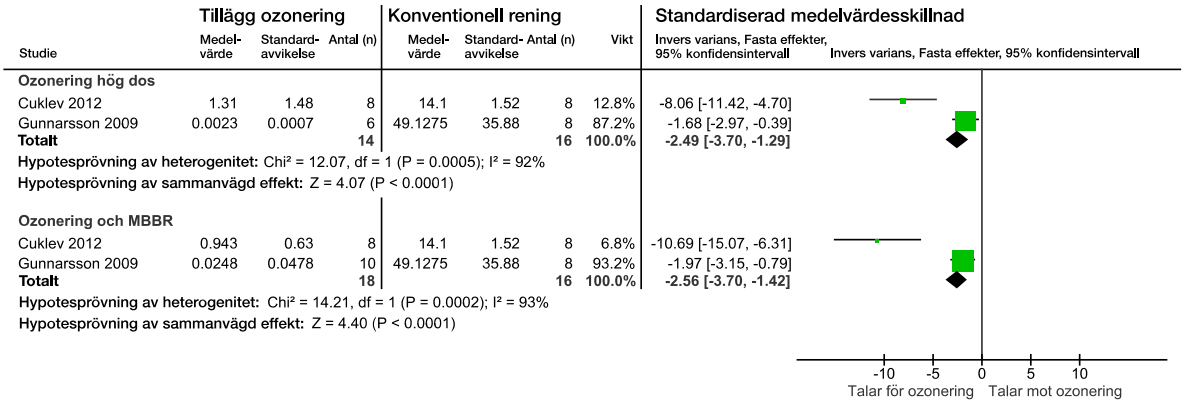
Cuklev m.fl. (2012) [20] exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med olika doser av ozonering (5 och 15 mg/L) och ozonering (5 mg/L) tillsammans med MBBR. Gunnarsson m.fl. (2009) [25] exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med ozonering (15 mg/L) och ozonering (15 mg/L) tillsammans med MBBR. Pohl m.fl. (2018) [50] exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med 7 mg/L ozonering.

Resultaten som redovisas i Cuklev m.fl. och Gunnarsson m.fl. talar för ozonering som tilläggsalternativ. Resultaten från Pohl m.fl. talar mot ozonering som tilläggsalternativ, se figur 25.



Figur 25: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå vitellogenin, konfidensintervall 95%

Vid sammanvägning av resultaten för grupperna exponerade för avloppsvatten behandlat med hög ozondos (15 mg/L) och i kombination med MBBR blir mRNA-nivåer av vitellogenin lägre jämfört med fiskar exponerade för konventionellt renat avloppsvatten. Denna skillnad är statistiskt säkerställd vilket visar sig i att de båda sammanvägda intervallestimaten på 95 procent inte överlappar mittlinjen (- 3.7, - 1.29) respektive (- 3.7, - 1.42), se figur 26.



Figur 26: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå vitellogenin, konfidensintervall 95%

Rådata erhållen från Pohl m.fl. [50] visar att tillförlitligheten är låg gällande resultatet för gruppen exponerad för ozonering som tillägg. En sammanvägning av resultaten från den lägre ozoneringsdosen (5–7 mg/L) genomförs således inte.

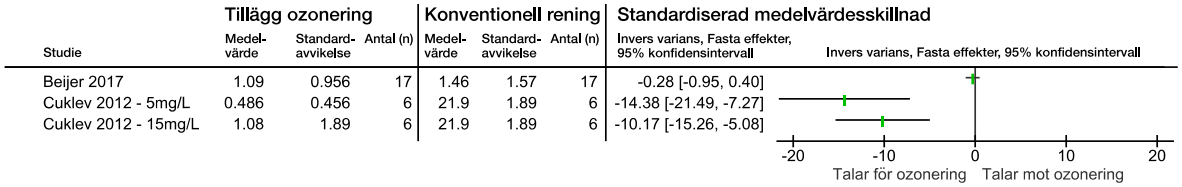
ZP-mRNA

Beijer m.fl. (2017) [8], Cuklev m.fl. (2012) [20] och Gunnarson m.fl. (2009) [25] analyserade mRNA nivåer av ZP 1–3 i regnbåge. Dessförinnan hade fiskarna exponerats för konventionellt renat avloppsvatten eller avloppsvatten med ozonering som tillägg från Käppala reningsverk på Lidingö [8] respektive Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm [20, 25].

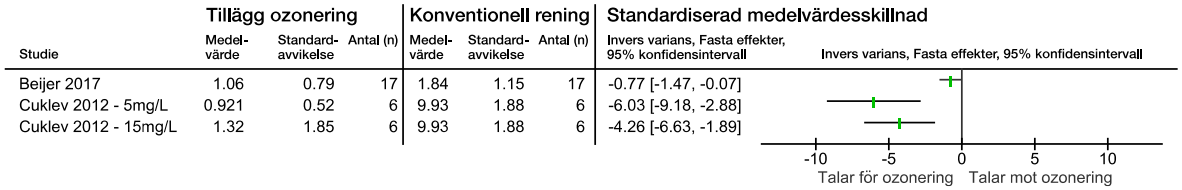
Cuklev m.fl. exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med olika doser av ozon (5 och 15 mg/L). Beijer m.fl. exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med ett sandfilter efter ozoneringsteget och Gunnarson m.fl. för avloppsvatten behandlat med ett sandfilter före ozoneringsteget.

Resultaten i Cuklev m.fl. och Gunnarsson m.fl. talar för ozonering som tilläggsalternativ. Resultaten från Beijer m.fl. är inkonklusiva då intervallestimaten överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), vilket kan bero på en för kort exponeringstid (fyra dagar) för ZP aktivering, se figur 27–29.

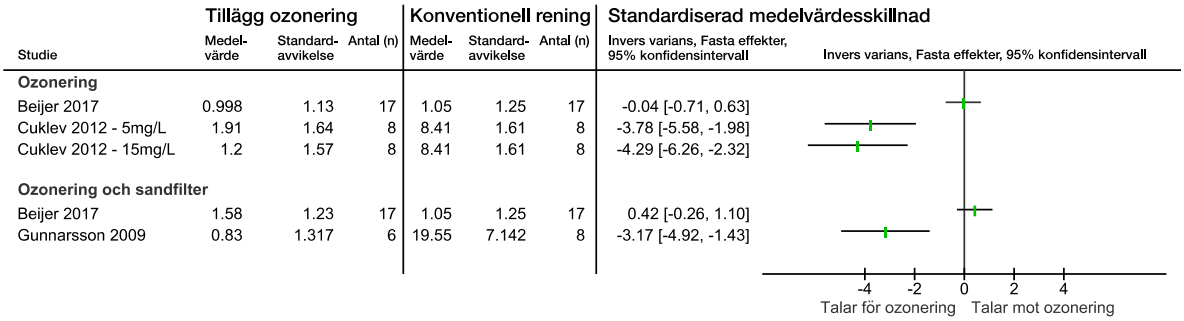
Tillförlitligheten till resultatet i Beijer m.fl. bedöms som låg på grund av kort exponeringstid och en sammanvägning av resultaten genomförs således inte.



Figur 27: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå ZP1, konfidensintervall 95%



Figur 28: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå ZP2, konfidensintervall 95%



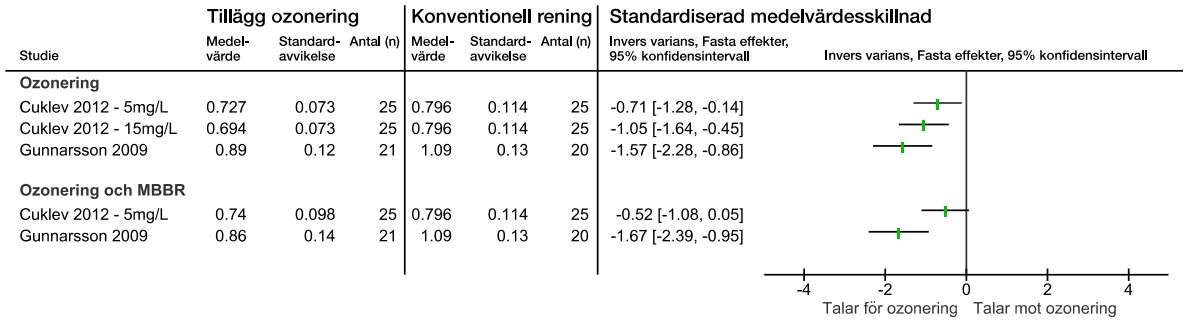
Figur 29: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå ZP3, konfidensintervall 95%

Leversomatiskt index (LSI)

Cuklev m.fl. (2012) [20] och Gunnarsson (2009) [25] analyserade leversomatiskt index (LSI) i regnbåge efter exponering för avloppsvatten från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm.

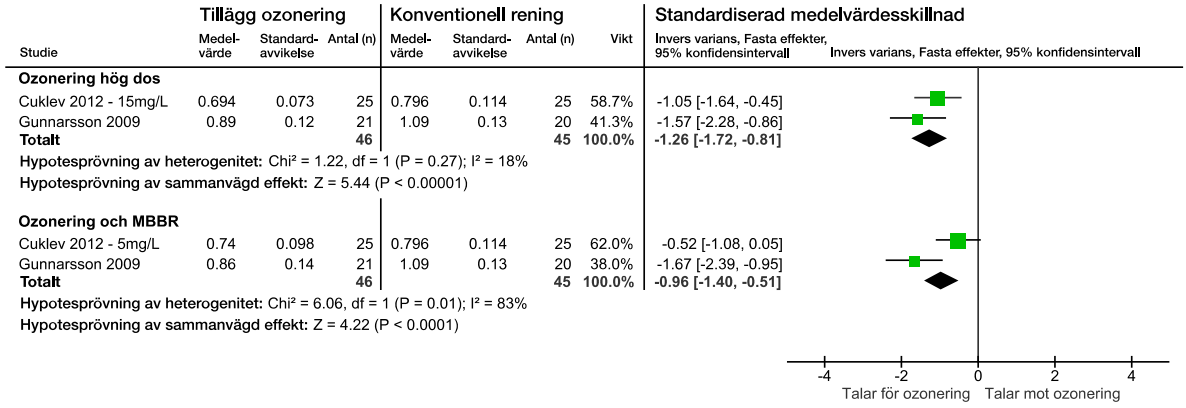
Cuklev m.fl. (2012) [20] exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med olika doser av ozonering (5 och 15 mg/L) och ozonering (5 mg/L) tillsammans med MBBR. Gunnarsson m.fl. (2009) [25] exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med ozonering (15 mg/L) och ozonering (15 mg/L) tillsammans med MBBR.

Resultaten i Gunnarsson m.fl. och Cuklev m.fl. (med undantag för ozonering + MMBR) talar för ozonering som tilläggsbehandling, se figur 30.



Figur 30: standardiserad medelvärdesskillnad, LSI, konfidensintervall 95%

Vid sammanvägning av resultaten för den högre dosen av ozon (15 mg/L) och i kombination med MBBR blir LSI lägre för fisk exponerad för avloppsvatten med ozonering som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten. Denna skillnad är statistiskt säkerställd vilket visar sig i att de båda sammanvägda intervallestimaten på 95 procent inte överlappar mittlinjen (- 1.72, - 0.81) respektive (- 1.40, - 0.51), se figur 31.



Figur 31: standardiserad medelvärdesskillnad, LSI, konfidensintervall 95%

Sammantaget finns det stöd för att ozonering som tillägg medför en lägre nivå av vitellogenin mRNA och LSI hos regnbåge jämfört med exponering för konventionellt renat avloppsvatten. Detta indikerar att avloppsvatten renat med ozonering som tillägg medför minskad exponering av östrogen.

Störning av reproduktionshormoner, reproduktion, beteende och tillväxt (zebrafisk)

Albertsson m.fl. [4], Pohl m.fl. [50], Akande m.fl. [1] och Lundström m.fl. [40] analyserade reproduktionsrelaterade variabler i zebrafisk efter exponering för konventionell renat avloppsvatten och med ozonering som tillägg.

Albertsson m.fl. [4] observerade minskade nivåer av mRNA nivåer från gener som bl.a. är centrala för könskörtelutveckling (både A och B-formerna av CR/2013-HSD) med avloppsvatten som behandlats med ozonering enbart eller i kombination med MBBR. Detta observerades i lever i regnbåge i jämförelse med konventionellt renat avloppsvatten från Henriksdals reningsverk i Stockholm. Denna skillnad var statistiskt säkerställd.

Pohl m.fl. [50] observerade en statistiskt säkerställd förbättrad fekunditet (fortplantningskapacitet) i form av ökad äggproduktion i zebrafiskhonor som exponerats för avloppsvatten som genomgått ozonbehandling jämfört med konventionellt renat avloppsvatten. Vuxna zebrafiskar exponerade för ozonbehandlat avloppsvatten hade initialt (mindre än efter 1 minut) en minskad simaktivitet som var statistiskt säkerställd. Den effekten försvann över tid. Dock observerades inga statistiskt säkerställda skillnader mellan exponeringsalternativen avseende rörelseaktivitet, dödlighet eller missbildningar i embryon av zebrafisk.

Akande m.fl. [1] observerade överlag små effekter på reproduktionsrelaterade variabler i vuxna zebrafiskar (hanar och honor), även om vissa statistiskt säkerställda effekter, framförallt vad avser försämrad lekframgång, observerades vid exponering för avloppsvatten kompletterad med ozonering jämfört med konventionellt renat avloppsvatten. Dock var denna skillnad inte längre detekterbar när fiskarna exponerades för avloppsvatten kompletterad med ozonering och biofilter behandling, dessa fiskar var lika framgångsrika på lekframgång som fiskar exponerade för konventionellt renat avloppsvatten.

Lundström m.fl. [40] observerades en statistiskt säkerställd negativ effekt på kläckningstid i zebrafiskembryon exponerade för konventionellt avloppsvatten (≥75 procent inblandning; utan och med sandfilter), en effekt som försvann vid exponering av avloppsvatten som kompletterats med avancerad rening (ozon, UV/H_2O_2, MBR).

Sammantaget visar dessa studier ett visst stöd för att ozonering som tillägg minskar påverkan på reproduktion hos fisk i jämförelse med konventionellt renat avloppsvatten.

Indikation på exponering för toxiska substanser – dioxiner (regnbåge, zebrafisk)

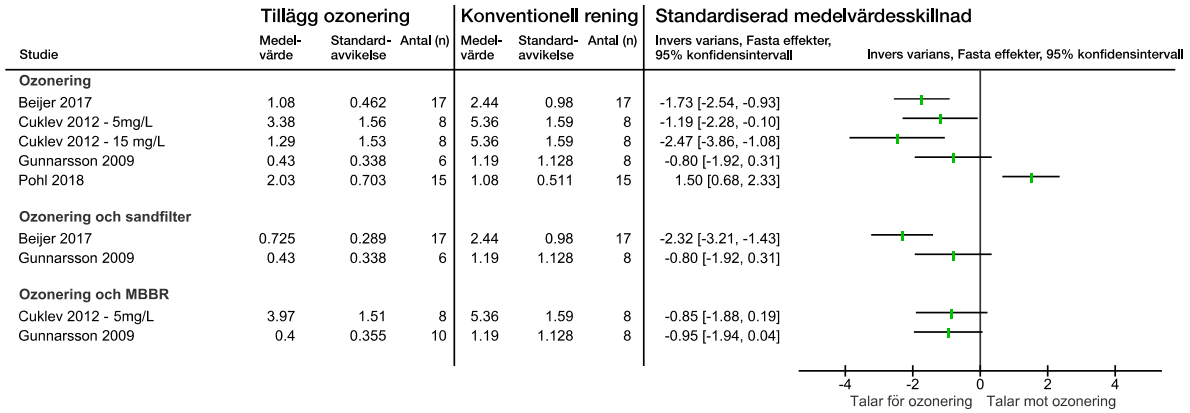
Beijer m.fl. (2017) [8], Cuklev m.fl. (2012) [20], Gunnarsson m.fl. (2009) [25] och Pohl m.fl. (2018) [50] analyserade mRNA nivåer av CYP1A1 i regnbåge respektive zebrafisk [50]. Dessförinnan hade fiskarna exponerat för avloppsvatten från Käppala reningsverk på Lidingö, Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm respektive Knivsta reningsverk i Uppsala.

Samtliga artiklar studerade CYP1A1 mRNA-produktion i lever medan Beijer m.fl. även studerade CYP1A1 mRNA-produktion i gälar.

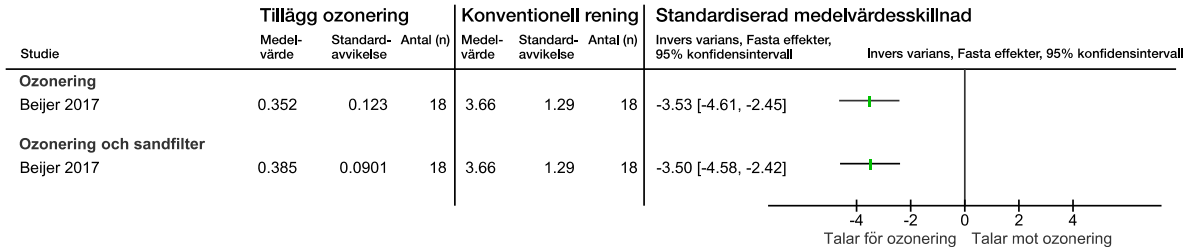
Cuklev m.fl. (2012) [20] exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med olika doser av ozonering (5 och 15 mg/L) och ozonering (5 mg/L) tillsammans med MBBR. Gunnarsson m.fl. (2009) [25] exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med ozonering (15 mg/L) och ozonering (15 mg/L) tillsammans med MBBR. Pohl m.fl. (2018) [50] exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med 7 mg/L ozonering.

Beijer m.fl. exponerade regnbåge för avloppsvatten behandlat med ett sandfilter efter ozoneringsteget (7 mg/L) och Gunnarson m.fl. för avloppsvatten behandlat med ett sandfilter före ozoneringsteget (15mg/L).

Resultaten i Beijer m.fl. i både lever och gälar talar för ozonering som tillägg, se figur 32 respektive figur 33. Cuklev m.fl. (med undantag för ozonering plus MBBR) talar också för ozonering som tillägg. Resultaten i Gunnarsson m.fl. är inkonklusiva då intervallestimatet överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen) och Pohl m.fl. talar mot ozonering som tillägg, se figur 32.



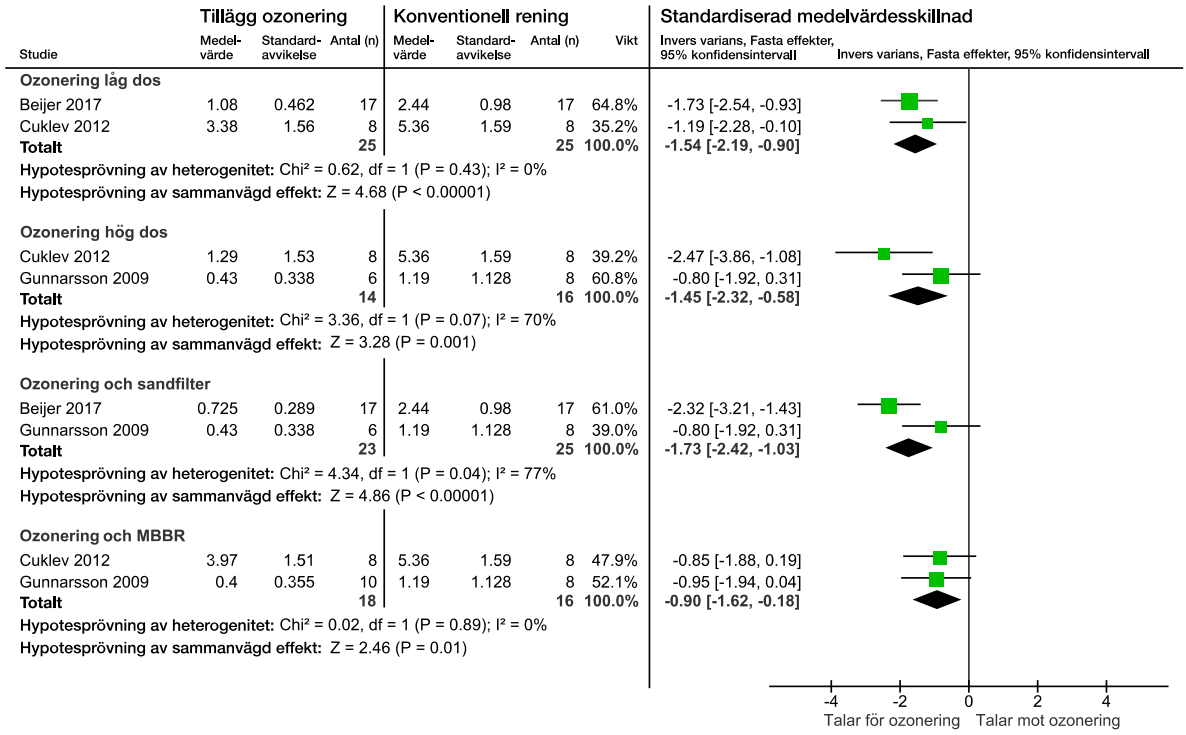
Figur 32: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå CYP1A1 i lever, konfidensintervall 95%



Figur 33: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå CYP1A1 i gälar, konfidensintervall 95%

Vid sammanvägning av resultaten för lever blir nivåerna av CYP1A1-mRNA lägre i samtliga kombinationer som inkluderar ozonering som tillägg jämfört med fiskar exponerade för konventionellt renat avloppsvatten. Dessa skillnader är statistiskt säkerställda vilket visar sig i att de sammanvägda intervallestimaten på 95 procent inte överlappar mittlinjen, se figur 34.

Rådata erhållen från Pohl m.fl. [50] visar att tillförlitligheten är låg gällande resultatet för gruppen exponerad för ozonering som tillägg. Det resultatet ingår således inte i sammanvägningen i den lägre ozoneringsdosen (5–7 mg/L). Metaanalysen där Pohl m.fl. ingår återfinns i bilaga H, figur 3.



Figur 34: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå CYP1A1, konfidensintervall 95%

Leversomatiskt index (LSI)

Se figur 30 och 31.

Sammantaget finns det ett stöd för att ozonering som tillägg medför lägre nivåer av CYP1A1 mRNA och lägre LSI hos regnbåge jämfört med konventionellt renat avloppsvatten. Detta indikerar att ozonering som tillägg medför en minskad exponering för toxiska substanser.

Metabola förändringar (regnbåge)

Samuelsson m.fl. (2011) [54] analyserade metaboliska förändringar efter exponering för konventionellt renat avloppsvatten och med ozonering som tillägg i regnbåge. För detta ändamål användes avloppsvatten från Henriksdals reningsverk i Stockholm. Ozonering som tillägg medförde förändringar med avseende på exempelvis low density lipoprotein (LDL) och high density lipoprotein (HDL) jämfört med konventionellt renat avloppsvatten.

4.5 Effekter av aktiverat kol som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten

Påverkan på vattenlevande organismer av avloppsvatten som renats med hjälp av granulerat aktiverat kol (GAC), som tillägg till konventionell rening, har studerats i fyra artiklar. De organismer som använts har varit hoppkräftor i Lundström m.fl. (2010) [41], sländor i Späth m.fl. (2020) [55] respektive regnbåge i Beijer m.fl. (2017) [8] och Cuklev m.fl. (2012) [20]. I detta kapitel redovisar vi effekterna i form av skillnader jämfört med den påverkan som exponering för konventionellt renat avloppsvatten medfört.

Två trofinivåer finns representerade i detta kapitel:

- Primärkonsumenter (hoppkräftor, sländor) samt
- Sekundärkonsumenter (regnbåge)

Primärproducenter har inte undersökts vid denna typ av jämförelse i svenska studier. Samtliga studier har utförts på laboratorium.

Resultat

1. Fisk exponerad för avloppsvatten med aktiverat kol som tillägg har en lägre produktionen av ZP1, ZP2, ZP3 mRNA. Detta indikerar på en minskad exponering av östrogen med aktiverat kol som tillägg.
2. Fisk exponerad för avloppsvatten med aktiverat kol som tillägg har en lägre produktionen av CYP1A1 mRNA. Detta indikerar på en minskad exponering av toxiska substanser med aktiverat kol som tillägg.

Inkonklusiva resultat

1. Det går inte att bedöma om aktiverat kol som tillägg, jämfört med konventionell rening, medför en påverkad populationstillväxt (tillväxtkvot λ) hos hoppkräftor.
2. Det går inte att bedöma om aktiverat kol som tillägg, jämfört med konventionell rening, medför att hoppkräftors utveckling från ett utvecklingsstadium till ett annat (hazardkvot) påverkas.
3. Det går inte att bedöma om aktiverat kol som tillägg, jämfört med konventionell rening, påverkar sländors fettsyrametabolism.

4.5.1 Effekter på organismer inom trofinivå primärkonsumenter

Hoppkräftorna studerades med avseende på populationstillväxt samt tidsaspekten rörande olika utvecklingsstadier i Lundström m.fl. (2010) [41]. För detta ändamål användes avloppsvatten, från Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm, som genomgått konventionell rening eller med aktiverat kol som tillägg. Bräckt vatten utgjorde referensalternativ. Exponeringen genomfördes i vattenbehållare med antigen 3, 15 eller 75 procent avloppsvatten på laboratorium.

Sländor har studerat i en artikel med avseende på ämnesomsättning i Späth m.fl. (2020) [55] under exponering av konventionellt renat avloppsvatten och med aktiverat kol som tillägg från reningsverket i Umeå. Kontrollvatten utgjorde referensalternativ och experimenten utfördes på laboratorium.

Hoppkräftor

Populationstillväxt

Populationstillväxten undersöktes med hjälp av en enkel stadiestrukturerad matrismodell för geometrisk tillväxt där tillväxtkvoten (λ) analyserades. Skattningarna gjordes med hjälp av datorsimuleringar (Monte Carlo). En tillväxtkvot under 1.0 innebär att populationen krymper över tid och kan försvinna. I tabell 26 redovisas konfidensgränserna. Konfidensgränser är inte samma sak som konfidensintervall, men anger inom vilket intervall man med 95 procents säkerhet anser att den verkliga tillväxtkvoten ligger.

Man genomförde inte någon direkt jämförelse av konventionell rening med aktiverat kol som tillägg utan samtliga jämförelser gjordes mot det bräckta vattnet. Då konfidensgränserna överlappar varandra mellan exponeringsalternativen går det inte att bedöma huruvida aktiverat kol som tillägg medför en högre eller en lägre tillväxtkvot jämfört med konventionellt renat avloppsvatten, se tabell 26.

Tabell 26: Populationstillväxt som lambda (λ)

Behandling	**Konfidensgränser 95%**
Konventionell 3%	1.32 till 1.98
Aktiverat kol 3%	1.37 till 1.96
Konventionell 15%	1.36 till 1.93
Aktiverat kol 15%	1.33 till 1.89
Konventionell 75%	0.30 till 1.14
Aktiverat kol 75%	0.71 till 1.42

Utveckling från ett stadium till ett annat

Hoppkräftornas utveckling från ett stadium till ett annat, samt larvstadium (överlevande) till sexuell mognad analyserades med hjälp av hazardkvoter och konfidensgränser. Inte heller i detta fall genomförde man någon direkt jämförelse av konventionellt renat avloppsvatten med aktiverat kol som tillägg utan jämförelserna gjordes uteslutande mot det bräckta vattnet.

Även här kan man betrakta konfidensgränsernas längd och överlapp, se tabell 27–29. Och även i detta fall går det inte att bedöma huruvida aktiverat kol som tillägg medför en högre eller en lägre tillväxtkvot då konfidensgränserna överlappar varandra mellan exponeringsalternativen.

Tabell 27: Hazardkvot från larvstadium till kräftstadium – aktiverat kol som tilläggsbehandling jämfört med naturligt vatten

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 3%	0.74 till 1.44
Aktiverat kol 3%	0.66 till 1.31
Konventionell 15%	0.67 till 1.33
Aktiverat kol 15%	0.55 till 1.10
Konventionell 75%	0.78 till 1.549
Aktiverat kol 75%	0.57 till 1.17

Tabell 28: Hazardkvot från larvstadium till sexuell mognad – aktiverat kol som tilläggsbehandling jämfört med naturligt vatten

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 3%	0.39 till 0.80
Aktiverat kol 3%	0.57 till 1.19
Konventionell 15%	0.36 till 0.77
Aktiverat kol 15%	0.42 till 0.88
Konventionell 75%	0.33 till 0.71
Aktiverat kol 75%	0.36 till 0.77

Tabell 29: överlevande från larvstadium till sexuell mognad – aktiverat kol som tilläggsbehandling jämfört med naturligt vatten

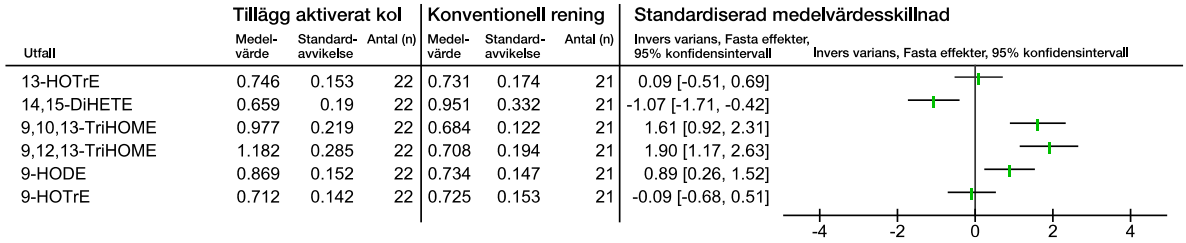
Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 3%	0.79 till 5.64
Aktiverat kol 3%	0.87 till 5.90
Konventionell 15%	0.99 till 6.73
Aktiverat kol 15%	1.06 till 6.86
Konventionell 75%	1.44 till 9.06
Aktiverat kol 75%	1.44 till 8.70

Sammantaget kan inga slutsatser dras avseende påverkan på populationstillväxt och utveckling av hoppkräfta efter exponering av konventionellt renat avloppsvatten och med aktiverat kol som tillägg. Inga slutsatser kan dras om vilket exponeringsalternativ som är bäst.

Sländor

Späth m.fl. (2020) [55] analyserade fettsyrametabolism (ämnesomsättning) i sländlarver. För detta ändamål användes konventionellt renat avloppsvatten och med aktiverat kol som tillägg från reningsverket i Umeå. Referensalternativ utgjorde kontrollvatten och experimenten utfördes på laboratorium.

Exponering med aktiverat kol som tillägg medförde lägre koncentration av 14,15-DiHETE och högre koncentrationer av 9,10,13-TriHOME, 9,12,13-TriHOME och 9-HODE jämfört med exponering för konventionellt renat avloppsvatten. Ingen skillnad mellan behandlingsalternativen detekteras för 13-HOTrE och 9-HOTrE då intervallestimaten överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), se figur 35.



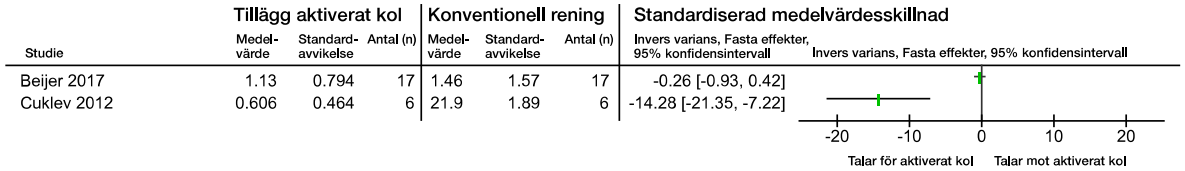
Figur 35: standardiserad medelvärdesskillnad, fettsyrakoncentration, konfidensintervall 95%

4.5.2 Effekter på organismer inom trofinivå sekundärkonsumenter

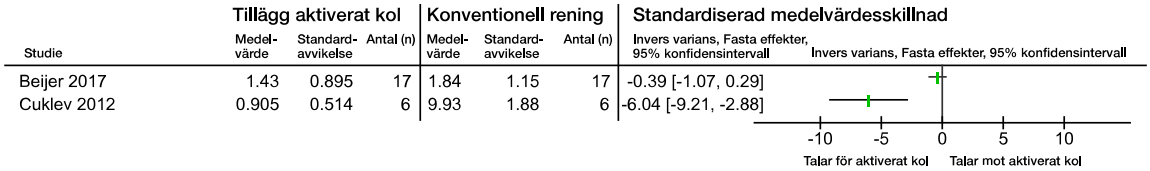
Indikation på östrogen exponering (regnbåge)

Beijer m.fl. (2017) [8] och Cuklev m.fl. (2012) [20] analyserade mRNA-nivåer av ZP 1–3 i lever. Regnbåge hade dessförinnan exponerats för antingen avloppsvatten som renats konventionellt eller med aktiverat kol som tillägg. Avloppsvattnet kom från Käppala reningsverk på Lidingö respektive Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm.

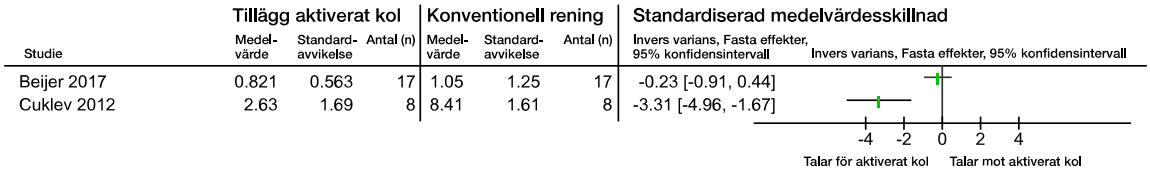
Samtliga resultat i figur 36–38 som redovisats av Beijer m.fl. är inkonklusiva, då de 95 procentiga konfidensintervallen överlappar mittlinjen (0 = ingen skillnad mellan exponeringsalternativen), medan resultaten från Cuklev m.fl. talar för aktiverat kol som tilläggsalternativ. Beijer m.fl. har dock haft en kort exponeringstid (fyra dagar) för ZP aktivering. Tillförlitligheten till resultatet i Beijer m.fl. bedöms därför som låg på grund av den korta exponeringstiden och en sammanvägning av resultaten genomförs således inte.



Figur 36: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå ZP1, konfidensintervall 95%



Figur 37: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå ZP2, konfidensintervall 95%



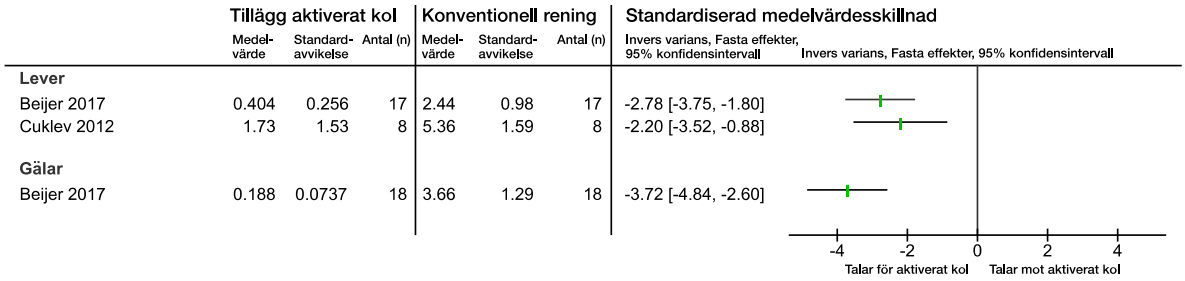
Figur 38: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå ZP3, konfidensintervall 95%

Sammantaget finns det ett visst stöd för att aktiverat kol som tillägg medför en lägre aktivering av ZP-mRNA hos regnbåge jämfört med konventionellt renat avloppsvatten. Detta indikerar att aktiverat kol som tillägg medför en lägre exponering för östrogen. Det som försvagar underlaget är att resultatet endast baseras på en studie.

Indikation på exponering för toxiska substanser – dioxiner (regnbåge)

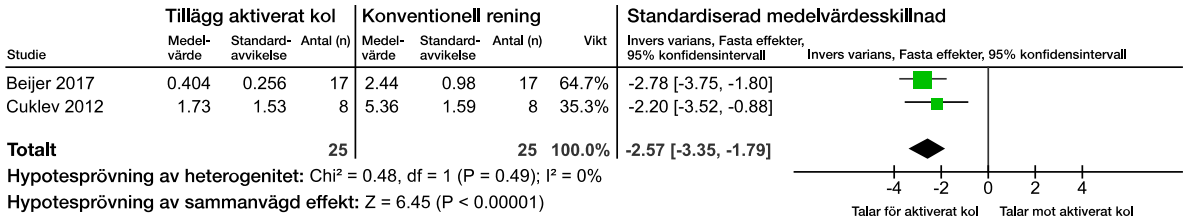
Beijer m.fl. (2017) [8] och Cuklev m.fl. (2012) [20] analyserade mRNA-nivåer av CYP1A1 i gälar och lever i regnbåge. Fiskarna exponerades dessförinnan för antingen konventionellt renat avloppsvatten eller med aktiverat kol som tillägg. Avloppsvattnet kom från Käppala reningsverk på Lidingö respektive Hammarby Sjöstadsverk i Stockholm.

Både Beijer m.fl. och Cuklev m.fl. talar för aktiverat kol som tillägg, se figur 39.



Figur 39: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå CYP1A1, konfidensintervall 95%

När resultaten för lever vägs samman blir nivåerna av CYP1A1-mRNA lägre i regnbåge som exponerats för avloppsvatten med aktiverat kol som tillägg jämfört konventionellt renat avloppsvatten. Dessa skillnader är statistiskt säkerställda då det sammanvägda intervallestimatet på 95 procent inte överlappar mittlinjen (-3.35, - 1.79), se figur 40.



Figur 40: standardiserad medelvärdesskillnad, mRNA-nivå CYP1A1, konfidensintervall 95%

Sammantaget finns det ett stöd för att aktiverat kol som tillägg medför en lägre aktivering av CYP1A1-mRNA hos regnbåge jämfört med konventionell rening. Detta indikerar att en lägre exponering för toxiska substanser sker med aktiverat kol som tillägg. Det som försvagar underlaget är att resultatet baseras på endast två separata studier.

4.6 Effekter av behandlingsvåtmarker som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten

Breitholtz m.fl. (2012) [12] analyserade tillväxthämning hos makroalg samt mortalitet och utveckling (LDR) hos hoppkräfta efter exponering av konventionellt renat avloppsvatten och med behandlingsvåtmark som tillägg. Avloppsvatten från fyra avloppsreningsverk med behandlingsvåtmark i anslutning i Eskilstuna, Nynäshamn, Oxelösund och Trosa användes. Exponeringen genomfördes i vattenbehållare med antigen 11.25, 22.5, 45 eller 90 procent avloppsvatten på laboratorium.

Två trofinivåer finns representerade i underlaget:

- Primärproducenter (makroalger) samt
- Primärkonsumenter (hoppkräftor).

Sekundärkonsumenter har inte undersökts vid denna typ av jämförelse i svenska studier. Samtliga studier har utförts på laboratorium.

Resultat

1. Hoppkräftors tillväxt minskar med behandlingsvåtmark som tillägg jämfört med exponering för konventionellt renat avloppsvatten.

Inkonklusiva resultat

1. Det går inte att bedöma om behandlingsvåtmark som tillägg, jämfört med konventionell rening, påverkar tillväxt hos makroalger.
2. Det går inte att bedöma om behandlingsvåtmark som tillägg, jämfört med konventionell rening, påverkar dödlighet hos hoppkräftor.

4.6.1 Effekter på organismer inom trofinivå primärproducenter

Man gjorde inte någon direkt statistisk jämförelse mellan konventionellt renat avloppsvatten och med behandlingsvåtmark som tillägg. Samtliga jämförelser gjordes mot det bräckta vattnet. Detta innebär att inga resultat finns från en direkt jämförelse men genom att jämföra konfidensintervall längd och överlapp kan man dra vissa slutsatser.

Avloppsvatten som renats med behandlingsvåtmark som tillägg från reningsverket i Nynäshamn, se tabell 30, medförde en förbättrad tillväxt hos makroalg jämfört med exponering för konventionellt renat avloppsvatten. I det fallet krävdes en högre koncentration av avloppsvatten med behandlingsvåtmark som tillägg (18 till 36 procent) jämfört med konventionellt renat avloppsvatten (4.2 till 10 procent) för att hämma tillväxten av makrolag med 50 procent.

Det omvända observerades med avloppsvatten från reningsverket i Trosa, se tabell 30, där en försämrad tillväxt med behandlingsvåtmark som tillägg detekterades hos makroalg jämfört med exponering för konventionellt renat avloppsvatten. I det fallet krävdes en lägre koncentration av avloppsvatten med behandlingsvåtmark som tillägg (12 till 24 procent) i jämförelse med för konventionell rening (41 till 43 procent) för att hämma tillväxten av makrolag med 50 procent.

Efter exponering för avloppsvatten från reningsverken i Eskilstuna och Oxelösund, se tabell 30, observerades inga skillnader mellan konventionellt renat avloppsvatten och med behandlingsvåtmark som tillägg på tillväxt hos makroalg då konfidensintervallen överlappade varandra.

Tabell 30: den exponeringskoncentration som krävs för en tillväxthämning hos makroalger på 50%

Reningsverk	**Behandling**	**Konfidensintervall 95%**
Eskilstuna	Konventionell	12 till 22
Eskilstuna	Behandlingsvåtmark	15 till 32
Nynäshamn	Konventionell	4.2 till 10
Nynäshamn	Behandlingsvåtmark	18 till 36
Oxelösund	Konventionell	35 till 57
Oxelösund	Behandlingsvåtmark	29 till 52
Trosa	Konventionell	41 till 43
Trosa	Behandlingsvåtmark	12 till 24

Sammantaget kan inga slutsatser dras om behandlingvåtmarker som tillägg påverkar makrolagers tillväxt.

4.6.2 Effekter på organismer inom trofinivå primärkonsumenter

Även med hoppkräftor genomfördes ingen direkt jämförelse mellan konventionellt renat avloppsvatten och med behandlingsvåtmark som tillägg. Samtliga jämförelser gjordes mot det bräckta vattnet. Detta innebär att inga resultat finns från en direkt jämförelse men genom att jämföra konfidensintervall längd och överlapp kan man dra vissa slutsatser.

Extra rening med behandlingsvåtmark medförde ingen skillnad i dödlighet då samtliga konfidensintervall överlappar varandra, se tabell 31–34, med undantag för avloppsvatten från Nynäshamn där behandlingsvåtmark som tillägg minskade dödligheten i högsta koncentrationen (90 procent), se tabell 32.

Tabell 31: medelvärde vad gäller dödlighet, hoppkräftor, Eskilstuna

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	4.1 till 17.9
Behandlingsvåtmark 11.25%	0 till 5.9
Konventionell 22.5%	6.5 till 21.5
Behandlingsvåtmark 22.5%	5.6 till 20.4
Konventionell 45%	4.6 till 13.0
Behandlingsvåtmark 45%	3 till 17
Konventionell 90%	91.8 till 100.2
Behandlingsvåtmark 90%	88.7 till 99.3

Tabell 32: medelvärde vad gäller dödlighet, hoppkräftor, hoppkräftor, Nynäshamn

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	9.7 till 26.3
Behandlingsvåtmark 11.25%	1 till 11.6
Konventionell 22.5%	5.8 till 20.2
Behandlingsvåtmark 22.5%	0 till 8
Konventionell 45%	7.9 till 24.1
Behandlingsvåtmark 45%	1 till 11.6
Konventionell 90%	Alla döda
Behandlingsvåtmark 90%	18.2 till 37.8

Tabell 33: medelvärde vad gäller dödlighet, hoppkräftor, hoppkräftor, Oxelösund

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	2.6 till 15.0
Behandlingsvåtmark 11.25%	6.5 till 21.5
Konventionell 22.5%	0.2 till 9.8
Behandlingsvåtmark 22.5%	3.4 till 14.6
Konventionell 45%	1.7 till 13.3
Behandlingsvåtmark 45%	2.5 till 14.7
Konventionell 90%	6.5 till 21.5
Behandlingsvåtmark 90%	10.4 till 27.6

Tabell 34: medelvärde vad gäller dödlighet, hoppkräftor, Trosa

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	4.1 till 17.9
Behandlingsvåtmark 11.25%	Ej analyserad
Konventionell 22.5%	6.5 till 21.5
Behandlingsvåtmark 22.5%	2.3 till 16.5
Konventionell 45%	7.2 till 22.8
Behandlingsvåtmark 45%	10.4 till 28.6
Konventionell 90%	91.8 till 100.2
Behandlingsvåtmark 90%	95 till 101

Även tillväxt analyserades i Breitholtz m.fl. [12] och extra reningssteg med behandlingsvåtmark medförde en minskad tillväxt (LDR) i närvaro av avloppsvatten från Eskilstuna, se tabell 35, och Oxelösund, se tabell 37, i koncentrationer lägre än 90 procent då konfidensintervallen mellan behandlingsvåtmark som tillägg och konventionellt renat avloppsvatten inte överlappar varandra. I närvaro av avloppsvatten från Nynäshamn och Trosa observerades en minskad tillväxt endast i 45 procent avloppsvatten med behandlingsvåtmark som tillägg, se tabell 36 och 38. Även här var samtliga jämförelser mot det bräckta vattnet vilket innebär att inga resultat finns från en direkt jämförelse.

Tabell 35: medelvärde vad gäller LDR, hoppkräftor, Eskilstuna

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	37.0 till 59.0
Behandlingsvåtmark 11.25%	10.3 till 27.7
Konventionell 22.5%	54.0 till 76.0
Behandlingsvåtmark 22.5%	8.1 till 25.9
Konventionell 45%	75.5 till 92.5
Behandlingsvåtmark 45%	9.3 till 28.7
Konventionell 90%	alla hoppkräftor döda
Behandlingsvåtmark 90%	alla hoppkräftor döda

Tabell 36: medelvärde vad gäller LDR, hoppkräftor, Nynäshamn

Behandling	**Konfidensintervall 95%**
Konventionell 11.25%	36.0 till 60.0
Behandlingsvåtmark 11.25%	50 till 72
Konventionell 22.5%	53.0 till 77.0
Behandlingsvåtmark 22.5%	50 till 72
Konventionell 45%	75.1 till 92.9
Behandlingsvåtmark 45%	49 till 71
Konventionell 90%	alla hoppkräftor döda
Behandlingsvåtmark 90%	0 till 0

Tabell 37: medelvärde vad gäller LDR, hoppkräftor, Oxelösund

Behandling	Konfidensintervall 95%
Konventionell 11.25%	81.8 till 96.2
Behandlingsvåtmark 11.25%	32 till 56
Konventionell 22.5%	75.8 till 92.2
Behandlingsvåtmark 22.5%	17 till 39
Konventionell 45%	87.3 till 98.7
Behandlingsvåtmark 45%	18 till 38
Konventionell 90%	46.0 till 62.0
Behandlingsvåtmark 90%	9.4 till 28.6

Tabell 38: medelvärde vad gäller LDR, hoppkräftor, Trosa

Behandling	Konfidensintervall 95%
Konventionell 11.25%	69.5 till 88.5
Behandlingsvåtmark 11.25%	Ej analyserad
Konventionell 22.5%	56.0 till 78.0
Behandlingsvåtmark 22.5%	34 till 60
Konventionell 45%	67.0 till 87.0
Behandlingsvåtmark 45%	13 till 37
Konventionell 90%	alla hoppkräftor döda
Behandlingsvåtmark 90%	alla hoppkräftor döda

Sammantaget går det inte att bedöma om behandlingsvåtmarker påverkar tillväxten hos makrolager eller dödligheten hos hoppkräfta. Det finns ett visst stöd för att behandlingsvåtmark minskar tillväxten (LDR) hos hoppkräfta. Det som försvagar underlaget är att resultatet baseras på en studie.

4.7 Övrig avancerad behandling

Utöver ozonering och aktiverat kol, har alternativa behandlingar av avloppsvatten studerats i enstaka fall. Ultraviolett strålning/väteperoxid (UV/H_2O_2) som tillägg till den konventionella reningen har rapporterats i två publikationer [41, 54] och olika varianter av bioreaktorer (Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) och Membrane Bio Reactor (MBR)) som tillägg till den konventionella reningen har redovisats i några ytterligare publikationer [1, 4, 40, 41] där även MBBR som tillägg till ett ozoneringssteg har utvärderats i tre publikationer [40, 41, 54].

5 Slutsatser och evidensgradering

I detta kapitel beskriver vi de slutsatser vi kommit fram till. Slutsatserna baseras på ovanstående redovisade resultat som visade på statistiskt säkerställda skillnader mellan exponeringsalternativen. Inkonklusiva resultat, där skillnaderna inte är statistiskt säkerställda, sammanfattas i början av respektive resultatkapitel.

Slutsatserna baseras på resultat som bedömts inneha medel eller hög tillförlitlighet enligt evidensgranskningen, se bilaga F. Slutsatserna evidensgraderas vilket innebär att vi beskriver hur säkra vi är på slutsatserna utifrån den statistiska osäkerheten, evidensgranskningen, hur resultaten skiljer sig åt mellan studierna och hur många studier det finns, se bilaga G. Evidensgraderingen består av fyra nivåer, från att vi är mycket säkra, säkra, ganska säkra till att vi är osäkra på slutsatsen. Slutsatsen kan också vara inkonklusiv när det inte finns tillräckligt med tillförlitliga data.

Nedan följer ett antal slutsatser inklusive beskrivningar hur vi har resonerat kring evidensgraderingen tillhörande respektive slutsats.

5.1 Effekter av konventionellt renat avloppsvatten jämfört med referens- eller kontrollvatten

Slutsats 1. Konventionellt renat avloppsvatten påverkar vattenlevande organismer

Exponering för konventionellt renat avloppsvatten medför att vattenlevande organismer i större utsträckning påverkas på sätt som indikerar skada jämfört med exponering för opåverkat vatten.

Vi är *säkra* på slutsatsen baserat på det vetenskapliga underlaget som ingår i översikten.

Evidensgradering baseras på att samtliga tre trofinivåer är påverkade av konventionellt renat avloppsvatten jämfört med referens- eller kontrollvatten.

Bakteriefloran är påverkad nedströms reningsverk

Sammantaget finns det stöd för att bakteriefloran är påverkad nedströms reningsverk. Detta resultat baseras på tre studier från tre olika reningsverk. Samtliga studier visar en påverkan men på olika mått (resistensgener, förekomst av *E. coli* och enterokocker, samt bred artförekomst). Det som försvagar underlaget är att orsaken bakom är oklar.

Vi är ganska säkra på att bakteriefloran påverkas av konventionellt renat avloppsvatten.

Makroalgers tillväxt försämras

Sammantaget finns det stöd för att makroalgers tillväxt försämras i närvaro av konventionellt renat avloppsvatten jämfört med exponering för kontrollvatten. Detta resultat baseras på två studier där avloppsvatten från sex olika reningsverk undersöktes. Samtliga avloppsvatten minskade makroalgernas tillväxt med 50 procent jämfört med kontrollvatten.

Vi är säkra på att makroalgers tillväxt försämras av konventionellt renat avloppsvatten.

Hoppkräftors överlevnad minskar

Sammantaget finns det stöd för att vid exponering för hög koncentration av konventionellt renat avloppsvatten så ökar dödligheten för hoppkräftor jämfört med exponering för opåverkat bräckt vatten. Resultatet baseras på två studier där avloppsvatten från sex olika reningsverk undersöktes. I fem av sex undersökta avloppsvatten var samtliga hoppkräftor döda vid exponering för höga koncentrationer avloppsvatten jämfört med referensvatten. Det som försvagar underlaget är att inte samtliga undersökta avloppsvatten visar detta.

Vi är ganska säkra på att hoppkräftors överlevnad minskar av konventionellt renat avloppsvatten.

Fiskar aktiverar avgiftningssystem och får störningar på hormonell reglering

Hos fisk aktiveras avgiftningssystem och störningar på hormonell reglering av reproduktion i större utsträckning efter exponering för konventionellt renat avloppsvatten jämfört med exponering för opåverkat vatten.

Sammantaget finns det stöd för att fisk exponerad för konventionellt renat avloppsvatten påverkas av östrogena substanser med ökade nivåer av vitellogenin-protein, vitellogenin-mRNA och LSI. Resultatet baseras på fem studier med avloppsvatten från sex olika reningsverk.

Sammantaget finns det stöd för att fisk exponerad för konventionell renat avloppsvatten påverkas av toxiska substanser med ökad CYP1A1-enzymaktivitet (EROD), CYP1A1-mRNA nivå och LSI. Resultatet baseras på sex studier med avloppsvatten från sju olika reningsverk.

Det som gör att underlaget försvagas är att de enskilda resultaten baseras på få separata studier.

Vi är ganska säkra på att fiskar påverkas av konventionellt renat avloppsvatten.

5.2 Effekter av ozonering som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten

Slutsats 2. Ozonering som tillägg minskar påverkan

Ozonering som tilläggsbehandling minskar påverkan på vattenlevande organismer jämfört med exponering för konventionellt renat avloppsvatten.

Vi är *ganska säkra* på slutsatsen baserat på det vetenskapliga underlaget som ingår i översikten.

Evidensgradering baseras på att tilläggsrening med ozonering minskar påverkan på fisk. Begränsat stöd finns för detta för de andra trofinivåerna.

Avgiftningssystem och störningar på hormonell reglering hos fisk minskar

Sammantaget finns det stöd för att fisk exponerad för avloppsvatten med ozonering som tillägg påverkas mindre av östrogena substanser. De har lägre nivåer av vitellogenin-mRNA och LSI jämfört med fisk exponerad för konventionellt renat avloppsvatten. Resultatet baseras på fyra studier med nio olika avloppsvatten från fyra olika reningsverk.

Sammantaget finns det stöd för att fisk exponerad för avloppsvatten med ozonering som tillägg påverkas mindre av toxiska substanser. De har lägre nivåer av CYP1A1-mRNA jämfört med fisk exponerad för konventionellt renat avloppsvatten. Resultatet baseras på fyra studier med nio olika avloppsvatten från fyra olika reningsverk.

Det som gör att underlaget försvagas är att de enskilda resultaten baseras på få separata studier.

Vi är ganska säkra på att fiskar påverkas mindre av ozonbehandlat avloppsvatten.

5.3 Effekter av aktiverat kol som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten

Slutsats 3. Aktiverat kol som tillägg minskar påverkan på fisk

Aktiverat kol som tilläggsbehandling minskar påverkan på vattenlevande organismer jämfört med exponering för konventionellt renat avloppsvatten.

Vi är *ganska säkra* på slutsatsen baserat på det vetenskapliga underlaget som ingår i översikten.

Evidensgradering baseras på att tilläggsrening med aktiverat kol minskar påverkan på fisk. Inget stöd finns för detta för de andra trofinivåerna.

Avgiftningssystem och störningar på hormonell reglering hos fisk minskar

Sammantaget finns det visst stöd för att fisk exponerad för avloppsvatten med aktiverat kol som tillägg påverkas mindre av östrogena substanser. De har lägre nivåer av ZP-mRNA jämfört med fisk exponerad för konventionellt renat avloppsvatten. Resultatet baseras på två studier med avloppsvatten från två olika reningsverk. Det som försvagar underlaget är att resultatet från en av dessa studier har låg tillförlitlighet.

Sammantaget finns det stöd för att fisk exponerad för avloppsvatten med aktiverat kol som tillägg påverkas mindre av toxiska substanser. De har lägre nivåer av CYP1A-mRNA jämfört med fisk exponerad för konventionellt renat avloppsvatten. Resultatet baseras på två studier med avloppsvatten från två olika reningsverk.

Det som gör att underlaget försvagas är att de enskilda resultaten baseras på få separata studier.

Vi är ganska säkra på att fisk påverkas mindre av avloppsvatten behandlat med aktiverat kol.

5.4 Effekter av behandlingsvåtmarker som tillägg jämfört med konventionellt renat avloppsvatten

Slutsats 4

Det vetenskapliga underlaget för att bedöma behandlingsvåtmarker som tilläggsbehandling och dess påverkan på vattenlevande organismer är *otillräckligt*.

Sammantaget går det inte att bedöma om behandlingsvåtmarker påverkar tillväxten hos makrolager eller dödligheten hos hoppkräfta. Dock finns det ett visst stöd för att behandlingsvåtmark hämmar tillväxten (LDR) hos hoppkräfta. Det som försvagar underlaget är att resultatet baseras på en studie.

Underlaget är otillräckligt för att dra slutsatser om behandlingsvåtmarker.

5.5 Forskningsinsatser

Slutsats 5

Baserat på det underlag som ingår i översikten är det tydligt att mer forskning med svenskt avloppsvatten på alla trofinivåer behövs.

Som framgår av ovanstående evidensgraderingar är slutsatserna behäftade med osäkerhet. För att uppnå mer definitiva slutsatser krävs mer forskning på området.

Generellt sett så är det vetenskapliga underlaget begränsat, mer forskning behövs för att täcka det behov av vetenskapligt underlag som beslutsfattare har. Detta gäller samtliga jämförelser, organismtyper och utfallsmått.

6 Kunskapsluckor

En kunskapslucka, inom ramen för evidensbaserad praktik, är inte samma sak som inom grundforskning. Kunskapsluckor inom evidensbaserad praktik har även att göra med evidensgranskning och evidensgradering.

Ibland kan det helt saknas vetenskapliga studier. I andra fall kan det finns brister vad gäller befintliga vetenskapliga resultat. Dessa brister kan vara kopplade till (1) urvalsproblematik, (2) fördelning av organismer till olika exponeringsalternativ, (3) utförandet av de vetenskapliga undersökningarna, (4) hur specifika utfall mäts och om mätningsresultaten är relevanta för det beslutsproblem som den systematisk översikten handlar om samt (5) om rapportering av resultaten är ofullständig.

På ett övergripande plan handlar det för beslutsfattare inom området att få en bild av huruvida det vetenskapliga underlaget talar för eller emot de beslutsalternativ som man står inför. De jämförelser som undersökts i översikten är följande:

1. ***Konventionellt renat avloppsvatten jämfört med opåverkat vatten***. I detta fall handlar beslutproblemet om ifall konventionell rening av svenskt kommunalt avloppsvatten är tillräcklig eller om det vetenskapliga underlaget talar för att detta inte är fallet. Ett rimligt sätt att resonera är att om vi är säkra på att vattenlevande organismer påverkats av det renade avloppsvattnet jämfört med opåverkat vatten, så är konventionell rening inte tillräcklig. Detta betyder att de vetenskapliga resultaten talar för att tilläggsbehandling av avloppsvattnet kan vara motiverat.

2. ***Ozonering som tillägg jämfört med konventionell rening***. Denna jämförelse är relevant om den första jämförelsen talar för att konventionell rening inte är tillräcklig. Om så är fallet, handlar detta beslutproblem om huruvida ozonering som tillägg, minskar den påverkan på vattenlevande organismer som det konventionellt renade avloppsvattnet visat sig ha. Om vi är säkra på att ozonering som tillägg minskar påverkan på vattenlevande organismer, så talar det vetenskapliga underlaget för att komplettera konventionell rening med ozonering vid svenska reningsverk.

3. ***Aktiverat kol som tillägg jämfört med konventionell rening***. Denna jämförelse är relevant om den första jämförelsen talar för att konventionell rening inte är tillräckligt. Om så är fallet, handlar detta beslutproblem om huruvida aktiverat kol som tillägg, minskar den påverkan på vattenlevande organismer som det konventionellt renade vattnet visat sig ha. Om vi är säkra på att aktiverat kol som tillägg minskar påverkan på vattenlevande organismer, så talar det vetenskapliga underlaget för att komplettera konventionell rening med aktiverat kol vid svenska reningsverk.

4. ***Behandlingsvåtmarker som tillägg jämfört med konventionell rening.*** Denna jämförelse är relevant om den första jämförelsen talar för att konventionell rening inte är tillräckligt. Om så är fallet, handlar detta beslutproblem om huruvida behandlingsvåtmarker som tillägg, minskar den påverkan på vattenlevande organismer som det konventionellt renade avloppsvattnet visat sig ha. Om vi är säkra på att behandlingsvåtmarker som tillägg

minskar påverkan på vattenlevande organismer, så talar det vetenskapliga underlaget för att komplettera konventionell rening med behandlingsvåtmarker vid svenska reningsverk.

Kunskapsluckor som är relevanta här, har att göra med huruvida vi är säkra eller inte vad gäller de ovanstående fyra punkterna.

Sammanfattningsvis är vi säkra på att konventionellt renat avloppsvatten påverkar vattenlevande organismer på sätt som indikerar skada och vi är ganska säkra på att avancerad rening som tillägg minskar denna påverkan.

Som framgår av evidensgraderingen är dessa slutsatser behäftade med osäkerhet. För att uppnå mer definitiva slutsatser krävs mer forskning på området.

Generellt sett så är det vetenskapliga underlaget begränsat, vilket tyder på att mer forskning behövs för att täcka det behov av vetenskapligt beslutsunderlag som centrala intressenter har. Detta gäller samtliga jämförelser, organismtyper och utfallsmått. Det finns också brister i rapporteringen och studierna är överlag små.

Det saknas i tillräcklig omfattning kontrollerade fältstudier, exempelvis burstudier i fält, samt forskning på organismer tillhörande andra trofinivåer än sekundärkonsumenter såsom fiskar, speciellt vad avser avancerad rening. Det saknas även studier om hur olika vattenlevande organismer påverkas med avseende på interaktionseffekter mellan organismerna och vad som kan betraktas som skadligt på systemnivå.

Det är också tydligt att de regionala skillnaderna som präglar Sverige inte är representerat i det vetenskapliga underlaget. Det vore även önskvärt med fler studier där påverkan på vattenlevande organismer kan kopplas till koncentrationer av olika typer av skadliga substanser i avloppsvattnet.

Slutligen är det en brist att många utfallsmått inte direkt kan användas till stöd för eller emot en given åtgärd. I de flesta fall handlar det om indikationer på att vattenlevande organismer skulle kunna skadas. Man behöver alltså ta fram och använda utfallsmått som, åtminstone tillsammans med andra utfallsmått, är mer informativa för beslutsfattare. Man behöver även definiera när skillnader är så pass stora att de kan sägas vara betydande och indikativa på exempelvis allvarlig skada eller påverkan.

Sammantaget behövs fler studier med större antal observationer och replikationer, avloppsvatten från alla delar av Sverige, informativa utfallsmått, gedigen rapportering och fler fältstudier för att täcka de kunskapsluckor som finns.

7 Diskussion

Det förs idag en diskussion i såväl Sverige som i många andra industrialiserade länder om behovet av att i större omfattning införa nya och mer avancerade reningstekniker på kommunala reningsverk. Målet med detta är att avlägsna oönskade kemikalier som finns kvar efter konventionell rening. Införandet av avancerade reningsteknik medför dock en ökad materialåtgång och energianvändning vilket har en negativ miljöpåverkan. För att kunna fatta beslut om kostsamma åtgärder och investeringar i ny teknik kan kunskap om hur vattenlevande organismer påverkas av exponering för vatten som har behandlats med olika reningsalternativ utgöra ett visst stöd.

Syftet med denna översikt var att sammanställa forskning som undersökt hur vattenlevande organismer påverkas av exponering för konventionellt renat svenskt kommunalt avloppsvatten. Jämförelsealternativen var vatten som inte avsevärt påverkats av avloppsvatten eller avloppsvatten renat med avancerad rening som tillägg, ozonering eller aktiverat kol.

7.1 Resultat och slutsatser

Resultaten från översikten visar att avloppsvatten som genomgått endast konventionell rening påverkar vattenlevande organismer på sätt som indikerar skada i jämförelse med opåverkat vatten. Denna påverkan minskar när en mer avancerad reningsteknik adderas till den konventionella reningen. Det är i första hand studier på fiskar som talar för detta. Fisk exponerad för konventionellt renat avloppsvatten uppvisar tecken på exponering av östrogen och toxiska substanser samt oxidativ stress. Det finns stöd för detta vad gäller olika fiskarter som exponerats i såväl laboratorieexperiment som i fältstudier med burar placerad upp- och nedströms från reningsverken.

Det vetenskapliga underlaget är alltför begränsat för att man ska kunna dra några slutsatser rörande störning av reproduktionshormoner, beteende och tillväxt av fisk.

För bakterier finns det ett visst stöd för att bakteriefloran nedströms kommunala reningsverk skiljer sig från de som finns uppströms, och att antibiotikaresistensgener är vanligare nedströms. Det är dock oklart om dessa effekter beror på spridning av bakterier från reningsverk eller av ett selektionstryck av kemikalier i avloppsvattnet som direkt påverkar bakteriefloran nedströms.

Studier har också utförts på alger och ryggradslösa djur som hoppkräftor, sländor och musslor. Såväl tillväxt av makroalger samt överlevnad av hoppkräftor var negativt påverkade av konventionellt renat avloppsvatten jämfört med opåverkat vatten.

Musslor nedströms reningsverk hade förändringar i BMI, ålder och torrvikt mm och sländors fettsyrametabolism påverkades av konventionellt renat avloppsvatten. Det vetenskapliga stödet för detta är dock begränsat.

Avancerad rening som tillägg till konventionell rening minskar den påverkan på vattenlevande organismer som konventionellt renat avloppsvatten har. Det mest tillförlitliga vetenskapliga stödet finns för ozonering som tillägg och där påverkan avser östrogen- och dioxinliknande effekter på

fisk. Det finns även ett stöd för att aktiverat kol som tillägg till konventionell rening kan minska avloppsvattnets dioxin- och östrogenliknande effekter på fisk.

Ozonering som tillägg kan ha en negativ påverkan på makroalgers tillväxt jämfört med endast konventionell rening, men det vetenskapliga underlagt är begränsat. Att en starkt oxiderande behandlingsmetod som ozon kan leda till formering av reaktiva transformationsprodukter är allmänt känt sedan tidigare. Samtidigt vet vi idag att transformationsprodukter kan elimineras via extra efterbehandlingssteg [66]. Studien som ingår i denna översikt, där minskad tillväxt av makroalger observerades efter exponering för ozonbehandlat avloppsvatten, använde sig inte av något efterbehandlingssteg. En formering av och exponering för reaktiva transformationsprodukter skulle i detta fall kunna vara en förklaring till den minskade tillväxt som observerades.

I Samuelsson m.fl. (2011) [54], som ingår i denna översikt, observerades också en förändrad metabolismprofil i blodplasma i regnbågar som exponerats för avloppsvatten behandlat med ozonering som tillägg. Men det är inte utrett huruvida denna påverkan är skadlig eller om den indikerar på någon form av skada hos de undersökta fiskarna.

För hoppkräftor verkar ozonering som tillägg vara ett bättre alternativ jämfört med endast konventionellt renat avloppsvatten när det handlar om populationstillväxt samt förändring från ett utvecklingsstadium till ett annat. Det vetenskapliga stödet för detta är emellertid begränsat.

Vad gäller mikroalger och bakterier är det vetenskapliga underlaget som ingår i denna systematiska översikt alltför begränsat för att slutsatser ska kunna dras rörande ozonering som tillägg.

Hur behandlingsvåtmarker som tillägg till konventionell rening fungerar i jämförelse med endast konventionell rening går inte att bedöma beroende på ett alltför begränsat vetenskapligt underlag.

De resultat som ligger till grund för slutsatserna i översikten och evidensgraderingen av dessa beskrivs i detalj i kapitel fem. För jämförelsen mellan exponering för konventionellt renat avloppsvatten och opåverkat vatten har vi data från alla tre trofinivåer som stödjer slutsatsen att konventionellt renat avloppsvatten påverkar vattenlevande organismer. Makroalgers tillväxt och hoppkräftors överlevnad är negativt påverkad och i fisk aktiveras avgiftningssystem och störningar på hormonell reglering av reproduktion efter exponering av konventionellt renat avloppsvatten. Sammantaget är vi säkra på att konventionellt renat avloppsvatten påverkar vattenlevande organismer. För jämförelsen mellan exponering för konventionellt renat avloppsvatten och med avancerad rening som tillägg saknas data från primärproducenter och -konsumenter. Detta medför att vi är mindre säkra på slutsatserna rörande avancerad rening och dess påverkan på vattenlevande organismer. Vi kan dock konstatera att tillägg av avancerad rening medför en lägre aktivering av avgiftningssystem och mindre störning av hormonell reglering hos fisk jämfört med konventionellt renat avloppsvatten.

Sammanfattningsvis så talar underlaget för att mer avancerad rening av svenskt kommunalt avloppsvatten är nödvändig. Dock är det tydligt att mer forskning med svenskt avloppsvatten behövs då de slutsatser vi har kommit fram till är behäftade med osäkerheter. För att uppnå en större säkerhet krävs mer omfattande forskning på alla trofinivåer. Fler studier med större antal observationer och replikationer, avloppsvatten från alla delar av Sverige, informativa utfallsmått

och gedigen rapportering är ytterst nödvändig för att det vetenskapliga underlaget ska bli tillräckligt robust.

7.2 Underlagets brister och förtjänster

Resultaten från översikten har resulterat i ett antal viktiga och användbara slutsatser. Men det är viktigt att nämna de brister som det vetenskapliga underlag har och diskutera på vilket sätt detta påverkar hur pass tillförlitliga våra övergripande slutsatser är.

De övergripande slutsatserna handlar varken om att identifiera orsaksmekanismer eller om att göra generaliseringar avseende effektstorlekar. I stället har slutsatserna att göra med i vilken utsträckning som resultaten talar för att utnyttja olika typer av tilläggsbehandling vid rening av kommunalt avloppsvatten i Sverige. Bristerna i det vetenskapliga underlaget innebär att slutsatserna är förenade med osäkerhet och det är denna osäkerhet som diskuteras i det här kapitlet på ett övergripande sätt.

Till att börja med konstaterar vi att underlaget utgörs av få studier per utfall. De exponerade grupperna består av få individuella observationer, både inom studierna och totalt sett. Ytterligare ett stort problem är att rapporteringen i artiklarna ofta är ofullständig.

Exempel på ofullständig rapportering är att resultat i tabeller och figurer saknar nödvändig statistisk information, så som medelvärde, antal individer per exponering och standardavvikelse. Det är dessutom ibland oklart hur många observationer (så som antal individer) som de statistiska analyserna baseras på i artiklarna. I några fall har vi fått rådata från artikelförfattarna efter kontakt. Allt detta har medfört att en grundlig bedömning av tillförlitlighet och sammanvägningar ibland har varit svår att genomföra.

I några fall har vi bedömt att det är rimligt att väga samman ett antal resultat där det handlar om samma typ av utfall och jämförelsealternativ vad gäller exponering. Det finns emellertid risker kopplade såväl till att väga samman som att inte väga samman.

Om man väljer att inte väga samman studieresultat som besvarar samma fråga, så kan bland annat följande två problem uppstå. För det första, om studieresultaten baseras på få observationer och den statistiska teststyrkan är svag, så kan intervallestimatet i varje enskilt resultat överlappa ”ingen effekt-linjen”. Slutsatsen skulle då kunna bli att resultatet sammantaget är inkonklusivt och vi kan inte dra några slutsatser. Det andra problemet som kan uppstå om man väljer att inte väga samman studieresultat är att från ett visuellt intryck så drar vi ändå slutsatsen att det finns en effekt eftersom det kanske finns en tendens i samtliga studieresultat som talar för att det finns en viss effekt, trots att inget enskilt studieresultat är statistiskt säkerställt. Då väljer man att förlita sig på visuella intryck och intuitiva sammanvägningar.

Om man däremot väger ihop resultaten från de enskilda studierna, så ökar den statistiska teststyrkan och intervallestimatet krymper. Man får ett resultat som är mindre intuitivt eftersom de enskilda studieresultaten viktas ihop, lite förenklat uttryckt, omvänt mot konfidensintervallens längd. Studier med liten spridning och många observationer för en större vikt i metaanalysen. Detta innebär att ju större precision i ett enskilt resultat, desto tyngre väger det enskilda resultatet. Uttryckt med statistiska termer så sker viktningen av de enskilda studieeffekterna mot den inversa variansen för varje enskild samplingfördelning. Om studieresultaten baseras på få observationer

och den statistiska teststyrkan är svag, så kan en sammanvägning av resultaten medföra att vi får ett statistiskt säkerställt resultat och vi kan dra slutsatser om en viss åtgärd.

Det som påverkar huruvida det är rimligt att väga samman resultaten beror på hur specifikt avgränsad frågan är. Anta att vi vill veta hur fiskar påverkas med avseende på leversomatiskt index (LSI) vid exponering för konventionellt renat avloppsvatten jämfört med exponering för avloppsvatten som renats med ozonering som tillägg. Anta vidare att vi dessutom har avgränsat frågan till en ozoneringsdos på 5 mg/l och regnbågar. Låt säga att vi har två resultat som motsvarar detta, men att vi har ytterligare ett resultat med ozoneringsdosen 15 mg/l. Är det rimligt att även inkludera detta resultat i sammanvägningen? Svaret är förstås nej med ovanstående avgränsning av frågan. Om frågan i stället var ställd att gälla ozonering oavsett dosering eller att man avgränsar ett rimligt intervall, exempelvis att ozondosen ska vara mellan 5 och 20 mg/l, då kan alla resultat inkluderas. Ett annat dilemma är om ett annat resultat baseras på zebrafiskar. Även i detta fall måste frågans avgränsning omfatta fiskar oavsett art för att alla resultat ska kunna inkluderas.

Det finns förstås flera andra sätt som studieresultat kan vara olika på som också behöver beaktas, exempelvis studiedesign och hur pass tillförlitligt ett studieresultat bedöms vara med avseende på kända och okända variabler som kan påverka resultatet.

Osäkerhet rörande de övergripande slutsatserna baseras delvis på 95 procents konfidensintervall, där intervallestimatens längd är ett sätt att kvantifiera vår statistiska osäkerhet. Ju längre intervall, desto större osäkerhet. Om ett intervallestimat överlappar ”ingen effekt-linjen”, det vill säga att ingen skillnad mellan de två jämförda exponeringsalternativen detekteras i metaanalysen, så är resultatet inkonklusivt. Ett inkonklusivt resultat betyder att vi inte kan dra några slutsatser med stöd av resultatet. Vi kan inte heller dra slutsatsen att jämförelsealternativen är likvärdiga så länge vi inte definierat en region där effekterna är så små att de saknar praktisk relevans, se figur 6 alternativ f. Om vi har en definierad region R, se figur 6, kan vi vara mer säkra på när skillnader är så pass stora att de kan sägas vara meningsfulla.

Det tillkommer dock en osäkerhet utöver den som kvantifieras med hjälp av konfidensintervallen. Denna osäkerhet har att göra med olika metodologiska omständigheter som medför risk för snedvridna resultat, risk för bias. Det finns ett antal metodologiska omständigheter som kan medföra bias vad gäller enskilda studieresultat: urval av de organsimer som analyseras, fördelning av organismerna till olika exponeringsalternativ, huruvida de alternativa exponeringsalternativen används korrekt, hur stort och skevt bortfallet varit, om mätningar genomförts på ett korrekt och lämpligt sätt samt om rapportering varit fullständig eller inte. Om bias föreligger, så kan vi inte lita på intervallestimaten fullt ut. Och ju större bias, desto mindre kan vi förlita oss på intervallestimaten. Denna typ av problem har vi bedömt och kommenterat i samband med evidensgranskningen tidigare i rapporten.

Många av dessa studier är utförda i laboratorier där utspädning av avloppsvattnet varit liten. Detta gör det svårt att bedöma i vilken utsträckning de observerade effekterna i laboratorieexperimenten även gäller naturligt förekommande organismer i de vatten där det renade avloppsvattnet släpps ut. Syftet med översikten var inte att utreda specifikt hur vattenlevande organismer påverkas av avloppsvatten i sin naturliga miljö, utan syftet var att utreda om avloppsvatten som sådant påverkar vattenlevande organismer vilket i sin tur kan motivera tillägg av avancerad rening.

I laboratorieexperiment är det relativt lätt att ha kontroll över exempelvis temperatur, födoförhållanden och grad av utspädning av avloppsvatten, så att fiskar i såväl kontrollgrupper som exponerade grupper så långt som möjligt exponeras under liknande försöksbetingelser. I fältförsök, med exempelvis utplacerade burar, är det däremot osäkert att kontrollfiskar i referensvatten har samma temperatur, mattillgång och vattenförhållanden som de fiskar som lever i eller placeras i burar utanför reningsverk, där den exakta utspädningen av avloppsvattnet dessutom inte är känd. En fördel med fältstudier är emellertid att de reflekterar den verkliga exponeringen.

Utspädningsförhållandet i en recipient spelar en stor roll för vilka koncentrationer av läkemedel och andra oönskade kemikalier som vattenlevande organismer exponeras för. Givet att reningen inte är fullständig, är det exempelvis en stor skillnad i exponering för vattenlevande organismer i en sötvattenrecipient med liten utspädning av avloppsvattnet från en stor human population jämfört med vattenlevande organismer som exponeras i en marin recipient med stor utspädning av avloppsvattnet från en liten human population.

De regionala skillnaderna i Sverige är också mycket stora. Variationen i sötvattenförekomster är så stor att det är svårt att föra en generell diskussion om fiskens tillstånd i dessa olika miljöer. Samtidigt vet vi att situationen är problematisk för ett flertal fiskarter i Östersjön. Inte minst bestånden av exempelvis torskfiskar ligger på historiskt låga nivåer [28].

Tillståndet för olika fiskarter är en komplex företeelse, där andra faktorer som övergödning och överfiske spelar en stor roll, men det går inte att avfärda att exponering för kemikalier är en betydande faktor för fiskarnas tillstånd, i alla fall på regional nivå. Här spelar sannolikt utsläpp av kemikalier från kommunala reningsverk en betydande roll för den totala kemikaliebelastningen, även om kemikalier också når recipienter via till exempel avrinning från åkermark och långväga transport via luften. Ett införande av mer avancerad rening på svenska kommunala reningsverk bidrar inte nödvändigtvis till ett snabbt förbättrat tillstånd för fiskar och andra vattenlevande organismer men innebär däremot att den totala negativa belastningen som härrör från kemikalier skulle minska.

De vattenlevande organismer som har studerats i de ingående vetenskapliga artiklarna utgör inte en fullständig representation av komplexiteten och diversiteten som finns i ett naturligt ekosystem i Sverige. Icke desto mindre så är det sammantagna antalet och diversiteten av organismer som studerats väldigt god i jämförelse med hur riskbedömningar av enskilda kemikalier utförs inom EU, där i normalfallet en representant från vardera primärproducent (bakterier och alger), primärkonsument (kräftdjur och insekter) och sekundärkonsument (exempelvis fisk) studeras.

Även diversiteten av testvariabler är tämligen stor i underlaget, inte minst vad gäller fisk. Här har studierna sammantaget fokuserat på en lång rad centrala fysiologiska processer och parametrar, såsom aktivering av proteiner, enzymer och gener, metaboliska förändringar i blodplasma, histologiska förändringar, fysiologiska attribut, men också på testvariabler som har fokus på kritiska levnadstadier och skeenden, såsom reproduktion, könsmognad, utveckling, könskvoter, embryotoxicitet och beteendeförändringar.

I primärproducenter och primärkonsumenter har fokus framför allt varit på dödlighet, tillväxt och utveckling men även ämnesomsättning och fysiologiska attribut har studerats. Sammantaget återspeglar detta tämligen väl den komplexitet och diversitet i arter, livsstadier och fysiologiska funktioner som finns i ett svenskt akvatiskt ekosystem.

En aspekt som saknas är tänkbara effekter som kan uppstå via interaktioner mellan arter i ett samhälle eller ekosystem eftersom de flesta studier är genomföra med enskilda organismer i laborativ miljö. Inte heller beteende har studerats i särskilt stor utsträckning. Beteendeförändringar har visat sig kunna vara en känslig testvariabel för läkemedel med till exempel ångestdämpande verkansmekanism i laboratorieförsök med fisk [13, 65], även om det senare har visat sig vara svårt att upprepa i försök där fiskarnas lever i sin naturliga miljö [21].

En annan typ av studier som saknas är kartläggningar av makro-och mikrobiota-samhällen i både vatten och i sediment upp-och nedströms kommunala reningsverk. Sådana studier gjorda utanför Sverige har kunnat demonstrera positiva effekter efter införande av ozonering som reningsteknik [14, 66].

Slutsatserna från denna översikt måste beaktas i skenet av alla olikheter i de ingående artiklarna men samtidigt är det en styrka att trots detta pekar en överväldigande del av resultaten i samma riktning, vilket är fallet med ett flertal av de utfallsvariabler som studerats och analyserats på framför allt fisk.

Internationella effektstudier har visat att renat kommunalt avloppsvatten påverkar exponerad akvatisk biota, och att dessa effekter helt eller till stor del kan reduceras via avancerad rening med ozon eller aktiverat kol [66]. Det finns även en hel del studier som visar att behandling med ozon eller aktiverat kol avskiljer kemikalier från avloppsvatten [43, 66].

Vetenskapliga resultat, baserade på försök i andra länder än Sverige, har påvisat liknade effekter på fiskar som i vår översikt vad gäller indikation på exponering för toxiska substanser (dioxiner). Detsamma gäller även resultat som avser tecken på östrogenexponering [30, 62, 64].

Studier som redovisar försök från andra länder än Sverige visar i vissa fall dessutom på allvarliga reproduktionsstörningar, som till exempel intersex och nedsatt fertilitet, i olika fiskarter som lever i anslutning till kommunala reningsverk [30, 62, 64]. Ingen av studierna i vår översikt har dock undersökt förekomst av intersex eller fertilitet hos vilda fiskpopulationer exponerade för avloppsvatten.

7.3 Koppling till substanser

Vi vet sedan lång tid tillbaka att läkemedelsrester, men också pesticider, kosmetika, rengöringsprodukter och industriella kemikalier, återfinns i svenska avloppsvatten. Även om alla dessa kemikalier inte nödvändigtvis har en specifik verkan vid låga koncentrationer, finns idag en allt större medvetenhet om kombinationseffekter av kemikalier [57]. Likväl, så har de vattenlevande organismer i de inkluderade studierna varit exponerade för komplexa kemikalieblandningar i form av avloppsvatten.

Det finns studier [19] som visar på stora skillnader i upptag av ett och samma läkemedel i fisk då exponeringen skett antingen via avloppsvatten eller rent kontrollvatten, med högre upptag via avloppsvatten. Detta indikerar att de ekotoxikologiska effekter som studerats i de studier som ingår i översikten kan antas utgöra ett relevant mått på kombinationseffekter, även om det inte går att fastställa kausalitet mellan observerade effekter och de kemikalier som orsakat dessa effekter.

Även om syftet med denna översikt inte har varit att identifiera specifika kemikalier i avloppsvattnet, som antingen var för sig eller i blandning påverkar vattenlevande organismer, har flera av studierna påvisat effekter som är direkt kopplade till exempelvis hormonellt aktiva substanser i avloppsvatten.

7.4 Beslutskontext

Vi vet från en lång rad studier att mer avancerade reningsmetoder tar bort en stor del av oönskade kemikalier från avloppsvatten [17, 66]. Det är också väl undersökt att de östrogenlika effekter som observerats i fisk, kopplat till exponering för såväl syntetiska och kroppsegna hormoner som industriella kemikalier med en östrogenlik påverkan, renas bort med ozonering och aktiverat kol som tillägg till konventionell rening.

Historien har lärt oss att avloppsvatten, med dess komplexa sammansättning och källor, med stor sannolikhet innehåller många kemikalier som vi ännu inte känner till utgör en miljörisk. Bred, avancerad rening har således potential att hantera även sådana okända risker, vilka dessutom är svåra att hantera via så kallat uppströmsarbete som går ut på att minska inflödet till reningsverken. Läkemedel är ett bra exempel på detta, eftersom det kan vara svårt att minska inflödet av läkemedelssubstanser utan att samtidigt göra avkall på bästa möjliga medicinska behandling. Med avancerad rening kan miljöriskerna med de allra flesta läkemedel minska [66].

Ett antal länder, med Schweiz och Tyskland i framkant, har påbörjat ett storskaligt arbete med att installera avancerad rening i kommunala reningsverk. Schweiz har numera lagstiftning som anger att alla kommunala reningsverk som tar emot avloppsvatten från över 80 000 personekvivalenter ska uppgraderas med tilläggsmetoder i form av aktiverat kol eller ozon. Även om det i Tyskland ännu inte finns någon lagstiftning som reglerar införandet av mer avancerad rening finns ett stort antal fullskaleanläggningar i drift. Nederländerna och Frankrike är ytterligare två länder som infört avancerade reningstekniker på reningsverk [15, 17].

I Sverige har Tekniska verken i Linköping byggt landets första permanenta fullskaliga ozonreningsanläggning vid Nykvarns avloppsreningsverk. Detta med en ambition att ta bort 90 procent av de läkemedelsrester som når reningsverket, och därmed skydda den närliggande vattenmiljön. Införandet av en förbättrad rening kommer dock till en ökad kostnad. Investering och drift av avancerad rening behöver bekostas av stat eller kommun eller genom att alla vattenkonsumenter får betala ett högre pris för det vatten som används i enskilda hushåll och i företag.

Det finns stora regionala skillnader i Sverige vad gäller kostnader för vatten- och avloppshantering [45], och investering i avancerad rening kommer innebära en samhällsekonomisk kostnad. Det kan också få fördelningsekonomiska effekter, som kan innebära att svaga grupper behöver kompenseras. I rapportdelen om den samhällsekonomiska analysen som kompletterar den här översikten utvecklas resonemanget ytterligare.

Ovan nämnda satsningar visar på att det redan i dag finns tekniker som fungerar i fullskala. Även om vi idag, genom nya strategier och mer omfattande och skarpare lagstiftning, har helt andra förutsättningar att minimera risker med kemikalier inom EU än tidigare, så är det långt kvar innan merparten av de kemikalier som används i samhället är säkra och hållbara. Här är det inte minst

viktigt att beakta de kemikalier som når EU via importerade varor eftersom information om innehåll av farliga ämnen i material och produkter är mycket bristfällig [32, 33]. Att uppgradera reningsverken i Sverige med avancerad rening kan vara ett alternativ till de lösningar som krävs för att nå en giftfri miljö. Prioriteringar bör i så fall göras baserat på såväl reningsverkens storlek, utspädningen i recipienter och recipienters olika känslighet.

Sammanfattningsvis så är vår översikt en del av ett beslutsunderlag men på grund av att det vetenskapliga underlaget behöver förstärkas med ytterligare forskning behövs andra delar beaktas när beslut ska fattas, så som kemikaliebelastning och recipienters känslighet samt relevant internationell forskning med liknande sammansättning av avloppsvattnet och populationstäthet som Sverige.

8 Ordförklaringar

Dödlighet/överlevnad	Observationer av döda respektive levande organismer i en population. Används vanligtvis i standardiserade ekotoxikologiska studier där exponeringen är akut (dvs kort exponeringstid för höga doser/koncentrationer).
Tillväxt/tillväxthämning	Observationer av förändringar av till exempel antal organismer/biomassa över tid. Används vanligtvis i standardiserade ekotoxikologiska studier där exponeringen är akut till subkronisk (dvs kort till medellång exponeringstid för doser/koncentrationer som inte orsakar dödlighet). Individuell tillväxt beskriver hur individer utvecklas över tid, antingen som ökning i till exempel vikt eller volym.
Populationstillväxt	Observationer av hur en population utvecklas i antal över tid. Normalt en samlingsvariabel som kombinerar tillväxt, reproduktionsframgång och dödlighet/överlevnad hos individer i populationen. Beskrivs ofta som en hastighet.
Utveckling	Observationer av utveckling av specifika vävnader eller stadier äver tid.
Metabolism	Kan omfatta studier av till exempel fettsyra-metabolism och lipidhalt i en organism, som kan påverkas vid många typer av toxicitet.
Konditionsindex	Observationer av vikt, längd, ålder på hela organismer eller vikt/storlek på specifika organ. Kan kombineras i olika konditionsindex, såsom GSI, LSI, BMI. Liver somatiskt index (LSI) mäts i levervikt per kroppsvikt och är ett grovt mått på hur en organism kan ha påverkats för exponering av toxiska substanser då leverns storlek och funktion kan ha ändrats, till exempel ökar leverns storlek vid kraftig östrogenexponering då levern börjar producera stora mängder vitellogenin. Kemikalier kan också minska kroppsegen östrogenproduktion vilket i sin tur kan leda till minskad vitellogeninproduktion och minskad leverstorlek hos honor. Den kan också påverkas i storlek mer direkt av olika kemikalier då levern är involverad i avgiftning av många ämnen.
Antibiotikaresistens	Bakterier som är motståndskraftiga mot ett eller flera antibiotika.
Beteende	Observationer av förändringar i beteende, till exempel sim- eller rörelseaktivitet. Exponerade organismer jämförs med en kontrollgrupp.
Missbildningar	Observationer av förändringar i specifika vävnader och extremiteter.
Inhibering av bioluminiscens	Observationer av förändringar i förmågan hos till exempel bakterier att producera och emittera ljus.

Genetisk differentiering	Genetiska förändringar
Östrogenliknande påverkan	Observationer av vitellogenin och zona pellucida protein (ZP). Vitellogenin-protein produceras normalt endast i honor men vid östrogen exponering ökar nivåerna av vitellogenin protein i både juvenila honor och hannar. Zona pellucida består av glykoproteinerna ZP1, ZP2, ZP3 samt ZP4 och är ett skyddande glykoproteinmembran runt äggceller som behövs för att spermierna ska fastna på ägget. Ett alternativ till att mäta själva proteinerna är att mäta mRNA-nivåer, dvs transskript av generna som kodar för att cellerna ska kunna producera antingen vitellogenin eller ZP proteiner. LSI och gonadosomatisk index (GSI) används också som ett östrogenliknande mått, även om LSI och GSI även kan påverkas av mycket annat än östrogen påverkan.
Störning av reproduktionshormoner samt reproduktion	
	Observationer av förändringar i kroppsegna hormoner som till exempel östrogen, testosteron, som i sin tur kan var stakt kopplade till GSI eftersom gonaderna dels producerar dessa hormoner, dels så styrs tillväxten av gonaderna direkt och indirekt av könssteroider. Andra relevanta observationer innefattar proteiner (så som carbonyl reductase/2013-hydroxysteroid dehydrogenase (CR/2013-HSD) och gener viktiga för gonadutveckling (utveckling av äggstockar och testiklar). Observationer som har med reproduktion att göra är kopplade till kläckningstid, könsmognad, lekframgång, fekunditet (fortplantningskapacitet), äggproduktion och antalet befruktade ägg.
Dioxinliknande effekter	Observationer av dioxinliknande effekter fångas upp genom biomarkörer som indikerar att en exponering av dioxinlika substanser har skett. Till denna grupp av biomarkörer EROD, CYP1A och lever somatiskt index (LSI). Genen som kodar för EROD enzymet kallas CYP1A; extern stimuli i form av exponering av stabila organiska ämnen aktiverar transkription av CYP1A-genen, d.v.s. genen översätts från DNA till mRNA. Utifrån CYP1A-mRNAt producerar cellerna EROD-enzymer.
Oxidativ stress och påverkan på ”avgiftningssystem”	
	Observationer av enzymer som är centrala för att skydda mot oxidativ stress (produktion av reaktiva syreföreningar som skadar celler eller organ), till exempel enzymerna glutathione reductase (GR) och glutathione S-transferease (GST). Även antioxidanter som en del av försvaret mot reaktiva oxidanter samt en grupp enzymer (till exempel PNA-O-demethylase, BP-och EM-N-demethylase) som tillhör det s.k. MFO-systemet, (mixed-function oxidase) studeras, liksom halten av cytochrome P-450, NADPH cytochrome c reduktas-aktivitet, LSI och proteininnehåll i mikrosomer.

9 Referenser

1. Akande MG, Norrgren L, Stefan O (2010) Effects of sewage effluents on some reproductive parameters in adult Zebra fish (Danio rerio). Biol Med 2:12-16
2. Akande MG, Orn S, Norrgren L (2010) Toxicological evaluation of some sewage effluents with the aid of the Zebra fish sexual development test. International Journal of Pharmaceutical and Biological Research (IJPBR) 1:95-100
3. Albertsson E, Kling P, Gunnarsson L, Larsson DGJ, Forlin L (2007) Proteomic analyses indicate induction of hepatic carbonyl reductase/20 beta-hydroxysteroid dehydrogenase B in rainbow trout exposed to sewage effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety 68:33-39
4. Albertsson E, Larsson DGJ, Förlin L (2010) Induction of hepatic carbonyl reductase/20β-hydroxysteroid dehydrogenase mRNA in rainbow trout downstream from sewage treatment works-Possible roles of aryl hydrocarbon receptor agonists and oxidative stress. Aquat Toxicol 97:243-249
5. Almroth BC, Albertsson E, Sturve J, Forlin L (2008) Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. Ecotoxicology and Environmental Safety 70:370-378
6. Almroth BC, Sturve J, Forlin L (2008) Oxidative damage in rainbow trout caged in a polluted river. Marine Environmental Research 66:90-91
7. Baresel C, Magnér J, Magnusson K, Olshammar M (2017) Tekniska lösningar för avancerad refining av avloppsvatten. IVL svenska miljöinsitutet, Stockholm
8. Beijer K, Bjorlenius B, Shaik S, Lindberg RH, Brunstrom B, Brandt I (2017) Removal of pharmaceuticals and unspecified contaminants in sewage treatment effluents by activated carbon filtration and ozonation: Evaluation using biomarker responses and chemical analysis. Chemosphere 176:342-351
9. Berglund B, Fick J, Lindgren PE (2015) URBAN WASTEWATER EFFLUENT INCREASES ANTIBIOTIC RESISTANCE GENE CONCENTRATIONS IN A RECEIVING NORTHERN EUROPEAN RIVER. Environmental Toxicology and Chemistry 34:192-196
10. Bernhardt ES, Rosi EJ, Gessner MO (2017) Synthetic chemicals as agents of global change. Frontiers Ecol Envir 15:84-90
11. Bighiu MA, Halden AN, Goedkoop W, Ottoson J (2019) Assessing microbial contamination and antibiotic resistant bacteria using zebra mussels (Dreissena polymorpha). Science of the Total Environment 650:2141-2149
12. Breitholtz M, Naslund M, Strae D, Borg H, Grabic R, Fick J (2012) An evaluation of free water surface wetlands as tertiary sewage water treatment of micro-pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety 78:63-71
13. Brodin T, Fick J, Jonsson M, Klaminder J (2013) Dilute Concentrations of a Psychiatric Drug Alter Behavior of Fish from Natural Populations. Science 339:814-815
14. Bundschuh M, Pierstorf R, Schreiber WH, Schulz R (2011) Positive Effects of Wastewater Ozonation Displayed by in Situ Bioassays in the Receiving Stream. Environmental Science & Technology 45:3774-3780
15. Cimbritz M, Tumlin S, Hagman M, Dimitrova I, Hey G, Mases M, Åstrand N, la Cour Jansen J (2016) Rening från läkemedelsrester och andra mikroföroreningar - en kunskapssammanställning. Svenskt Vatten AB
16. Cimbritz M, Mattsson A (2018) Reningstekniker för läkemedel och mikroföroreningar i avloppsvatten (No. 2018:7). Havs- och vattenmyndigheten, Göteborg
17. Cimbritz M, Mattsson A (2018) Treatment techniques for pharmaceuticals and micropollutants in wastewater. Description of eight projects that have received funding from the Marine and

Aquatic Environment Grant for 2014-2017. Swedish Agency for Marine and Water Management
18. Coll C, Bier R, Li Z, Langenheder S, Gorokhova E, Sobek A (2020) Association between Aquatic Micropollutant Dissipation and River Sediment Bacterial Communities. Environmental Science & Technology 54:14380
19. Cuklev F, Fick J, Cvijovic M, Kristiansson E, Förlin L, Larsson DGJ (2012) Does ketoprofen or diclofenac pose the lowest risk to fish? Journal of Hazardous Materials 229-230:100-106
20. Cuklev F, Gunnarsson L, Cvijovic M, Kristiansson E, Rutgersson C, Bjorlenius B, Larsson DGJ (2012) Global hepatic gene expression in rainbow trout exposed to sewage effluents: A comparison of different sewage treatment technologies. Science of the Total Environment 427:106-114
21. Fahlman J, Hellström G, Jonsson M, Fick JB, Rosvall M, Klaminder J (2021) Impacts of Oxazepam on Perch (Perca fluviatilis) Behavior: Fish Familiarized to Lake Conditions Do Not Show Predicted Anti-anxiety Response. Environmental Science & Technology 55:3624-3633
22. Falås P, Baillon-Dhumez A, Andersen HR, Ledin A, la Cour Jansen J (2012) Suspended biofilm carrier and activated sludge removal of acidic pharmaceuticals. Water Research 46:1167-1175
23. Förlin L, Hansson T (1982) Effects of Treated Municipal Wastewater on the Hepatic, Xenobiotic, and Steroid Metabolism in Trout. Ecotoxicology and Environmental Safety 6:41-48
24. Gunnarsson L, Jauhiainen A, Kristiansson E, Nerman O, Larsson DGJ (2008) Evolutionary Conservation of Human Drug Targets in Organisms used for Environmental Risk Assessments. Environmental Science & Technology 42:5807-5813
25. Gunnarsson L, Adolfsson-Erici M, Bjorlenius B, Rutgersson C, Forlin L, Larsson DGJ (2009) Comparison of six different sewage treatment processes-Reduction of estrogenic substances and effects on gene expression in exposed male fish. Science of the Total Environment 407:5235-5242
26. Hagberg A, Gupta S, Rzhepishevska O, Fick J, Burmølle M, Ramstedt M (2021) Do environmental pharmaceuticals affect the composition of bacterial communities in a freshwater stream? A case study of the Knivsta river in the south of Sweden. Science of the Total Environment 763:N.PAG-N.PAG
27. Hapeshi E, Lambrianides A, Koutsoftas P, Kastanos E, Michael C, Fatta-Kassinos D (2013) Investigating the fate of iodinated X-ray contrast media iohexol and diatrizoate during microbial degradation in an MBBR system treating urban wastewater. Environ Sci Pollut Res 20:3592-3606
28. Havsmiljöinstitutet (2021) Så mår våra vatten. Fisk/fiske. [Accessed 2021 12 07]. Available from: https://www.sverigesvattenmiljo.se/sa-mar-vara-vatten/2021/sammanfattningar/0/0/7.
29. Ingre-Khans E, Ågerstrand M, Beronius A, Rudén C (2019) Reliability and relevance evaluations of REACH data. Toxicol Res 8:46-56
30. Jobling S, Williams R, Johnson A, Taylor A, Gross-Sorokin M, Nolan M, Tyler CR, van Aerle R, Santos E, Brighty G (2006) Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. Environmental health perspectives 114:32-39
31. Joensson ME, Gao K, Olsson JA, Goldstone JV, Brandt I (2010) Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. Aquat Toxicol 98:311-321
32. Kemikalieinspektionen (2019) Fördjupad utvärdering av Giftfri miljö 2019. Analys och bedömning av miljökvalitetsmålet Giftfri miljö. Kemikalieinspektionen, Rapport 2/19
33. Kemikalieinspektionen (2020) Vägen mot en giftfri vardag. Slutredovisning av handlingsplan för en giftfri vardag. Kemikalieinspektionen, Rapport 4/20

34. Khan FA, Soderquist B, Jass J (2019) Prevalence and diversity of antibiotic resistance genes in Swedish aquatic environments impacted by household and hospital wastewater. Frontiers in Microbiology 10
35. Kraupner N, Ebmeyer S, Hutinel M, Fick J, Flach C-F, Larsson DGJ (2020) Selective concentrations for trimethoprim resistance in aquatic environments. Environment International 144:N.PAG-N.PAG
36. Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Pettersson M, Berg AH, Olsson PE, Forlin L (1999) Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? Aquat Toxicol 45:91-97
37. Larsson J, Lonn M, Lind EE, Swiezak J, Smolarz K, Grahn M (2016) Sewage treatment plant associated genetic differentiation in the blue mussel from the Baltic Sea and Swedish west coast. Peerj 4
38. Larsson J, Smolarz K, Swiezak J, Turower M, Czerniawska N, Grahn M (2018) Multi biomarker analysis of pollution effect on resident populations of blue mussels from the Baltic Sea. Aquat Toxicol 198:240-256
39. Linderoth M, Hansson T, Liewenborg B, Sundberg H, Noaksson E, Hanson M, Zebuhr Y, Balk L (2006) Basic physiological biomarkers in adult female perch (Perca fluviatilis) in a chronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden). Marine Pollution Bulletin 53:437-450
40. Lundstrom E, Adolfsson-Erici M, Alsberg T, Bjorlenius B, Eklund B, Laven M, Breitholtz M (2010) Characterization of additional sewage treatment technologies: Ecotoxicological effects and levels of selected pharmaceuticals, hormones and endocrine disruptors. Ecotoxicology and Environmental Safety 73:1612-1619
41. Lundstrom E, Bjorlenius B, Brinkmann M, Hollert H, Persson JO, Breitholtz M (2010) Comparison of six sewage effluents treated with different treatment technologies-Population level responses in the harpacticoid copepod Nitocra spinipes. Aquat Toxicol 96:298-307
42. Naturvårdsverket (2010) Kemisk och biologisk karakterisering av punktutsläpp till vatten. En handbok med vägledning om bestämning av egenskaperna hos utsläpp av avloppsvatten. Naturvårdsverket, Stockholm
43. Naturvårdsverket (2017) Avancerad rening av avloppsvatten för avskiljning av läkemedelsrester och andra oönskade ämnen: behov, teknik och konsekvenser: redovisning av ett regeringsuppdrag. Naturvårdsverket, Stockholm
44. Naturvårdsverket (2020) Investeringsbidrag till läkemedelsrening vid avloppsreningsverk 2020. Naturvårdsverket, Stockholm
45. Nils Holgerson-gruppen (2021) Fastigheten Nils Holgerssons underbara resa genom Sverige - en avgiftsstudie för 2021. Nils Holgersson-gruppen, Stockholm
46. Noaksson E, Linderoth M, Gustavsson B, Zebuhr Y, Balk L (2005) Reproductive status in female perch (Perca fluviatilis) outside a sewage treatment plant processing leachate from a refuse dump. Science of the Total Environment 340:97-112
47. Noaksson E, Linderoth M, Tjarnlund U, Balk L (2005) Toxicological effects and reproductive impairments in female perch (Perca fluviatilis) exposed to leachate from Swedish refuse dumps. Aquat Toxicol 75:162-177
48. Pettersson M, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Forlin L, Asplund L (2006) Fish bile used to detect estrogenic substances in treated sewage water. Science of the Total Environment 366:174-186
49. Pettersson M, Hahlbeck E, Katsiadaki I, Asplund L, Bengtsson BE (2007) Survey of estrogenic and androgenic disruption in Swedish coastal waters by the analysis of bile fluid from perch and biomarkers in the three-spined stickleback. Marine Pollution Bulletin 54:1868-1880
50. Pohl J, Bjorlenius B, Brodin T, Carlsson G, Fick J, Larsson DGJ, Norrgren L, Orn S (2018) Effects of ozonated sewage effluent on reproduction and behavioral endpoints in zebrafish (Danio rerio). Aquat Toxicol 200:93-101

51. Randefelt J (2019) Spillvattenvåtmarkers reningseffekt på aktiva läkemedelssubstanser. Uppsala universitet, Teknisk-naturvetenskapliga vetenskapsområdet, Geovetenskapliga sektionen, Institutionen för geovetenskaper
52. Riksdagsförvaltningen (2018) Förordning (2018:495) om bidrag för rening av avloppsvatten från läkemedelsrester. Miljödepartementet, Regeringskansliet, Stockholm
53. Rudén C, Brandt I, Fick J, Björlenius B, Breitholtz M, Ågerstrand M, Sumpter JP (2016) Identification and Reduction of Environmental Risks Caused by Human Pharmaceuticals - MistraPharma Research 2008–2015. Final Report, Stockholm
54. Samuelsson LM, Björlenius B, Förlin L, Larsson DGJ (2011) Reproducible 1H NMR-based metabolomic responses in fish exposed to different sewage effluents in two separate studies. Environ Sci Technol 45:1703-1710
55. Späth J, Nording M, Lindberg R, Brodin T, Jansson S, Yang J, Wan D, Hammock B, Fick J (2020) Novel metabolomic method to assess the effect-based removal efficiency of advanced wastewater treatment techniques. Environ Chem 17:1-5
56. Späth J, Brodin T, Cerveny D, Lindberg R, Fick J, Nording ML (2021) Oxylipins at intermediate larval stages of damselfly Coenagrion hastulatum as biochemical biomarkers for anthropogenic pollution. Environ Sci Pollut Res 28:27629-27638
57. Statens offentliga utredningar (2019) Framtidens kemikaliekontroll - Hantering av kombinationseffekter och gruppvis bedömning av ämnen. Betänkande av Utredningen om Kombinationseffekter och gruppvis hantering av ämnen. Statens offentliga utredningar: SOU 2019:45. Norstedts juridik, Stockholm
58. Sturve J, Almroth BC, Forlin L (2008) Oxidative stress in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to sewage treatment plant effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety 70:446-452
59. Svenskt Vatten (2020) Investeringsbehov och framtida kostnader för kommunalt vatten och avlopp – en analys av investeringsbehov 2020-2040. Svenskt Vatten
60. Svenskt Vatten (2021) Beställargrupp för minskade utsläpp av läkemedelsrester, mikroplaster och andra föroreningar via avloppsreningsverk – Redovisning 2021. Rapport R2021-5. Svenskt Vatten
61. Svenson A, Örn S, Allard A-S, Viktor T, Parkkonen J, Olsson P-E, Förlin L, Norrgren L (2002) Estrogenicity of domestic and industrial effluents in Sweden. Aquatic Ecosystem Health & Management 5:423-434
62. Tetreault GR, Bennett CJ, Shires K, Knight B, Servos MR, McMaster ME (2011) Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. Aquat Toxicol 104:278-290
63. United Nations Environment Programme (2019) Global Chemicals Outlook II: from legacies to innovative solutions. United Nations Environment Programme (UNEP) Geneva
64. Vajda AM, Barber LB, Gray JL, Lopez EM, Woodling JD, Norris DO (2008) Reproductive Disruption in Fish Downstream from an Estrogenic Wastewater Effluent. Environmental Science & Technology 42:3407-3414
65. Vinterstare J (2021) Defence on Demand: A physiological perspective on phenotypic plasticity in anti-predator traits. Department of Biology, Faculty of Science, Lund University, Lund
66. Völker J, Stapf M, Miehe U, Wagner M (2019) Systematic review of toxicity removal by advanced wastewater treatment technologies via ozonation and activated carbon. Environ Sci Technol 53:7215-7233
67. Wahlberg C, Björlenius B, Ek M, Paxeus N, Gårdstam L (2008) Avloppsreningsverkens förmåga att ta hand om läkemedelsrester och andra farliga ämnen: redovisning av regeringsuppdrag: 512-386-06 Rm. Naturvårdsverket, Stockholm
68. Wahlberg C, Björlenius B, Paxéus N (2010) Läkemedelsrester i Stockholms vattenmiljö. Förekomst, förebyggande åtgärder och rening av avloppsvatten. Stockholm

69. Wang H, Sikora P, Rutgersson C, Lindh M, Brodin T, Björlenius B, Larsson DGJ, Norder H (2018) Differential removal of human pathogenic viruses from sewage by conventional and ozone treatments. Int J Hyg Environ Health 221:479-488
70. Zakrisson A, Larsson U (2014) Regulation of heterocyst frequency in Baltic Sea Aphanizomenon sp. Journal of Plankton Research 36:1357-1367

FORMAS

Ett forskningsråd för hållbar utveckling
A Research Council for Sustainable Development

Formas är ett statligt forskningsråd för hållbar utveckling. Vi finansierar forskning och innovation, utvecklar strategier, gör analyser och utvärderar. Våra verksamhetsområden finns inom miljö, areella näringar och samhällsbyggande. Vi genomför forskningssammanställningar som syftar till att underlätta för Sverige att nå våra miljömål. Därutöver kommunicerar vi om forskning och forskningsresultat.

Forskningsrådet för miljö, areella näringar och samhällsbyggande, Formas
The Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Spatial Planning
Box 1206, 111 82 Stockholm, Drottninggatan 89
Tel: 08 775 40 00, E-post: registrator@formas.se, www.formas.se