



UPPSALA
UNIVERSITET

De endokrinrubbande läkemedlens och östrogeners miljöpåverkan

- en akut verklighet



Oscar Hagberg

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2010
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Under de senaste tio åren har rapporter rörande läkemedel i miljön ökat närmast exponentiellt. Den största andelen av de läkemedel som når ut i miljön går via avloppsvattnet till reningsverken, det finns därmed goda förutsättningar att förhindra utflödet genom nya reningstekniker. Det är dock tveksamt om det är ekonomiskt försvarbart att investera i de nya teknikerna som finns idag. Det forskas intensivt om östrogener som potentiella endokrinrubbande medel med effekter som t.ex. nedsatt fertilitet hos fiskar. Det behövs kostnadseffektiva metoder för att upptäcka och analysera endokrina effekter i miljön och ny teknik är under utveckling.

Inledning

Läkemedel utsöndras efter användning i dess ursprungliga form eller som metaboliter (en mer vattenlöslig nedbrytningsprodukt) och når akvatiska system via flera olika vägar, främst från förtäring följt av exkretion till avloppssystemen. Kommunalt avloppsvatten är därmed den största källan för läkemedel innan de når ytvattnet (Fent *et al.* 2006). När det första svenska reningsverket byggdes i Skara 1897 bestod det av ett enkelt filtreringsgaller vilket filtrerade ut större flytande föremål och slam, sedan dess har mycket hänt.

Även om reningsverken har utvecklats mycket och flera reningssteg adderats så visar flera studier på senare år att många mikroföroreningar såsom läkemedel och hormoner har hittats i utflöden från reningsverk, ytvatten och grundvatten (Kolpin *et al.* 2002). Forskare har uppmätt låga koncentrationer av läkemedel i dricksvatten, men att dessa skulle ha negativa hälsoeffekter på friska människor är dock tveksamt (Schulman *et al.* 2002, Bruce *et al.* 2010). Däremot går det inte att utesluta att kombinationer av flera läkemedel samt andra endokrinrubbande medel tillsammans på lång sikt kan utgöra en fara för utsatta grupper: gravida kvinnor, barn och sjuka (Kostich & Lazorchak 2008, Bruce *et al.* 2010).

Halling-Sörensen *et al.* (1998) konstaterade i den första riktigt övergripiga översiktsartikeln om läkemedlens förekomst i miljön och dess effekter att kunskaperna inom området var praktiskt taget obefintliga. Sedan dess har forskningen intensifierats inom området och syftet med den här uppsatsen är att ge en sammanställning av den nyvunna kunskapen med inriktning på naturliga och syntetiska östrogener.

Östrogener har i flera studier visat sig vara toxiska i naturen (Tyler & Jobling 2008). Att ett ämne är toxiskt (giftigt) innebär att det kan orsaka oönskade biologiska effekter i en eller flera organismer. Graden av dessa effekter kan variera med storleken på dosen eller koncentrationen av ämnet som organismen utsätts för. I miljöriskbedömningssammanhang talar man om två typer av toxicitet, akut och kronisk. Med akut toxicitet menar man effekter som uppträder vid en engångsexponering av ett ämne, ofta med en hög dos. Kronisk toxicitet handlar om effekter som påvisas vid långvarig exponering, oftast med en låg dos av ett eller flera ämnen (Läkemedelsverket 2004).

Det endokrina systemet fyller livsnödvändiga funktioner i människan och andra djur. Det (endokrina systemet) reglerar flera invecklade processer i kroppen som berör beteende, tillväxt, reproduktion och all form av stressrespons. Det endokrina systemet kommunicerar och kontrollerar olika kroppsdelar med hjälp av signaler och för att upprätthålla en stabil inre

miljö i kroppen s.k. homeostas. Om det endokrina systemet rubbas leder det uteslutande till sjukdom med nedsatta organfunktioner som en av påföljderna (Damstra *et al.* 2002).

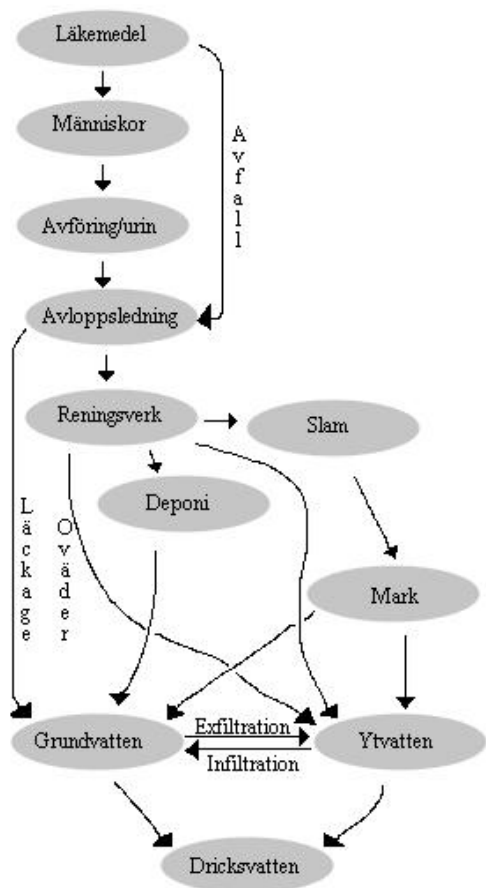
Ett endokrinrubbande ämne är en substans som förändrar funktioner som är kontrollerade av det endokrina systemet (Damstra *et al.* 2002). Östrogen har uppvisat endokrina effekter i låga koncentrationer, t.ex. har etinylöstradiol visat upp effekter i koncentrationer under 1 ng/l (Thorpe *et al.* 2003). P.g.a. östrogens potential att verka endokrinrubbande är det av intresse att undersöka deras effekter på miljön samt att hindra det fortsatta utflödet av dem till naturen.

Mina övergripande frågeställningar innefattar vilka de naturliga och syntetiska östrogenerna är och hur de akut och kroniskt påverkar vår miljö. Kan människan ta skada av läkemedelsrester från vatten och mat? Klarar våra reningsverk att rena vatten från läkemedel och hur skulle det kunna bli bättre? Vad gör man för tester på nya läkemedel för att se vad de kan ha för miljöpåverkan?

Läkemedels väg till miljön

Det finns ett antal möjligheter för läkemedel att nå akvatiska system (Figur 1). Huvudvägen för läkemedel avsedda för mänskligt bruk går efter användning via urin och avföring via avloppsledningar till reningsverk. Rutsch *et al.* (2006) presenterar flera studier i Europeiska städer som indikerar att mellan 1-13 % av avloppsvattnet läcker ut från avloppssystemen. Läckorna kan mycket väl förorena grundvattnet och leda till att läkemedelsrester kan förekomma i dricksvattnen.

Många samhällen har ett sammankopplat avrinningssystem, d.v.s. vatten från dränering och regn hamnar i avloppssystemet. Det innebär att t.ex. att vid oväder eller när stora massor snö smälter kommer avloppssystemen leda större mängder vatten, på kort tid, än vad reningsverken klarar av att rena. Det leder till bräddningar, d.v.s. att orenat avloppsvatten strömmar ut direkt i vattenrecipienten (vattendraget i anslutning till reningsverkets utflöde). De städer som har duplikatsystem, d.v.s. två skilda system för avlopp och avrinningsvatten får inte detta problem. Nackdelen med separata system är den höga kostnaden för utbyggnad vilket gör att de flesta äldre bostadsområden samt stadskärnor har sammankopplade system (Björlenius & Wahlberg 2005).



Figur 1. Läkemedels väg ut i naturen, omritad från Stamm *et al.* (2008).

Reningsverkens betydelse

Kvaliteten på utgående vatten från reningsverk mäts med avseende på vilken kvantitet av kväve, fosfor, patogener, partikelmateria och metalljoner som renats från inflödet till utflödet av reningsverket. Dagens reningsverk är designade för att rena dessa komponenter, och gör det bra. Däremot klarar de inte att på ett tillfredställande sätt rena vattnet från andra föroreningar som t.ex. läkemedel (Zorita *et al.* 2009).

Historik

Det första reningsverket i Sverige byggdes 1897 i Skara men det var först på 30-talet reningsverken började bli vanligt förekommande. Innan dess släpptes allt avloppsvatten ut direkt i sjöar och vattendrag. Reningsverken renade vattnet från stora flytande partiklar samt slam genom ett gallerfilter, *mekanisk rening*, man insåg dock snart att det behövdes ytterligare rening eftersom bl.a. bakterier i stor mängd förekom i det utgående vattnet. På 50–60-talet infördes steg två i reningen, *biologisk rening*, för att rena vattnet från organiskt material. Under senare hälften av 1900-talet upptäckte man problematiken med övergödning vilket ledde till steg tre i reningsprocessen, *kemisk rening* (Björleinius & Wahlberg 2005).

Den senaste övergripande utbyggnaden av reningsverken i Sverige är ett extra kvävereduktionssteg i den biologiska reningen, detta för att kunna möta de nya utsläppskraven som uppkommit efter upptäckten av döda havsbottnar i Östersjön (Baltic Sea 2020 2009). De reningsverk som har utbyggd kväverening har i allmänhet också bäst reningseffektivitet när

det gäller andra mikroförureningar som t.ex. läkemedel, vilket troligen beror på en förhöjd slamålder. Bakterierna i aktivslamsteget har en uppehållstid på 10-25 dygn i de reningsverk med utbyggd kväverening jämfört med uppehållstiden på 2-4 dygn i de reningsverk som saknar utbyggd kväverening (Naturvårdsverket 2008).

Konventionell rening

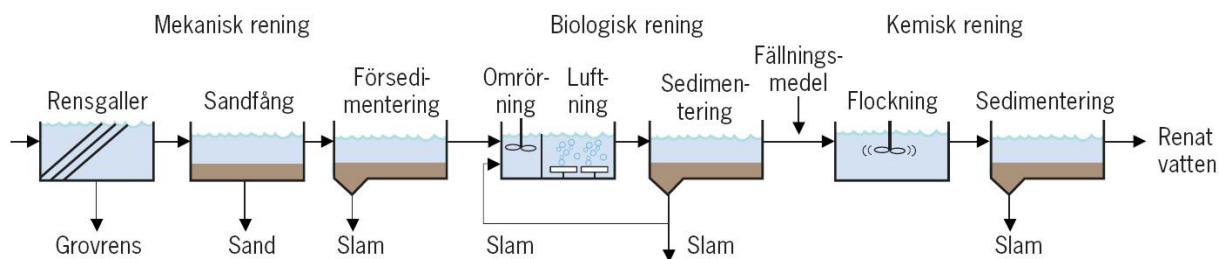
Ett avloppsreningsverk har en reningsdel för avloppsvatten och en del för slam. Avloppsslammet leds (i större reningsverk) från de olika sedimenteringsbassängerna till s.k. röt-kammare där det stabiliseras och rötas (bryts ner i syrefri miljö) varvid användbar biogas (metangas) bildas och koldioxid. Reningsdelen för avloppsvatten består av de tre tidigare nämnda stegen: mekanisk, biologisk och kemisk rening (Figur 2).

Den mekaniska reningen består av i följande ordning ett galler, ett sandfång och en försedimenteringsbassäng. Denna förbehandling tar bort partiklar som kan orsaka igensättningar senare i reningsverket. Gallret består av metallstavar monterade på ett bestämt avstånd från varandra, traditionella galler 20-30 mm och de nya fingallren 3-10 mm. Gallren rensas automatiskt och rensat pressas och transporteras vidare till deponi. Sandfångens uppgift är att avskilja sand, frön och kaffesump, men inte slam. Det finns både luftade och oluftade sandfång, i det förstnämnda sker flera processer, t.ex. utfällning av fosfor med hjälp av t.ex. järnsulfat. Sanden som tas bort skickas till en sandtvätt varefter transport till deponi sker (Naturvårdsverket 2008). Den mekaniska reningen är det billigaste steget som därmed ger mest rening för pengarna, dock långt ifrån tillräckligt för att uppnå de reningskrav som finns.

I reningsverkens biosteg utnyttjas mikroorganismer, främst olika bakterier, för att vidare rena det förbehandlade vattnet. I det biologiska steget omvandlas organiskt material, t.ex. omvandlas kväve till kvävgas vilket sedan återgår till atmosfären. Den vanligaste reningstekniken som används i biosteget kallas aktivslamprocess. I aktivslambassängen sker en kontinuerlig inblåsning av luft vilket inte bara tillgodoser god syretillgång utan också håller s.k. flockar, bestående av bakterier, flytande. Det organiska materialet bryts ner av bakterierna och då bildas koldioxid, vatten samt ny biomassa. Den nyuppsbyggda biomassan tas ur systemet efter sedimenteringsbassängen i form av överskottslam. En stor del av slammet återanvänds i slambassängerna för att bibehålla en jämn slamnivå (Naturvårdsverket 2008).

Fosfor är ett näringsämne som kraftigt kan övergöda sjöar och vattendrag. I det kemiska steget tillsätter man ett fällningsmedel oftast i form av ett metallsalt, t.ex. järnsulfat (FeSO_4) som fångar upp och klumpar ihop sig med fosfor, de bildar s.k. flockar. Dessa flockar sjunker till botten i den efterföljande sedimentationsbassängen och bildar slam som tas bort. Den kemiska fällningen kan ske på flera sätt i ett reningsverk. Om fällningen sker innan det biologiska steget kallas den för förfällning. Simultanfällning kallas den fällning som sker direkt i biosteget. I större reningsverk är det dock vanligast att den kemiska fällningen sker i ett eget avslutande steg, s.k. efterfällning (Figur 2) (Naturvårdsverket 2008).

Vissa reningsverk i Sverige har lagt till ett avslutande sandfilter för att möjliggöra en ännu effektivare fosforrening, detta på grund av strängare reningskrav.



Figur 2. Schematisk bild över ett konventionellt reningsverk. Från Svenskt Vatten (2007) med tillstånd från upphovsrättsinnehavaren.

Endokrinrubbande medel

Hallgren (2009) visar i sin avhandling att ämnen som påverkar det endokrina systemet är svåra att upptäcka och att det är problematiskt att beräkna vilken skada de orsakar i naturen. Dessa miljögifter verkar inte toxiskt på det sättet att de orsakar akut massdöd på en eller flera arter, utan snarare verkar den cocktail av kemikalier som når vårt ytvatten kroniskt, d.v.s. skador som visar sig över lång tid t.ex. som infertilitet.

De östrogeniska egenskaperna hos en substans bestäms av förmågan att kunna binda till östrogenreceptorn och därmed blockera eller hämma aktiviteten av naturliga östrogener (Routledge & Sumpter 1997). Östrogenreceptorn hos människan innehåller en öppning i bindningsdomänen som är dubbelt så stor som 17β -östradiol (E2) kräver, vilket är det naturliga östrogen som lättast binder in till östrogenreceptorn, detta leder till att en mängd andra molekyler har god chans att binda in istället för E2 (Brzozowski *et al.* 1997). Även om östrogenreceptorn hos människor och hos akvatiska arter inte har identisk funktion så är det sannolikt att alla vertebrater har liknande bindningsdomäner, alltså kan ämnen utan östrogenisk aktivitet binda till receptorn och orsaka en rad effekter, t.ex. försämrad fertilitet hos en art.

Ett exempel på ett endokrinrubbande ämne som kan binda till östrogenreceptorn och utöva östrogenliknande effekter är insektsbekämpningsmedlet DDT (diklordifenyltrikloretan). Trots att användandet av substansen förbjöds i många länder på 70-talet, p.g.a. upptäckten av bl.a. fertilitetsnedsättning hos djur, påträffas kemikalien samt rester av den fortfarande över hela världen (Jirsová *et al.* 2010). Den ena förklaringen till att DDT trots förbudet fortfarande påträffas är kemikaliens höga fettlöslighet (Pontolillo & Eganhouse 2001). Den andra förklaringen till förekomsten av DDT i miljön är ämnets höga stabilitet med dess långa halveringstid på över 10 år (Jirsová *et al.* 2010).

Östrogener

Både naturliga och syntetiska östrogener har väldigt låga Henrys'lag konstantvärden, vilket utgör ett mått på ett ämnes flyktighet och därmed indikerar ett ämnes tendens att förångas. Därför kan man utesluta att östrogener försvinner från avloppssystemet genom förångning (Tabell 1) (Racz & Goel 2009). Syrakonstanten pK_a (det pH-värdet då syran är dissocierad till 50 procent) avslöjar ett ämnes pH värde, de naturliga och syntetiska östrogenerna har liknande höga pK_a värden (Tabell 1). Ämnen med låga pK_a värden adsorberas lättare till fast materiel i reningsverken vilket kan betyda att adsorption inte är den viktigaste reningsprocessen för östrogener (Joss *et al.* 2005).

Naturliga

Liksom alla gifter är det storleken på dosen som faller avgörandet, det är därför viktigt att även diskutera riskerna med ämnen som naturligt förekommer hos människor och djur. De naturliga könshormonerna diskuteras som eventuella endokrinrubbande ämnen i två aspekter. För det första, liksom för läkemedel, är huvudvägen för östrogener det kommunala avloppsvattnet. De kommunala reningsverken samlar således in östrogener utsöndrade från en större befolkad yta vilket leder till kraftig hormonell belastning på en begränsad yta. Den andra aspekten är att den hormonella belastningen kan bli stor i jordbruksområden med stora boskapsflockar, framförallt från dräktiga nötkreatur. Lange *et al.* (2002) visar att den totala östrogenmängden utsöndrad från samtliga boskapsdjur i EU motsvarar 33 ton per år. Ytvatten i sådana områden riskerar att utsättas för naturliga östrogener i tillräckligt höga koncentrationer för att verka endokrinrubbande (Hallgren 2009).

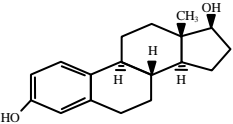
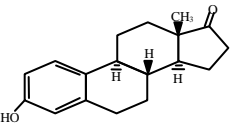
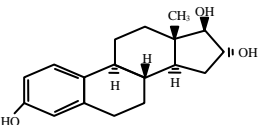
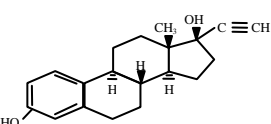
De naturliga östrogenerna är 17β -östradiol (E2), östron (E1) och östriol (E3), samtliga är primärt kvinnliga könshormoner. De olika östrogenerna delar samma grundstruktur och det är de funktionella grupperna som skiljer dem åt (Tabell 1). De naturliga könshormonerna har olika potential med avseende på östrogenisk aktivitet och E2 är som tidigare nämnt den östrogen som har den bästa förmågan att binda till östrogenreceptorn (Brzozowski *et al.* 1997). Det är därför vanligt att jämföra den östrogeniska aktiviteten hos ett endokrinrubbande medel genom att sätta den i relation till E2. E1 och E3 har lägre relativ östrogenisk aktivitet än E2 (Tabell 1).

Syntetiska

Östradiol finns inte bara naturligt i människor och djur utan det produceras också konstgjort för att användas i hormonersättningsterapi. Oralt intag av naturligt östradiol är inte speciellt effektivt då levern bryter ned en stor del av den intagna dosen. För medicinskt bruk framställer man syntetiskt östrogen som till skillnad från de naturliga östrogenerna är svårnedbrytbart och förblir intakt efter att ha passerat levern. Den aktiva komponenten i de flesta p-piller är 17α -etinylostradiol (EE2) (Tabell 1). EE2 delar struktur med E2 med skillnaden att EE2 har en etylgrupp som ökar motståndskraften mot nedbrytning och möjliggör att substansen är biologiskt aktivt en längre tid i kroppen (Hallgren 2009).

Den konstgjorda stabiliteten hos EE2 leder till en mer oönskad stabilitet i miljön. Enligt en rapport från läkemedelsverket var den årliga försäljningen av EE2 år 2002 i Sverige endast 6,4 kg vilket kan jämföras med försäljningssiffrorna för ett annat receptbelagt läkemedelsämne tetracyklin (antibiotika för behandling av bl.a. acne) på 2400 kg (Läkemedelsverket 2004). EE2 har en högre östrogenisk aktivitet än det naturliga E2 och detta tillsammans med att EE2 är mer biologiskt stabil ökar substansens betydelse som ett endokrinrubbande medel trots den relativt lilla mängden i omlopp (Tabell 1). EE2 är, liksom de naturliga östrogenerna, hydrofobisk och ämnets $\log K_{ow}$ värde på 4,15 kan jämföras med det beständiga DDT:s $\log K_{ow}$ värde på 6,04. $\log K_{ow}$ är fördelningskonstanten mellan oktanol och vatten. Oktanol är ett organiskt lösningsmedel och om ett ämne löser sig väl i oktanol kan ämnet även antas vara lösligt i organiskt material. Därför används $\log K_{ow}$ ofta när man bedömer potentiella risker med en viss substans, många kända endokrinrubbande ämnen är fettlösliga med $\log K_{ow}$ värden mellan 1,5-6. Fettlösligheten gör att endokrinrubbande ämnen omsätts relativt enkelt i levande organismer (Rastall *et al.* 2006). Det höga K_{ow} värdet för EE2 ökar intresset för ämnets betydelse som endokrinrubbande substans då det även ger en indikation på ämnets förmåga att vara biologiskt aktivt under lång tid.

Tabell 1. Östrogenernas struktur samt kemiska och fysikaliska egenskaper. pKa är syrakonstanten för de olika hormonerna, log K_{ow} är fördelningskonstanten mellan oktanol och vatten (ett mått på fettlösligheten hos ett ämne). Henrys konstant relaterar till ämnets flyktighet och indikerar hur snabbt ett ämne kan evaporera från vatten till gasform. Den östrogeniska potensen är relativ E2.

Endokrinrubbande medel	Struktur ^a	pKa ^a	Log K _{ow} ^b	Henrys lag konstant (atm m ³ mol ⁻¹) ^b	Relativ östrogenisk aktivitet ^b
17β-östradiol (E2)					
Naturligt könshormon		10,71 ± 0,02	3,94	3,64 x 10 ⁻¹⁰	1,0
Östron (E1)					
Naturligt könshormon		10,77 ± 0,02	3,43	3,80 x 10 ⁻¹¹	0,20
Östriol (E3)					
Naturligt könshormon		10,38 ± 0,02	2,81	3,80 x 10 ⁻¹⁰	0,01
17α-etinylöstradiol (EE2)					
Syntetiskt könshormon		10,40 ± 0,01	4,15	7,94 x 10 ⁻¹²	1,32

^a Prankerd (2007). ^b Racz & Goel (2009).

Östrogenerns öde i miljön

Läkemedel är konstruerade för att nå ett visst mål i kroppen och är därför generellt stabila molekyler som är svårnedbrytbara – det medför att läkemedel har en viss motståndskraft när de nått naturen (Lundström *et al.* 2010). Eftersom hormonrubbande medel har visat sig ha endokrina effekter vid extremt låga koncentrationer så är det av stor vikt att rena avloppsvattnet från dessa i så hög grad som möjligt (Hallgren 2009).

Zorita *et al.* (2009) utförde en studie i Kristianstads reningsverk för att undersöka i vilket steg i reningsprocessen som läkemedel renades mest. Studien visade att den effektivaste reningen av läkemedel överlag skedde i de mekaniska och biologiska stegen. Reningen av hormoner i studien är mer komplicerad och visade sig både minska och öka genom de olika stegen i reningsprocessen (Tabell 2). Östron minskade efter det mekaniska steget samtidigt som östradiol ökade vilket är svårt att förklara. Efter det biologiska steget minskade östradiol medan östron ökade markant vilket troligtvis beror på omvandling av östradiol till östron.

Östron renas ytterligare i det kemiska steget och framförallt i det avslutande sandfiltret med en total avlägsning på 78 %. Östradiol koncentrationerna i de avslutande stegen var för låga för att kunna detekteras och som följd kan en totalavlägsning på minst 47 % fastslås (Zorita *et al.* 2009).

Reningen av de östrogena ämnena, östron och östradiol, i Kristianstad uppvisade betydligt högre effektivitet än en liknande studie gjord i Italien (Castiglioni *et al.* 2006). Reningsverken i den Italienska studien saknade kemisk rening och det avslutande sandfiltret vilket förklarar skillnaden eftersom en stor del av reningen sker där. Östron halterna i Italien var till och med högre i utflödet (6,4 mg/dag/1000 anslutna invånare) än i inflödet (5,4 mg/dag/1000 anslutna invånare) vilket troligtvis berodde på att omvandlingsprocesser skett från E2 till E1.

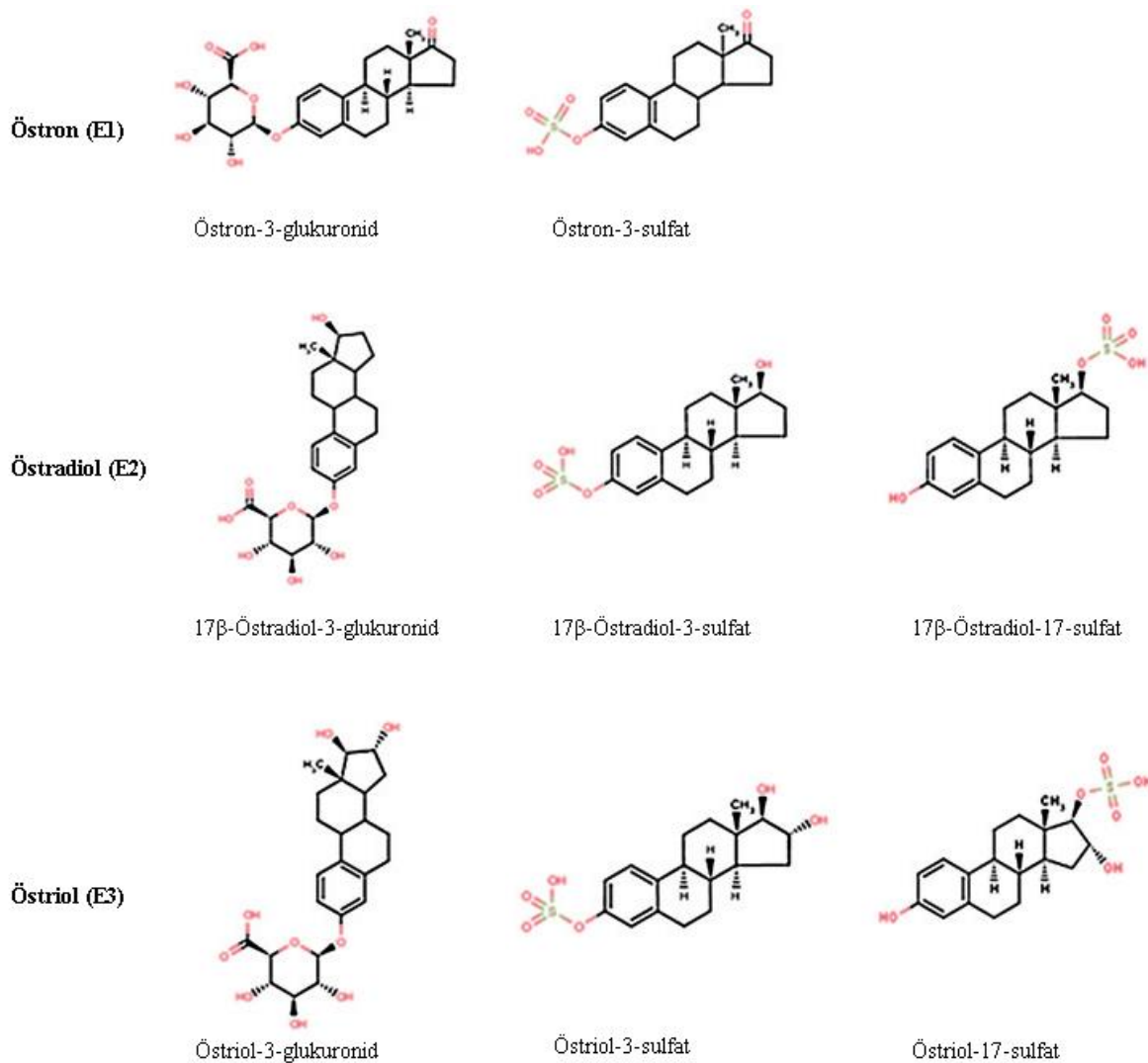
Tabell 2. Koncentrationer (ng/l) och standardavvikelser för östron och östradiol före och efter olika reningssteg, nd står för omätbar data (n = 3) (Zorita *et al.* 2009).

Hormon	Inflöde	Mekanisk	Biologisk	Kemisk	Sandfilter	Total rening (%)
Östron	14,5 ± 4,5	9,8 ± 7,9	70,0 ± 10,0	43,5 ± 3,5	3,0 ± 3,4	78
Östradiol	3,2 ± 4,1	9,2 ± 3,5	2,5 ± 2,7	nd	nd	> 47

Reningsprocesser

I avloppsvatten förekommer läkemedelsrester dels i oförändrad form och som omvandlingsprodukter, metaboliter. För att kroppen ska kunna utsöndra läkemedel enklare omvandlas de till mer vattenlösliga metaboliter. Även mikroorganismer i reningsverken kan omvandla substanser till metaboliter, men om de processerna är mycket okänt. Östrogen kan omvandlas till s.k. e Fas 2-metaboliter genom en konjugeringsprocess vilket innebär att en polär molekyl, t.ex. en glukuronsyra (lik glukos men är en karboxylsyra) eller en sulfatmolekyl kopplas på östrogenerna och bildar ett s.k. konjugat (Figur 3) (Alsberg *et al.* 2009). Fas 2-metaboliter bildas i levern med hjälp av ett flertal enzymer och kroppen kan då via urin och avföring utsöndra läkemedlen i form av de mer vattenlösliga konjugaten.

Alsberg *et al.* (2009) utförde en studie på uppdrag av Stockholm Vatten om metaboliters förekomst i avloppsvatten där ett resultat var att varken glukuronid- eller sulfatkonjugat detekterades i reningsverkens ingående vatten, vilket tros bero på att dessa konjugat spricker, d.v.s. återgår till moderssubstanserna (E1, E2, EE2 & E3) innan de når fram till reningsverken. Enzymet β -glukuronidas bryter ner glukuronidkonjugaten och tillbakaomvandlar de till ursprungssubstanserna. β -glukuronidas återfinns i bakterier som är vanligt förekommande i avloppsvatten vilket förklarar varför konjugaten inte påvisas i det ingående vattnet (Johnson & Sumpter 2001).



Figur 3. Strukturformler över de mer vattenlösliga konjugat som bildas utifrån de naturliga östrogenerna. Ombildningen sker i kroppen och/eller i reningsverken. Omritad från Racz & Goel (2009).

Den reduktion av läkemedel, d.v.s. minskningen av ett ämne från inflödet till utflödet i reningsverken som sker innefattar avskiljning och/eller nedbrytning. Reduktion av ett ämne betyder inte att ämnet försvinner, utan det omvandlas till mindre aktiva komponenter och/eller binds till slam. De viktigaste processerna som sker när det gäller östrogenrening är adsorption och biologisk nedbrytning. Reningsprocesserna är komplicerade och kan ske i flera steg, t.ex. sker den biologiska nedbrytningen av E2 först till E1 och sen från E1 till andra nedbrytningsprodukter (Wahlberg *et al.* 2010).

Adsorption

Adsorption är en process där ett ämne binder in till fast materia (i detta fall slam) och på så sätt kan tas ut ur systemet. Tack vare östrogeners höga fettlöslighet är det troligt att de kan adsorberas i aktiva slamprocesser, men flera studier visar att adsorption oftast står för mindre än 10 % av östrogenreduktionen i reningsverken. T.ex. presenterar Wahlberg *et al.* (2010) att andelen E1 i slam av mängden inkommande via avloppsvattnet endast var 4,6%, motsvarande för E2 var 4,4% och för EE2 mindre än 2,4%. Adsorption är troligtvis inte den viktigaste processen när det gäller östrogenrening.

Biologisk nedbrytning

Biologisk nedbrytning är den bakomliggande process som har visat sig stå för den största östrogenreningen i reningsverken (Andersen *et al.* 2003). Begreppet biologisk nedbrytning består av mekanismer som innefattar att östrogener används som kolkälla av bakterier och s.k. samverkande metabolism. Generellt är de naturliga östrogenerna mer mottagliga för biologisk nedbrytning än EE2. Forskare tror att etinylgruppen på EE2 ger upphov till en sterisk effekt. Kemiskt innebär en sterisk effekt att atomer upptar en viss yta i rymden vilket i detta fall omöjliggör för enzymer att primärt ”angripa” den funktionella gruppen (Weber *et al.* 2005).

Det finns flera studier som undersöker möjligheten för bakterier att använda östrogener direkt som kolkälla (energi) och omvandla dessa till t.ex. koldioxid och vatten. Stumpe & Marschner (2009) visade stora skillnader i nedbrytningen av östrogener i olika sorters jordar. Detta berodde inte på mikrobiell aktivitet, pH eller adsorptionsförmåga. Jordens förmåga att bryta ner östrogen beror huvudsakligen på vilken blandning av bakteriepopulationer den innehar.

Yoshimoto *et al.* (2004) undersökte ett flertal bakteriestammar, framodlade ur aktivt slam, och deras förmåga att använda östrogener som kolkälla. De hittade fyra bakteriestammar som hade förmågan att bryta ned samtliga östrogener (E1, E2, E3 & EE2). Efter 24 timmars nedbrytning kunde de uppmäta att den östrogeniska aktiviteten i proven sänkts till 1 %. De flesta nedbrytningsprodukterna är okända men den sänkta östrogeniska aktiviteten indikerar att nedbrytningsprodukterna som bildats är östrogeniskt inaktiva. Förhoppningen är att de framodlade bakteriestammarna kan användas i större koncentrerade mängder i de biologiska stegen för att öka östrogenreningen i dagens reningsverk (Yoshimoto *et al.* 2004).

Weber *et al.* (2005) visade i en undersökning att den blandning av bakteriestammar som finns i reningsverkens aktiva slam endast klarar av att omvandla E2 till E1 men att de sedan saknade förmåga omvandla E1 till andra inaktiva nedbrytningsprodukter, vilket förklarar varför E1 koncentrationer i reningsverkens utflöde ofta är höga. Orsaken till att inte E1 omvandlas kan förklaras av samverkande metabolism vilket sker i närvaro av enzym som inte har som primär funktion att bryta ned östrogener, t.ex. mono- och dioxygenas (Racz & Goel 2009).

Ny reningsteknik

Breitholtz & Larsson (2009) utförde tester av ny reningsteknik vid Sjöstadverket och Henriksdals reningsverk. De sju metoder som undersöktes var konventionell rening, konventionell rening med sandfilter, membranbioreaktorer (MBR), ozonbehandling, biofilmsprocesser (MBBR), UV/H₂O₂ (väteperoxid) och aktivt kol. Undersökningens fokus var att ta reda på hur pass bra de olika metoderna lyckades rena avloppsvattnet från mikroföroreningar (bl.a. läkemedel och östrogener).

I studien användes flera olika arter för att spegla ett ekosystem. Till att börja med utfördes ett tillväxthämningstest på en alg (*Ceramium*) med kort tillväxttid. Kräftdjuret (*Nitocra*) användes till att testa dödligheten hos vuxna individer samt att studera artens larvutveckling, reproduktionsframgång och populationstillväxt. Flera fiskarter användes också i undersökningen, zebrafisk (*Danio rerio*), öring (*Salmo trutta*) och regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*). Ett flertal tester utfördes på zebrafisk, forskarna undersökte bl.a. kläckningsframgång (av ägg) och dödlighet hos embryon. Zebrafiskens könsutveckling och reproduktionsframgång studerades också. Regnbåge testades främst genom att jämföra relativ hjärt- och leverstorlek men man studerade även kroppsegna nedbrytningsprodukter i

blodplasman. I studien undersökte man även öringens beteende, bl.a. vid födosökandet. Vilken teknik som var mest kostnadseffektiv togs inte hänsyn till i denna undersökning. Resultaten från undersökningen sammanfattas i Tabell 3.

Tabell 3. Sammanfattning av resultatet från Breitholtz & Larssons (2009) undersökning av ny reningsteknik.

Reningsteknik	Resultat
Konventionell rening	Den konventionella reningstekniken är inte tillräcklig för att rena avloppsvattnet.
Konventionell rening med sandfilter	Förbättring jämfört med konventionell reningen utan sandfilter. Risk kvarstår att avloppsvattnet kan orsaka skadliga effekter hos vattenlevande organismer
Membranbioreaktorer (MBR)	Minskar förekomsten av östrogena ämnen men saknar förmåga att rena från övriga ämnen.
Ozonbehandling	Låg dos (5 mg/l) reducerar kraftigt förekomsten av kemikalier och eliminerar de flesta skadliga biologiska effekterna. Hög dos (15 mg/l) verkar kunna generera omvandlingsprodukter som kan påverka framförallt fisk.
Biofilmsprocesser (MBBR)	Minskar förekomsten av östrogena ämnen men verkar ha måttlig effekt på andra kemikalier. Inga uppenbara vinster med att kombinera ozonrening med MBBR-teknik.
UV/H ₂ O ₂	Minskar förekomsten av östrogena ämnen och reducerar förekomsten av läkemedelsrester bättre än MBR och MBBR men betydligt sämre än ozonrening och rening med aktivt kol.
Aktivt kol	Reducerar kraftigt förekomsten av kemikalier och eliminerar näst intill alla skadliga biologiska effekter.

Mätmetoder och Teknik

Enkelt uttryckt finns det två huvudstrategier för att övervaka endokrinrubbande medel i vatten. Den ena innebär att man med hjälp av kemisk analys kan uppmäta koncentrationen av en substans med endokrinrubbande effekt. I den andra strategin använder man biologiska metoder för att mäta den totala östrogenbelastningen (Hallgren 2009).

Att använda kemisk analys som metod gör att man blir beroende av avancerad teknik med dyra provkostnader som följd. Östrogener återfinns ofta i låga koncentrationer (ng/l) och för att kvantifiera dem krävs gaskromatografi efterföljt av masspektrometri (GC-MS/MS) vilket kostar upp mot 1 miljon kr. Andra nackdelar med kemisk analys, förutom de höga

kostnaderna, är att provanalysen ofta går långsamt eftersom provtagningen, provförberedelsen och dataanalysen måste justeras för att passa just den substans man är intresserad av (Hallgren 2009). Problematiken med kemisk analys är att i praktiken innehåller ett vattenprov mängder av olika substanser som kan vara av intresse, beroende på hur man hanterar provet kan man inte med kemisk analys identifiera samtliga av dessa. Enligt Hallgren (2009) är det effektivare att använda biologiska metoder för att räkna ut den totala östrogenbelastningen och i de fall man finner en hög belastning sedan gå vidare med kemisk analys.

Med biologiska metoder kan man uppmäta den totala östrogeniska belastningen i ett prov men då vet man inte vilken sammansättning eller vilka substanser/kemikalier som är bidragande. Fördelen är att det går att göra stora provanalyser till ett rimligt pris. Ett Biologiskt test (bioassay) har fler fördelar förutom den billigare kostnaden och att man kan uppmäta den totala östrogenbelastningen. I ett biologiskt test kan en substans som ännu inte identifierats som endokrinrubbande upptäckas, substansen hade i en kemisk analys förbisetts.

Det finns tre olika nivåer av biologiska tester. Den första nivån är ett icke-cellulärt test, i detta test finns inget cellmembran som substansen måste tränga igenom för att kunna ge en respons. Den andra nivån handlar om ett cellulärt test, när det gäller östrogener använder man sig ofta av mänskliga bröstcancer celler eftersom bröstcancertumörer influeras av östrogen. I den sista nivån använder man en hel organism i det biologiska testet. Oftast använder man fiskarter som är vanliga testorganismer där det finns utarbetade standardiserade akuta och kroniska test t.ex. zebrafisk (*Danio rerio*). Ett biologiskt test med en hel organism är det enda sättet att studera endokrina effekter över flera generationer.

Miljöpåverkan

Många studier har visat att läkemedel finns i både renat vatten, ytvatten, grundvatten och till och med dricksvatten (Kolpin *et al.* 2002). Däremot vet man väldigt lite om de ekotoxikologiska effekterna av läkemedelspridningen i akvatiska system. De akvatiska organismerna är extra känsliga eftersom de är exponerade av renat avloppsvatten under deras hela livscykel. Särskilt lite vet man om de kroniska effekterna (Fent *et al.* 2006).

Utöver att det är storleken på dosen som avgör toxiciteten, som nämnts tidigare, kan tilläggas att fel komponent på fel plats och vid fel tillfälle också avgör graden av toxicitet. Könshormoner från en art, t.ex. nötkreatur, kan orsaka effekter hos andra arter som t.ex. fisk. Alla vertebrater utsöndrar könshormoner men för de fiskarter som leker under en begränsad period av året är det kritiskt att den hormonella signalen inte cirkulerar i blodet året om. Det kan t.ex. leda till att lekbeteendet sker för tidigt eller helt uteblir (Hallgren 2009).

Orsaken till att könshormoner kan utgöra ett hot för akvatiska system har en evolutionär förklaring. Det endokrina systemet hos olika vertebrater är väldigt snarlikt varandra och några av de mest uråldriga könsfunktionerna tros vara regleringen av könsorgan och fortplantning med hjälp av östrogener via östrogenreceptorn. Även om evolutionen har skapat många skillnader i östrogenreceptorn har östrogen en väsentlig roll i fortplantningen både hos människan och hos mer primitiva djur som t.ex. tagghudingar (familjen Echinodermata) (Thornton 2004).

Miljöriskbedömning

”Vid en miljöriskbedömning bedöms risken för skada på miljön genom att bestämma storleken av utsläppet och vilka effekter detta utsläpp kan ha på ekosystemens struktur och funktioner” (Läkemedelsverket 2004). När det gäller läkemedel gör man miljöriskbedömningar utifrån ekotoxikologiska effekter (d.v.s. kemikaliers skadliga effekter på ekosystem). Att utföra tester på hela ekosystem är praktiskt svårt att genomföra vilket har lett till att man i miljöriskbedömningar ofta använder sig av ett antal modellorganismer. Begränsningen av antalet testorganismer leder till att man får uppskatta riskerna med ett ämne utifrån vilka effekter man observerat. För att lansera ett nytt läkemedel på marknaden krävs det att det nya medlet klarar ett antal standardiserade ekotoxikologiska tester, bl.a. biologiska test (Läkemedelsverket 2004).

En akut påverkan kan ske vid ett utsläpp av en giftig kemikalie i någon del av miljön där konsekvensen blir massdöd av ett ekosystems olika organismer. En sådan katastrof är av lokal omfattning och är lätt att upptäcka men orsaken går inte alltid att härleda. De tester som görs idag innan ett nytt läkemedel godkänns är ofta av akut karaktär t.ex. ett test där man testar dödligheten hos en vattenlevande organism med olika koncentrationer av ett ämne sedan beräknar man de koncentrationer som har medfört att 50 % av arten dött (LC_{50}). Om LC_{50} för en substans är < 1 mg/l bedöms substansen som mycket giftigt, är $LC_{50} > 1$ men < 10 mg/l bedöms ämnet som giftigt och är $LC_{50} > 10$ men < 100 mg/l bedöms substansen som skadlig (Läkemedelsverket 2004).

Det vanligaste när det gäller läkemedel är inte att en akut påverkan uppstår utan snarare att en långvarig exponering av ett ämne kan leda till kroniska effekter som tar längre tid och är svårare att upptäcka. När man har upptäckt en påverkan kan det vara svårt att härleda den till en specifik substans eftersom de vattenlevande organismerna vid reningsverkens utflöden exponeras av en mängd olika ämnen samtidigt.

Colman *et al.* (2008) demonstrerade i en studie att zebrafiskar exponerade för EE2 ändrar sitt beteende. Hannarna var mindre aggressiva mot varandra och ägnade inte lika mycket tid till uppvaktning av honor som kontrollgruppen.

Diskussion

Att människor skulle kunna påverkas av östrogener via dricksvattnet är högst osannolikt. Enligt naturvårdsverket (2008) fann man etinylöstradiol i ett av totalt nitton dricksvattenprov. Koncentrationen var 0,4 ng/l i provet vilket kan jämföras med ett lågdos p-piller där koncentrationen är 30 µg. För att nå upp till etinylöstradioldosen i ett enda piller måste man dricka 75 000 liter vatten. Däremot har jag i denna uppsats inte tagit upp riskerna med att få i sig endokrinrubbande medel från föda vilket sannolikt bör utforskas mer.

När det gäller reningen av östrogener är det svårt att dra övergripande slutsatser eftersom alla reningsverk är så pass olika. Det som kan sägas är att östrogenreningen förbättras med en förhöjd slamålder och om reningsverket har ett avslutande sandfilter. Av de nya reningsteknikerna som har utretts verkar aktivt kol och ozonrening vara de alternativ som är de bästa sett ur både ett reningssperspektiv samt ekotoxikologiskt perspektiv. Nackdelar med aktivt kol är att substanserna inte bryts ner utan absorberas i kolet som måste reaktiveras eller förbrännas för att man ska bli av med föroreningarna. Wahlberg *et al.* (2010) har uppskattat kostnaderna för de nya reningsteknikerna och rening med aktivt kol skulle kosta sex gånger

mer än rening med ozon. Om man skulle bygga ut alla reningsverk i Sverige med ozonbehandling uppgår totalkostnaden till 1,2–5,7 miljarder kr/år. För att försvara dessa kostnader behövs mer forskning inom området, enligt Wahlberg *et al.* (2010) vet man just nu för lite för att det ska vara motiverat att satsa pengar i någon av de nya teknikerna.

De tester som nya läkemedel prövas mot är oftast inriktade på akut toxiska effekter (dödlighet) istället för de intressantare kroniska effekterna som läkemedlen kan orsaka. Att införa skärpta krav för testerna av läkemedel kan medföra att det tar längre tid för nya livsviktiga läkemedel att nå ut på marknaden. Det är inte lika enkelt att kräva mer miljöanpassade läkemedel som det är att kräva miljövänliga kemikalier. Människans hälsa kommer antagligen alltid att stå över miljöns bästa.

Det har skett en närmast exponentiell ökning av antalet publicerade artiklar som handlar om läkemedlens miljöpåverkan på 2000-talet jämfört med 90-talet. Det behövs trots detta fortsatt forskning inom området, framförallt inom framtagandet av ny kostnadseffektiv reningsteknik.

Tack

Tack Katariina Kiviniemi Birgersson för handledning under arbetets gång. Tack till kursdeltagare Erik Hartwig för mycket goda råd och kommentarer. Till sist vill jag tacka Cajsa Wahlberg från Stockholm vatten för medgivandet att använda figur tagen från Wahlberg *et al.* (2010) till omslagsbild till denna uppsats.

Referenser

- Alsberg T, Adolfsson-Erici M, Lavén M, Yu Y. 2009. Förekomst av läkemedel och deras metaboliter, samt östrogener, östrogenlika ämnen och triclosan i avloppsvatten som behandlats med moderna reningstekniker. WWW-dokument 2009-12-11: <http://www.radda-sverige.nu/wp-content/uploads/2010/03/Metaboliter.pdf> Hämtad 2010-12-02.
- Andersen H, Siegrist H, Halling-Sørensen B, Ternes TA. 2003. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environmental science and technology* **37**: 4021-4026.
- Baltic Sea 2020. 2009. Utmaning för Östersjön: Övergödning - för mycket av det goda. WWW-dokument 2009-11-12: http://www.balticsea2020.org/attachments/125_Utmaningar_over.pdf. Hämtad 2010-11-18.
- Björnlén B, Wahlberg C. 2005. Avloppsreningsverket – hur fungerar det? I: Bengtsson BE, Gunnarsson B, Wennmalm TWÅ (red). *Läkemedel och miljö*. Apoteket AB, Stockholm.
- Breitholtz M, Larsson J. 2009. Sammanväg ekotoxikologisk bedömning av studier utförda vid Sjöstadverket och Henriksdals reningsverk under 2007 och 2008. WWW-dokument 2009-04-27: http://www.stockholmvatten.se/commondata/rapporter/avlopp/Processer/SVAB_SammanvaegC3%A4gd%20%20bedC3%B6mning.pdf. Hämtad 2010-12-05.
- Bruce GM, Pleus RC, Snyder SA. 2010. Toxicological relevance of pharmaceuticals in drinking water. *Environmental Science Technology* **44**: 5619-5626.
- Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Öhman L, Green GL, Gustafsson JÅ, Carlquist M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**: 753-758.
- Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati F, Calamari D, Zuccato E. 2006. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental science technology* **40**: 357-363.
- Colman JR, Baldwin D, Johnson LL, Scholz NL. 2008. Effects of the synthetic estrogen, 17 α -ethinylestradiol, on aggression and courtship behavior in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **91**: 346-354.
- Damstra T, Barlow S, Bergman Å, Kavlock R, Van Der Kraak G (red.). 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. IPCS- International Program on Chemical Safety. WWW-dokument 2002: http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/. Hämtad 2010-12-12.
- Fent K, Weston AA, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology* **76**: 122-159.
- Hallgren P. 2009. Strategies for monitoring of endocrine disrupting chemicals in aquatic environment. Akademisk avhandling. Lunds universitet.
- Halling-Sørensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Lützhøft HCH, Jörgensen SE. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* **36**: 357-393.
- Jirsová S, Mašata J, Jech L, Zvárová J. 2010. Effect of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl)-ethane (DDT) in follicular fluid on the results of in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) programs. *Fertility and sterility* **93**: 1831-1836.

- Joss A, Keller E, Alder AC, Göbel A, McCardell CS, Ternes T, Siegrist H. 2005. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water research* **39**: 3139-3152.
- Johnson AC, Sumpter JP. 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environmental science & technology* **24**: 4697-4703.
- Kolpin DW, Furlon ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HB. 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental science technology* **36**: 1202-1211.
- Kostich MS, Lazorchak JM. 2008. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. *Science of the total environment* **389**: 329-339.
- Lange IG, Daxenberger A, Schaffer B, Witters G, Ibarreta D, Meyer HHD. 2002. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica chimica acta* **473**: 27-37.
- Lundström E, Adolfsson-Erici M, Alsberg T, Björleinius, Eklund B, Lavén 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.
- Läkemedelsverket. 2004. Miljöpåverkan från läkemedel samt kosmetiska och hygieniska produkter. WWW-dokument 2006-03-17 http://www.lakemedelsverket.se/upload/om-lakemedelsverket/publikationer/040824_miljoupdraget-rapport.pdf. Hämtad 2010-11-18.
- Naturvårdsverket. 2008. Avloppsreningsverkens förmåga att ta hand om läkemedelsrester och andra farliga ämnen. WWW-dokument 2008-02 <http://www.naturvardsverket.se/Documents/publikationer/620-5794-7.pdf>. Hämtad 2010-12-01.
- Pontolillo J, Eganhouse RP. 2001. The Search for Reliable Aqueous Solubility (S_w) and Octanol-Water Partition Coefficient (K_{ow}) Data for Hydrophobic Organic Compounds: DDT and DDE as a Case Study. WWW-dokument 2005-09-01 <http://pubs.usgs.gov/wri/wri014201/>. Hämtad 2010-11-22.
- Prankerd RJ. 2007. Profiles of drug substances, excipients, and related methodology volume 33. 1:a uppl. Elsevier inc.
- Rastall AC, Getting D, Goddard J, Roberts DR, Erdinger L. 2006. A biomimetic approach to the detection and identification of estrogen receptor agonists in surface waters using semipermeable membrane devices (SPMDs) and bioassay-directed chemical analysis. *Environmental Science and Pollution Research* **13**: 257-267
- Racz L, Goel RK. 2009. Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. *Journal of environmental monitoring* **12**: 58-70.
- Routledge EJ, Sumpter JP. 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *The journal of biological chemistry* **272**: 3280-3288.
- Schulman LJ, Sargent EV, Naumann BD, Faria EC, Dolan DG, Wargo JP. 2002. A Human Health Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **8**: 657-680.
- Stamm C, Alder AC, Fenner K, Hollender J, Krauss M, McCardell CS, Ort C, Schneider MK. 2008. Spatial and temporal patterns of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Geography compass* **2**: 920-955.
- Stumpe B, Marschner B. 2009. Factors controlling the biodegradation of 17 β -estradiol, estrone and 17 α -ethinylestradiol in different natural soil. *Chemosphere* **74**: 556-562.
- Svenskt vatten. 2007. Publikation U1, Avloppsteknik 1. Stockholm.

- Thornton JW. 2004. Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America* **98**: 5671-5676.
- Thorpe KL, Cummings RI, Hutchinson TH, Scholze M, Brighty GC, Sumpter JP, Tyler CR. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environment science technology* **37**:1142–1149.
- Tyler CR, Jobling S. 2008. Roach, sex, and gender-bending chemicals: The feminization of wild fish in english rivers. *Bioscience* **58**:1051-1059.
- Wahlberg C, Björlenius B, Paxéus N. 2010. Läkemedelsrester i Stockholms vattenmiljö Förekomst, förebyggande åtgärder och rening av avloppsvatten. WWW-dokument 2010-04-26
<http://www.stockholmvatten.se/commondata/rapporter/avlopp/Processer/lakemedelsrapport-slutrapport.pdf>. Hämtad 2010-11-18.
- Weber S, Leuschner P, Kämpfer P, Dott W, Hollender J. 2005. Degradation of estradiol and ethinyl estradiol by activated sludge and by a defined mixed culture. *Applied microbial and cell physiology* **67**: 106-112.
- Yoshimoto T, Nagai F, Fujimoto J, Watanabe K, Mizukoshi H, Makino T, Kimura K, Saino H, Sawada H, Omura H. 2004. *Applied and environmental microbiology* **70**: 5283-5289.
- Zorita S, Mårtensson L, Mathiasson L. 2009. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Science of the total environment* **407**: 2760-2770.