

*Screening av antibiotika
i avloppsvatten, slam och fisk
under 2002/2003*

Utfört av
Magnus Johansson
Richard Lindberg
Patrik Wennberg
Mats Tysklind
Umeå Universitet

Programområde
Miljögiftssamordning
Kontrakt nr 219 0205

Screening av antibiotika i avloppsvatten, slam och fisk under 2002/2003.

Magnus Johansson, Richard Lindberg, Patrik Wennberg och Mats Tysklind
Miljökemi, Umeå Universitet, 901 87 Umeå
e-post: magnus.johansson@chem.umu.se

Innehållsförteckning

Sammanfattning	3
Inledning	3
Material och metoder	4
Kemikalier	4
Instrumentering	5
Metod för avloppsvatten	6
Metod för slam och sediment	6
Metod för fisk	7
Provtagning	7
Avloppsreningsverken	8
Henriksdal	8
Ryaverken	8
Umeå	9
Kalmar	9
Floda	9
Resultat och diskussion	9
Detektionsgräns och recovery	9
Sjukhusavlopp	11
Avloppsvatten	11
Slam	12
Fisk	13
Sediment	13
Kvalitetssäkring	14
Materialbalanser	15
Slutsatser	16
Referenser	16
Appendix	17

Screening av antibiotika i avloppsvatten, slam och fisk under 2002/2003.

Magnus Johansson, Richard Lindberg, Patrik Wennberg och Mats Tysklind

Miljökemi, Umeå Universitet, 901 87 Umeå

e-post: magnus.johansson@chem.umu.se

Sammanfattning

Tretton olika antibiotika har undersökts i en screeningstudie i Sverige under 2002/2003. Avloppsvatten, slam och fiskprover har ingått i denna studie. Provtagningar har genomförts vid två tillfällen och fem reningsverk av olika karaktärer. Kemiska analysmetoder har utvecklats och validerats för samtliga dessa matriser. För första gången har intern standard metoden (struktur analoger) utnyttjats fullt ut för bestämningar av antibiotika i miljöprover.

Resultaten visar att penicilliner och cefalosporiner har korta halveringstider. Enstaka substanser av dessa grupper har detekterats i 50 % av alla avloppsvattenprover och då endast i undantagsfall i utgående vatten. Fluorokinoloner, trimetoprim och doxycyklin har detekterats i samtliga avloppsvattenprover (20 av 20).

I slam förekommer främst fluorokinoloner och doxycyklin. Fluorokinolonerna förekommer i relativt höga halter (summa fluorokinoloner $\sim 6.5 \text{ mg kg}^{-1}$ TS). Detta kan utgöra en risk om detta material sprids ut i miljön men mer kunskap krävs om dessa substansers mobilitet och toxicitet för att göra denna bedömning.

Inledning

Anledningen till att antibiotika kan utgöra en miljörisk är främst risken för att antibiotika resistenta bakteriestammar kan utvecklas i miljön. Dessa kan sedan spridas till sjukdomsalstrande bakterier och utgöra ett direkt hot mot vår hälsa. Dessutom förändras den naturliga sammansättningen av bakterier ute i miljön och detta kan ha effekter på hela ekosystem. Den årliga förbrukningen av antibiotika i Sverige uppgår till ungefär 100 ton. Av denna mängd står fenoximetylpenicillin (PcV) för ungefär en tredjedel och är således den helt dominerande substansen vad gäller förbrukningsmängd. Vi vet dock att andra egenskaper hos kemiska föreningar är viktiga för att bestämma dess eventuella effekter i miljön. Ett ämnes stabilitet eller persistens är ett exempel på en sådan egenskap. Det finns mycket god information tillgänglig om vad som händer med antibiotika i kroppen men kunskapen är mycket bristfällig om uppträdan i miljön.

Denna screening skall ge en uppfattning om vilka antibiotika som sprids ut i miljön, var i miljön vi kan förvänta oss att återfinna dessa substanser samt i vilka mängder. De flesta antibiotika utsöndras ur kroppen i till stor del oförändrad form via urinen, se tabell 1. Detta innebär att den dominerande transportvägen för antibiotika ut till miljön går via avloppssystemen.

Tabell 1. Antibiotika substanser som har ingått i screening studien, antibiotikatyp, utsöndring, grad av metabolism, förskrivna mängder och stabilitet i miljön.

Substans	Typ	Utsöndring aktiv substans	Metabolism	Massa (kg/y)	Stabilitet i miljön, t _{1/2} (dagar) ⁴
Ciprofloxacin	Fluorokinolon	>40% i urin, oförändrad	till viss del	1894 ¹	101-364
Ofloxacin	Fluorokinolon	via urin	ingen	49 ¹	101-364
Norfloxacin	Fluorokinolon	>25% i urin, oförändrad	till stor del	2379 ¹	101-364
Cefadroxil	Cefalosporin	90% i urin (24 tim)	försumbar	3906 ²	i.u.
Cefuroxim	Cefalosporin	90% i urin inom 6 tim.	obetydlig	3906 ²	i.u.
Amoxicillin	Penicillin	55-70% i urin inom 8 tim.	liten	3056 ³	<1
Ampicillin	Penicillin		obetydlig	190 ³	<1
PcV	Penicillin	30-50% med urin	liten	32472 ³	<1
Metronidazol	Nitroimidazol	galla och urin	till stor del	200 ³	>365
Sulfametoxazol	Sulfonamid	20%, oförändrad	till stor del	1610 ¹	>365
Erytromycin	Makrolid	5% i urin, även i galla och faeces	till viss del	2273 ²	>365
Doxycyklin	Tetracyklin	45% i urin och faeces, aktiv form	Obetydlig	769 ³	>365
Trimetoprim		50% i urin, oförändrad	till viss del	841 ³	20-100

¹ Massa förskriven aktiv substans i Sverige 1994, ref. 1.

² Massa förskriven aktiv substans för antibiotikatyp, t.ex. makrolider, i Sverige 1999.

³ Massa förskriven aktiv substans i Sverige 1999.

⁴ Data har antagits vara lika för varje antibiotikagrupp, uppgifter från ref. 2.

Reningsverken är viktiga platser för att undersöka spridning av antibiotika ut till miljön. Elimineringensgraden i reningsverket är tillsammans med stabiliteten på substansen avgörande för halterna i recipienten. Även halterna i avloppsslam är av stort intresse. Eftersom den stora risken med antibiotikaspridning är utvecklingen av resistens hos bakterier utgör förhöjda halter i slam ett väl så stort hot som ett antibiotiketryck i vattenfasen. De substanser som har ingått i screeningen presenteras kort i tabell 1. Kriterier som har lagts in i bedömningen av urvalet är förskriven mängd, utsöndringsdata, publicerade stabilitetsdata samt att ett antal grupper av antibiotika skulle vara representerade. De kemiska och fysikaliska egenskaperna inom varje grupp är liknande men mellan grupper kan detta vara mycket varierande och därför kommer de olika grupperna troligen att ha olika beteende i miljön.

Material och metoder

Kemikalier

Standard substanserna norfloxacin, ofloxacin, enrofloxacin, diaveridine, cefadroxil, cefuroxim, och cephalexin köptes från Sigma-Aldrich. Ciprofloxacin^b, sulfamethazine^b och demeclocycline^b köptes från ICN Biochemicals. Sulfamethoxazole^c, ampicillin^c, amoxicillin^c,

trimethoprim^c metronidazol^c och doxycycline^c köptes från Duchefa. Från Arcos Organics köptes 2-methyl-5-nitroimidazole^d. Samtliga standarder var analytical grade eller högre renhet. Lösningsmedel och andra kemikalier hade s.k. HPLC grade eller högre renhet. Följande lösningsmedel och kemikalier har använts, tillverkaren ges i parentes acetone (Fluka), diklormetan (Sigma-Aldrich), metanol (J.T. Baker), trietylamin (TEA)(Merck), myrsyra (J.T. Baker) trifluoroättiksyra (TFA)(Merck), svavelsyra, 95% (Merck) tetrabutyl ammoniumhydroxid (TBA)(Sigma-Aldrich), citronsyra (Merck) and dikalium vätefosfat (K_2HPO_4)(Merck) och acetonitril (Fischer Chemicals). Allt vatten som användes var UV bestrålat och av Milli-Q kvalitet.

Instrumentering

En vätskekromatografisk pump (P 4000, Spectra system) för fyra eluenter med en provväxlare och injektor (AS 3000, Spectra System) kopplades till en UV/vis diod array detektor utrustad med sk. flow through cell. En provvolym av 10 μ l injicerades och analyterna separerades på en YMC Hydrosphere C 18 (150 \times 4,6 mm I.D, 5 μ m partikel storlek) kolonn, en YMC Hydrosphere (10 \times 4 mm I.D, 3 μ m partikel storlek) förkolonn användes för att skydda den analytiska kolonnen. Mobilfasen bestod av två eluenter A; vatten and B; acetonitril. Till båda eluenterna sattes 0,1 % (v/v) myrsyra. Flödes hastigheten var 0,8 ml min⁻¹ i en linjär gradient: 0 min; 95/5 A/B, 15 min; 50/50 A/B. Flödet från UV/vis detektorn gick sedan vidare till en jonfälla mass spektrometer LCQ Duo (ThermoFinnigan, San Jose, US) som kördes i MS/MS-mode. Som joniseringskälla användes ett elektro spray interface. Temperaturen på kapillären hölls på 250°C. Andra instrumentparametrar som gas flöden, jonoptiken och fragmenteringsenergies optimerades automatiskt med hjälp av den interna mjukvaran till instrumentet. Dessa parametrar är specifika för instrumentet och varje enskild analyt. För att uppnå maximala antalet mätpunkter för varje substans delades kromatogrammen in i tidsfönster som matchar retentionstiderna för maximalt tre substanser. I varje tidsfönster mättes således maximalt fyra substanser i MS/MS-mode. Instrumentinställningarna ändrades mellan dessa tidsfönster för att uppnå maximal känslighet. Reaktant och produktjoner samt kollisionsenergies för respektive ämne visas i tabell 2, likaså vilken internstandard som använts för respektive analyt.

Tabell 2. Kromatografiska och mass spektrometriska data för de studerade antibiotika substanserna.

Substans	Typ*	t _R , min	m/z reaktantjon	m/z produktjon	kollisionsenergi
enrofloxacin	IS, Fq	8.2	360.1 [M+H] ⁺	316.2 [M-CO ₂ +H] ⁺	28
norfloxacin	Fq	7.5	320.0 [M+H] ⁺	276.2 [M-CO ₂ +H] ⁺	27
ofloxacin	Fq	7.5	362.1 [M+H] ⁺	318.1 [M-CO ₂ +H] ⁺	26
ciprofloxacin	Fq	7.7	332.1 [M+H] ⁺	288.2 [M-CO ₂ +H] ⁺	30
sulfametazine	IS, Su	10.0	279.0 [M+H] ⁺	203.8	28
sulfametoxazole	Su	13.2	254.0 [M+H] ⁺	187.9 [M-H ₂ SO ₄ +H] ⁺	29
diaveridine	IS, Tr	6.0	261.2 [M+H] ⁺	123.1	37
trimetoprim	-	6.5	291.0 [M+H] ⁺	230.1 [M-2CH ₃ O+H] ⁺	38
cefalexin	IS, pe, ce	6.9	347.8 [M+H] ⁺	157.8 [β-lactam cleavage] ⁺	25
amoxicillin	pe	4.5	365.8 [M+H] ⁺	348.8 [M-NH ₃ +H] ⁺	19
ampicillin	pe	6.8	349.9 [M+H] ⁺	159.9 [β-lactam cleavage] ⁺	22
PcV	pe	19.4	349.9 [M+H] ⁺	208.0 [β-lactam cleavage] ⁺	19
cefuroxim	ce	15.2	446.8 [M+Na+H] ⁺	385.6	21
cefadroxil	ce	5.1	363.8 [M+H] ⁺	346.6 [M-H ₂ O+H] ⁺	18
nitroimidazol	IS, Ni	6.1	128.0 [M] ⁺	-	-
metronidazol	Ni	6.7	172.0 [M+H] ⁺	128.0 [M-C ₂ H ₄ OH+H] ⁺	27
demeclocyklin	IS, Tc, Ma	8.7	465.0 [M+H] ⁺	448.0 [M-NH ₃ +H] ⁺	22
doxycyklin	Tc	10.1	445.0 [M+H] ⁺	428.1 [M-NH ₃ +H] ⁺	22
erytromycin[-H ₂ O]	Ma	13.0	716.8 [M+H] ⁺	558.5	27

*Förklaring till förkortningarna: IS, internstandard; Fq, fluorokinolon; Su, sulfonamid; Tr, trimetoprim; pe, penicillin; ce, cefalosporin; Ni, nitroimidazol derivat; Tc, tetracyklin; Ma, makrolid.

Metod för avloppsvatten

Inkommande eller utgående avloppsvatten filtreras först genom glasfiber filter 1.2µm (Whatman) och därefter genom nitrocellulosa membranfilter 0.45µm (Millipore). Hela proverna filtreras för att undvika inhomogen fördelning av partiklar mindre än 0.45µm. Det filtrerade proveret surgjordes till pH=3 med svavelsyra. I de fall en mindre volym prov skulle analyseras än vad som var tillgängligt från provtagningen delades provet upp efter syra tillsatsen. Provvolymer som analyserades var mellan 500 och 1000 ml. De interna standarderna tillsattes i en volym av 50µl. Fastfas extraktion med mixed phase C₂ENV, 1 g, 6 ml, kolonner (IST, Sorbent AB) genomfördes genom att först konditionera kolonnen med 6 ml metanol och därefter 6 ml vatten pH=3. Det filtrerade provet laddades sedan på kolonnen med en flödes hastighet av ungefär 3 ml min⁻¹. Kolonnen tvättades med 5 ml H₂O pH=3. Därefter torkades kolonnen genom att luft strömmade igenom under en timma. Antibiotika substanserna eluerades med 6 ml metanol 5 % TEA. Eluatet indunstades till ~50 µl genom att blåsa luft över provet och späddes upp till 1 ml med H₂O/acetonitril (95/5) v/v, därefter injicerades provet på LC-MS/MS instrumentet.

Metod för slam och sediment

Slammet vägs upp (~2g) i ett centrifugrör av glas, 10 ml fosfatbuffert ställd till pH 6 tillsätts. Provet extraheras i ett ultraljudsbad under 10 min. Därefter centrifugeras provet vid 4800 rpm i 10 min och faserna skiljs åt. Supernatet sparas och 10 ml MeOH:H₂O (25:75) (v/v) med 5 % TEA (v/v) sätts till pelleten. Provet extraheras 10 min i ultraljud och centrifugeras vid 4800 rpm i 10 min. De två extrakten slås ihop och filtreras genom 0.45 µm sprutfilter för att avskilja eventuella partiklar. Internstandard tillsätts och provet injiceras på LC:n.

För prover som analyserades under 2003 modifierades metoden något. Samtliga prover extraherades under 30 min i ultraljudsbadet och lösningsmedlet för den andra extraktionen byttes från MeOH:H₂O till ren ACN med 2.5% TEA (v/v). Det sammanslagna extraktet sattes därefter på en fastfas kolonn ENVI Chrom P (Supelco) som konditionerats med 2 ml H₂O och 2 ml ACN. Kolonnen eluerades med 3 ml ACN.

Metod för fisk

Ryggmuskel skars ut från de fiskar som provtagits inom projektet. Fiskproverna från Naturhistoriska Riksmuseet innehöll endast ryggmuskel. Proverna vägdes upp i Falcon rör (polypropylen), 4-8 g prov användes i analyserna. Fosfatbuffert, 25mM, pH=8.5, 10 ml sattes till provet och det extraherades under 30 min i ett ultraljudsbad. Efter centrifugering 4800 rpm i 10 min. skiljdes faserna åt och 10 ml ACN sattes till pelleten. Samma förfarande upprepades som för vatten extraktionen. De båda extrakten sammanfördes och 10 ml hexan tillsattes och proverna skakades i 10 min. Hexanfasen avskiljdes och extrakten sattes på en 1 g ENV+ kolonn (IST, Sorbent AB) som konditionerats med 5 ml MeOH, 5 ml MeOH/H₂O (50/50) samt 5 ml H₂O pH=3. Efter att extraktet laddats på kolonnen tvättades kolonnen med 5 ml MeOH och torkades under en timma med luft som sögs genom kolonnen. Därefter eluerades kolonnerna med 7 ml MeOH och 10 ml MeOH 2 % TEA (v/v). Internstandard tillsattes och proverna indunstades till ~50 µl och späddes upp till 1 ml med H₂O/ACN (95/5) (v/v). Därefter injicerades proverna på LC:n.

Provtagning

Avloppsvatten prover har tagits vid två tillfällen; under augusti 2002 samt januari-februari 2003. Samtliga prover, inkommande och utgående avloppsvatten är flödesproportionella veckoprover. Provolymerna var mellan 1.0-2.5 liter, 2002 togs samtliga prover i glasflaskor och under 2003 i plastflaskor (polypropylen). Samtliga prover förvarades vid -18°C och i mörker från provtagningstillfället fram till analys på laboratoriet. Med något enstaka undantag förvarades provtagningsflaskorna i tättslutande plastpåsar under transport. Coldsped Frystansporter anlätades för transport av samtliga prover. Vid provtagningen 2002 togs delprover som poolades, 2003 togs stickprover, detta bedömdes relevant eftersom slutprodukten av slam provtogs vid varje reningsverks och den har efterbehandlats under en längre tid och därför är stickprover väl så representativa. Vid GRYAAB i Göteborg togs ett större antal (9 stycken) delprover som analyserades separat för att undersöka homogeniteten i provmaterialet. Likaså togs vid GRYAAB både avloppsvatten och slam prover för tillsatsförsök, där en fältspik tillsattes i två olika koncentrationsnivåer innehållande samtliga antibiotika substanser som studerats. Slamprover togs vid första provtagning 2002 som delprover vilka poolades, i alla fall togs slutprodukten, i de flesta fall rötat slam (se tabell 3 för mer detaljerade uppgifter). Sjukhusavloppsvatten togs från Kalmar länssjukhus och Umeå Universitetssjukhus. I Kalmar togs prover under ett helt dygn var tredje timma från en provtagningspunkt för utvalda vårdavdelningar med ett ganska stort användande av antibiotika, i Umeå togs ett stickprov från sjukhusets huvudavloppsledning dvs. hela sjukhusområdets avloppsvatten. Fiskproverna togs som stickprover, genom fiske på provtagningsplatsen, detta gäller inte bakgrundsproverna som köptes från Naturhistoriska riksmuseet. Sedimentprover (3 stycken) från Kalmarsund provtagna av Stefan Tobiasson, Inst. för biologi och miljövetenskap, Högskolan i Kalmar, stickprover norr och söder om avloppsreningsverkets utsläppspunkt samt ett prov just i närheten av utsläppspunkten.

Samtliga prover var tydligt märkta med provnummer, ansvariga personer för undersökningen, provtagningsdatum, provtagningsplats, provtyp (exv. inkommande AV).

Tabell 3. Sammanställning av provtagningsplatser för påverkade prover.

Sjukhusavlopp	Ingående ARV	Utgående ARV	Avlopps slam	Biota (fisk)
SA1 (Umeå)	IV1 (Stockholm)	UV1 (Stockholm)	AS1 (Stockholm)	FA1 (Kalmar), torsk
SA2 (Kalmar)	IV2 (Kalmar)	UV2 (Kalmar)	AS2 (Kalmar)	FA2 (Göteborg), torsk
	IV3 (Göteborg)	UV3 (Göteborg)	AS3 (Göteborg)	FA3 (Göteborg), torsk
	IV4 (Floda)	UV4 (Floda)	AS4 (Floda)	FA4 (Floda), abborre
	IV5 (Umeå)	UV5 (Umeå)	AS5 (Umeå)	FA5 (Umeå), abborre

Tabell 4. Sammanställning bakgrundsprover + sediment.

Abborre*	Sill/strömning*	Sediment
BA1 (Holmöarna)	BS1 (Väderöarna)	SR1-3
	BS2 (Landsort)	(Kalmarsund)
	BS3 (Harufjärden)	

*se bilaga för provtagning/beredningsprotokoll.

Avloppsreningsverken

Vid samtliga avloppsreningsverk utnyttjades den befintliga provtagningsutrustningen för inkommande och utgående avloppsvatten. Nedan följer en kort beskrivning av respektive avloppsreningsverk. De valdes ut efter kriterierna att representera olika typer av reningsverk i Sverige samt att reningsverk med stort inslag av sjukhusavlopp skulle kunna jämföras med liknande reningsverk med ett mindre inslag av sjukhusavlopp. Henriksdal och Ryaverken är de två största reningsverken i Sverige och dessa representerar därför en stor andel av Sveriges samlade avlopp vilket motiverar att båda dessa ingår i screeningen.

Henriksdal

Detta reningsverk behandlar avloppsvatten från Stockholm, Huddinge, Haninge, Nacka och Tyresö. Det var 644 400 personer anslutna till verket 2002, volymen inkommande avloppsvatten var 136 280 000 m³ och 21 234 ton TS slam producerades. Henriksdals avloppsvatten representerar en storstad och har två större sjukhus anslutna.

Reningsprocessen kan kortfattat beskrivas med grovrens-galler, sandfång, förluftning och tillsats av järnsulfat, försedimentering, bioreaktor (biologisk rening), eftersedimentering, efterfällning med järnsulfat och sandfilter. Slam tas ut i försedimenteringen, bioreaktorn och eftersedimenteringen, förtjockas och rötas. Polymertillsats sker efter rötning och slammet centrifugeras innan slutprodukten erhålls.

Ryaverken

Ryaverken behandlar avloppsvatten från Göteborg, Ale, Härryda, Kungälv, Mölndal och Partille. Det var 605 526 personer anslutna till verket 2002, volymen inkommande avloppsvatten var 111 240 000 m³ och 13 512 ton TS slam producerades. Ryaverkens

avloppsvatten representerar en storstad och har ett stort sjukhus anslutet. Reningsprocessen kan kortfattat beskrivas med grovrensning, försedimentering, tillsats av järnsulfat, aktivslambassänger (biologisk rening), eftersedimentering, hälften av vattnet leds här till biobäddarna för rening av kväve och recirkulation genom aktivslambassängerna. Slam tas ut i försedimenteringen och eftersedimenteringen, förtjockas och rötas. Polymer tillsats sker vid Ryaverken och slammet antingen centrifugeras eller pressas för att avvattnas innan slutprodukt erhålls.

Umeå

Reningsverket hade 82 894 personer anslutna 2002, 15 000 person ekvivalenter tillkommer för industribelastning och externt inkommande slam, volymen inkommande avloppsvatten var 11 111 685 m³ och 2520 ton TS slam producerades. Avloppsvattnet till Öhns avloppsreningsverk representerar en medelstor svensk stad med ett stort sjukhus anslutet. Reningsprocessen kan kortfattat beskrivas med grovrensning, sandfång, tillsats av järnsulfat, luftningsbassänger, försedimentering, luftade bassänger med biologisk rening, slutsedimentering och klorkontaktbassäng. Slammet tas ut i försedimenteringen och förtjockas och rötas, därefter centrifugeras det efter polymer tillsats. Nu har processen ändras för att pelletera slammet men denna process var inte i drift när detta projekt genomfördes. Slutprodukten erhöles efter centrifugeringen.

Kalmar

Reningsverket hade 49 050 personer anslutna 2001, volymen inkommande avloppsvatten var 7 218 568 m³ (2002) och 1278 ton TS slam producerades. Avloppsvattnet in till Kalmar reningsverk representerar en medelstor svensk stad med ett "normal" stort sjukhus anslutet. Reningsprocessen kan kortfattat beskrivas med grovrensning, sandfång, förfällning med järnklorid och försedimentering, biologisk rening i aktivslambassänger, luftning, mellansedimenteringsbassänger, satsvis biologisk rening SBR-reaktorer, kemisk efterfällning med järnklorid och/eller polymer, eftersedimenteringsbassänger, klorerings möjligheter. Slammet tas ut i försedimenteringen, förtjockas och rötas, polymer tillsätts och slammet centrifugeras innan slutprodukt erhålls.

Floda

Reningsverket hade 9780 personer anslutna 2002, volymen inkommande avloppsvatten var 1 456 627 m³ och 236 ton TS slam producerades. Avloppsvattnet in till Floda reningsverk representerar en mindre ort med övervägande hushåll anslutna, en mindre vårdcentral finns ansluten. Reningsprocessen kan kortfattat beskrivas med grovrensning, sandfång, försedimentering, biobädd, kemisk fällning med järnklorid, slutsedimentering. Slammet tas ut från försedimenteringen och förtjockas därefter stabiliseras det aerobt och centrifugeras innan slutprodukt erhålls.

Resultat och diskussion

Detektionsgräns och recovery

Recovery eller återfinningsgrad har noga optimerats för de metoder som används i screening studien. Särskilt mycket arbete har lagts ner på detta vad gäller extraktion av antibiotika från slam som är en besvärlig matris att arbeta med. Recovery har bestämts genom tillsatsförsök.

Detta är inte ett problemfritt tillvägagångssätt p.g.a. att de nativa ämnena har långt större möjligheter att inkorporeras i eller binda starkare till matrisen än de ämnen som tillsätts på laboratoriet. Vid dessa försök har en viss tid för jämviktning alltid tillämpats (~1 timma),

Tabell 5. Instrument och metod detektionsgränser samt recovery för vatten, slam och fisk för respektive antibiotika som studerats.

Substans	D.L. ng inj.	D.L. metod µg L ⁻¹	D.L. metod ¹ µg g ⁻¹	D.L. metod ² µg g ⁻¹	Recovery % vatten (n=6)	Recovery % slam (n=6)	Recovery % fisk (n=3)
enrofloxacin	-	-	-	-	-	-	-
norfloxacin	0.07	0.007	0.13	0.001	90 ± 2	62 ± 7	122 ± 3
ofloxacin	0.07	0.007	0.09	0.001	85 ± 2	86 ± 17	126 ± 15
ciprofloxacin	0.07	0.007	0.16	0.001	94 ± 14	51 ± 7	134 ± 2
sulfametazine	-	-	-	-	-	-	-
sulfametoxazole	0.80	0.080	1.30	0.013	99 ± 11	71 ± 15	130 ± 8
diaveridine	-	-	-	-	-	-	-
trimetoprim	0.09	0.009	0.16	0.002	85 ± 6	64 ± 8	102 ± 8
cefalexin	-	-	-	-	-	-	-
amoxicillin	0.74	0.074	6.08	0.059	55 ± 5	14 ± 3	21 ± 2
ampicillin	0.60	0.060	1.50	0.018	50 ± 3	46 ± 12	55 ± 8
PcV	0.80	0.080	2.79	0.027	61 ± 3	33 ± 7	50 ± 12
cefuroxim	0.60	0.060	1.30	0.014	58 ± 8	53 ± 10	71 ± 7
cefadroxil	0.77	0.077	3.54	0.041	65 ± 9	25 ± 5	31 ± 4
nitroimidazol	-	-	-	-	-	-	-
metronidazol	0.33	0.033	0.84	0.006	66 ± 5	45 ± 10	96 ± 2
demeclocyklin	-	-	-	-	-	-	-
doxycyklin	0.64	0.064	1.34	0.021	51 ± 4	55 ± 5	52 ± 7
erytromycin[-H ₂ O]	1.60	0.160	3.23	0.041	68 ± 6	57 ± 10	65 ± 21

¹ D.L. för slam, ² D.L. för fisk

vissa antibiotika är dessvärre inte stabila under speciellt lång tid i aktivt slam och därför bidrar detta till att det blir problem att särskilja förluster på grund av låg extraktionseffektivitet från ren nedbrytning. Detta kan vara en förklaring till de låga recovery som bestämts för exv. amoxicillin, PcV och cefadroxil. De höga recovery som bestämts för fluorokinolonerna för fiskanalyserna kan förklaras med att den interna standarden har en något längre retentionstid än övriga fluorokinoloner och att en viss signalsuppression sker vid längre retentionstider p.g.a. matriskomponenter i provet. För avloppsvatten korrigeras inte resultaten för recovery eftersom den interna standarden sätts till provet innan fastfas extraktion. Däremot är samtliga resultat för slam och fisk korrigerade för recovery vid extraktionen. I tabell 6 visas de extraktions recovery som bestämts för analysmetoderna för vatten, slam och fisk. Detektionsgränser för samtliga antibiotika som studerats visas i tabell 6. De instrumentella detektionsgränserna har bestämts enl. referens 1. Detektionsgränserna för metoderna är bestämda utifrån de instrumentella detektionsgränserna, vilka är mycket konservativa, med hänsyn tagen till recovery och utspädning/uppkoncentreringsfaktorer. Detektionsgränserna för slam metoden varierar mycket mellan ämnen mestadels beroende på att utbytet varierar. Detektionsgränserna för vissa ämnen, särskilt penicilliner och cefalosporiner, är inte helt tillfredsställande. Detta bör förbättras i framtida studier. Det skall dock påminnas om att dessa ämnen har korta halveringstider i miljön (< 1 vecka) se ref. 2.

Sjukhusavlopp

Prover från Umeå Universitetssjukhus och Länssjukhuset i Kalmar har analyserats. Samma metod som använts för avloppsvatten har utnyttjats för dessa analyser. I Kalmar har halterna av antibiotika följts under en hel dag (16 timmar). Dessa resultat visar på mycket stora variationer i halterna med tiden.

Tabell 5. Koncentrationer i sjukhusavlopp, substanser som inte detekterades i något prov har inte tagits med i tabellen.

Substans	Umeå Sjukhus		Kalmar länssjukhus
	µg/l	SD	konc.område ¹ (µg/l)
norfloxacin	0.8	0.3	n.d.
ofloxacin	n.d.		0.2 - 7.6
ciprofloxacin	2.4	0.1	3.6 - 101.0
sulfamethoxazole	n.d.		0.4 - 12.8
trimethoprim	n.d.		0.6 - 7.6
metronidazole	n.d.		0.1 - 90.2
doxycycline	2.0	0.2	1.0 - 6.7

¹ Högsta och lägsta koncentration uppmätt under en dag (16 timmar), med 3 timmars provtagningsintervall.

Det är intressant och kanske oroande att max koncentrationerna överstiger 0.1 mg/l för någon antibiotika. Den totala belastningen av antibiotika kan under delar av dagen vara betydande och här skulle antibiotika resistens kunna utvecklas. Den stora variationen ställer också speciella krav på provtagningsmetodiken. För att på ett bättre sätt karaktärisera ett sjukhusavloppsvatten bör flödesproportionell provtagning användas med hög tidsupplösning.

Avloppsvatten

Två fullständiga provtagningsomgångar har genomförts för avloppsvatten, dels under augusti 2002 och under januari-februari 2003. Resultaten redovisas i tabell 6 och 7, 2002 respektive 2003 års resultat. Det förekommer många ”not detected” vilket givetvis är positivt mer anmärkningsvärt är vissa resultat för trimetoprim som visar högre koncentrationer i utgående än inkommande vatten. Detta kan i dagsläget bara förklaras med att trimetoprim desorberas från den fasta fasen till den lösta under passagen genom reningsverket. Detta indikerar också nödvändigheten i att analysera den partikulära fasen i det inkommande vattnet, något som också visas under ”materialbalanser” nedan.

Tabell 6. Koncentrationer av antibiotika i inkommande och utgående avloppsvatten 2002.

Substans	Prov (se tabell 2), µg L ⁻¹									
	IV 1	UV 1	IV 2	UV 2	IV 3	UV 3	IV 4	UV 4	IV 5	UV 5
norfloxacin	0.087	0.014	0.155	0.037	0.072	0.007	0.094	0.034	0.146	0.018
ofloxacin	0.019	0.007	0.213	0.052	n.d.	n.d.	0.007	n.d.	n.d.	n.d.
ciprofloxacin	0.154	0.018	0.300	0.007	0.123	0.013	0.205	n.d.	0.144	0.060
sulfametoxazole	0.674	0.193	0.337	0.304	n.d.	n.d.	0.302	0.302	n.d.	n.d.
trimetoprim	0.140	0.225	1.308	0.700	0.208	0.066	0.946	0.777	0.099	0.644
amoxicillin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ampicillin	0.165	0.063	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PcV	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cefuroxim	0.517	n.d.	n.d.	n.d.	0.243	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cefadroxil	0.151	0.129	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
metronidazol	0.552	0.107	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.076	n.d.
doxycyklin	3.335	0.915	2.211	0.424	0.083	0.227	2.482	0.880	0.067	0.078
erytromycin[-H ₂ O]	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

n.a. not analysed (inte bestämt), n.d. not detected (inte detekterat)

Tabell 7. Koncentrationer av antibiotika i inkommande och utgående avloppsvatten 2003.

Substans	Prov (se tabell 2), µg L ⁻¹									
	IV 1	UV 1	IV 2	UV 2	IV 3	UV 3	IV 4	UV 4	IV 5	UV 5
norfloxacin	0.174	0.007	0.076	0.007	0.072	0.007	0.066	n.d.	0.075	0.007
ofloxacin	n.d.	n.d.	0.287	0.045	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ciprofloxacin	0.157	0.007	0.194	0.014	0.123	0.013	0.102	0.007	0.090	0.021
sulfametoxazole	0.144	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.231	0.135
trimetoprim	0.364	0.214	0.548	0.561	0.208	0.066	0.251	0.230	0.651	1.388
amoxicillin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.077	n.d.	n.d.	n.d.
ampicillin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PcV	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cefuroxim	0.205	n.d.	n.d.	n.d.	0.243	n.d.	0.138	0.150	n.d.	n.d.
cefadroxil	n.d.	n.d.	0.077	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.077	0.082
metronidazol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.081	n.d.
doxycyklin	0.114	n.d.	0.074	0.064	0.083	0.227	0.070	0.072	0.072	n.d.
erytromycin[-H ₂ O]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. not detected (inte detekterat)

Slam

Koncentrationerna av antibiotika som bestämts i slam visar ett helt annat mönster än för vattenfasen. Endast ett fåtal substanser har bestämts i slam och några av dessa i vad vi anser vara höga halter. I vatten fasen visade doxycyklin och trimetoprim de högsta halterna, i vissa fall även sulfametoxazol. I slammet dominerar fluorokinolonerna i det närmaste helt. Doxycyklin förekom i relativt höga halter 2002 men saknades helt 2003, vi har tyvärr inte den aktuella förbrukningsstatistiken tillgänglig för att bedöma om en kraftig förändring har skett och därför kan vi inte ge en enkel förklaring till detta. Det kan dock konstateras att sommaren 2002 var väldigt torr och varm vilket påverkar flödena genom reningsverken och det är ett välkänt fenomen att en större del av läkemedel avsätts i slammet vid låga flöden än vid höga. Ett annat mycket tydligt resultat är att mönstret för antibiotika användningen avspeglas i slammet. I Kalmar län används ofloxacin betydligt flitigare än i många andra delar av Sverige. Detta kan vi tydligt se i resultaten för slamproverna. Resultaten visas i tabell 8 nedan.

Tabell 8. Koncentrationer av antibiotika i slam 2002 och 2003.

Substans	Prov (se tabell 2), $\mu\text{g g}^{-1}\text{TS}$									
	2002					2003				
	AS 1	AS 2	AS 3	AS 4	AS 5	AS 1	AS 2	AS 3	AS 4	AS 5
norfloxacin	4.29	2.02	1.24	0.43	3.14	0.94	0.63	1.67	0.13	0.90
ofloxacin	0.67	2.02	n.d.	0.68	0.50	0.09	1.55	0.09	0.09	n.d.
ciprofloxacin	4.76	2.47	1.36	0.91	4.38	2.32	2.69	3.38	0.47	2.49
sulfametoxazole	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
trimetoprim	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.16	n.d.	n.d.
amoxicillin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ampicillin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PcV	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cefuroxim	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
cefadroxil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
metronidazol	n.d.	0.88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
doxycyklin	1.34	1.54	n.d.	n.d.	1.49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
erytromycin[-H ₂ O]	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Fisk

Ett stort antal fisk prover analyserades under denna screening. Resultaten var i stort sett rakt igenom positiva för miljön. Inga antibiotika kunde påvisas i några bakgrundsprover, inte heller vid Umeå eller Floda reningsverk. Tyvärr har inget fiskprov från saltsjön (recipienten för Henriksdals reningsverk) analyserats men vi hoppas kunna göra detta inom en snar framtid. Däremot kunde mycket små mängder av ciprofloxacin påvisas i fiskar från Göta älvs mynning och Kalmarsund, dvs. från Ryaverkens respektive Kalmar reningsverks recipienter. Det skall dock påpekas att dessa koncentrationer är mycket låga och skulle ha varit under detektionsgränsen för slammetoden men p.g.a. möjligheten för uppkoncentrering av det betydligt renare extraktet kan vi detektera ciprofloxacin i dessa prover. I tabell 9 visas resultaten för fiskproverna från de påverkade provtagningsplatserna. Samtliga andra antibiotika, ciprofloxacin undantaget, var under detektionsgränsen (se tabell 6).

Tabell 9. Koncentrationer av ciprofloxacin i fisk.

Substans	Prov (se tabell 2), ng g^{-1} våtvikt				
	FA 1	FA 2	FA 3	FA 4	FA 5
ciprofloxacin	8.5	7.9	7.0	n.d.	n.d.

Sediment

Inga detekterbara mängder av antibiotika kunde bestämmas i något prov. Detta kan delvis förklaras med att metoden för slam användes även för sediment och detektionsgränserna är inte speciellt låga för denna metod (se tabell 6). Övriga resultat visar också att de substanser som kan förväntas förekomma i höga halter i sediment mer sannolikt elimineras i reningsverket genom att bidras upp i slammet. För framtiden krävs ytterligare metodutveckling för fasta matriser för att nå riktigt låga detektionsnivåer. Då kan det vara intressant att genomföra nya undersökningar av antibiotika i sediment.

Kvalitetssäkring

Homogeniteten på slamprover undersöktes genom att nio delprover togs ut från Ryaverken, Göteborg vid provtagningen 2003. Variationen i mätresultaten mellan delproverna var under 20 % relativ standard avvikelse mot medelvärdet för respektive analyt. Observera dock att detta endast gäller för fluorokinolerna och trimetoprim. Homogeniteten för övriga substanser går inte uppskatta då inga mätbara mängder bestämts i dessa prover.

Fältspikning genomfördes för slam och avloppsvatten (inkommande och utgående) vid provtagningen på Ryaverket 2003. Detta för att kontrollera återfinningsgraden av hela metoden från provtagningstillfället till bestämning. I tabell 10 visas resultaten av dessa fältspikar, för att beräkna återfinningsgraden drogs resultaten från de ospikade proverna ifrån och därefter jämfördes resultatet direkt med mängden tillsatt i spiken. Det framgår tydligt att stora problem finns för penicilliner och cefalosporiner (speciellt cefadroxil). Dessa substanser är sannolikt inte stabila i dessa matriser och bryts ned snabbt även om proverna förvaras fryst under hela transporten.

Tabell 10. Återfinningsgrad av fältspikar i utgående avloppsvatten (AV) samt slam från Ryaverken 2003, standardavvikelsen (SD) ges för varje substans och matris.

Substans	Återfinningsgrad % utgående AV, n=3	SD	Återfinningsgrad % slam, n=6	SD
norfloxacin	97.0	5.2	60.1	2.5
ofloxacin	94.7	11.2	82.6	8.5
ciprofloxacin	98.0	1.5	49.5	0.4
sulfametoxazole	101.5	6.8	70.7	12.7
trimetoprim	71.9	6.2	72.3	10.5
amoxicillin	< 5	-	-	-
ampicillin	11.4	3.7	-	-
PcV	< 5	-	-	-
cefuroxim	43.2	2.6	29.5	6.8
cefadroxil	16.5	2.3	-	-
metronidazol	63.2	5.3	44.8	11.9
doxycyklin	53.6	8.1	46.4	0.8
erytromycin[-H ₂ O]	54.3	2.6	35.0	7.1

Tiden för nedfrysning och upptining har vi approximativt beräknat till ~12 timmar. Detta är dock något som skulle kräva mer ingående studier för att fullständigt reda ut. När vi recovery korrigerat resultaten som presenteras i rapporten har vi endast använt oss av de recovery som ges i tabell 6. I tabell presenteras resultaten från det standard tillsats försök som gjordes på slamprover från Ryaverken 2003. Totalt användes nio prover, tre ospikade och tre spikade med en låg nivå samt tre med en hög nivå. Eftersom koncentrationerna inte var kända innan tillsatserna gjordes kan vi i efterhand konstatera att lägre halter skulle ha använts för trimetoprim. För fluorokinolonerna visar resultaten i tabell 11 god överensstämmelse med vad vi bestämde med intern standard metoden. Detta ger en mycket god tillförlitlighet och kvalitetssäkring för resultaten.

Tabell 11. Jämförelse mellan internstandard och standardtillsats metoden för kvantifiering av fluorokinoloner i slam från Ryaverken 2003.

Substans	Intern standard	Standard tillsats	
	Konc. $\mu\text{g g}^{-1}$ TS	Konc. $\mu\text{g g}^{-1}$ TS	SD ¹
norfloxacin	1.67	2.04	0.36
ofloxacin	0.09	0.28	0.22
ciprofloxacin	3.38	3.30	0.29

¹ Beräknat enligt referens 1

Blankprover i form av ~100 ml Milli-Q vatten har transporterats i liknande provtagningskärl som proverna och analyserats för samtliga substanser. Två blankprover har transporterats från varje reningsverk med undantag av Henriksdals reningsverk där inga blankprover har inkluderats. Inget av dessa blankprover gav någon mätbar signal för någon av analyterna. Ett större problem som vi har haft under bestämningen av dessa substanser är minneseffekter i instrumentet, detta har inneburit att vi injicerat mobilfas efter standarder med höga koncentrationer samt att speciella verifieringskörningar har fått läggas in för prover med låga signaler. Detta har inte inneburit något problem för kvaliteten men väl för effektiviteten på dessa analyser. Metoden måste i framtiden utvecklas i detta avseende så att minneseffekterna helt kan elimineras.

Materialbalanser

Här exemplifieras materialbalans uträkningar med fluorokinolonerna som grupp och endast från Henriksdals reningsverk i Stockholm. På årsbasis tillförs Henriksdal 40.3 kg fluorokinoloner i det inkommande vattnet, 3.6 kg förs ut direkt i det utgående vattnet men hela 139 kg återfinns i slammet. Den tillförda mängden kommer alltså inte upp i balans med vad som återfinns i de material som lämnar verket. Problemet är att vi inte har analyserat den inkommande partikulära fasen vilken sannolikt innehåller stora mängder fluorokinoloner eftersom dessa substanser uppenbarligen har en stark fördelning mot den fasta mindre polära fasen. Preliminära analyser av den partikulära fasen i det inkommande vattnet till Henriksdal visar att det mycket riktigt förekommer fluorokinoloner i dessa prover men inte i ritigt så höga halter som vi väntat oss. Storleksordningen samma mängder (~40 kg) som i den lösta fasen återfinns också i den partikulära fasen. Dessa försök kräver dock att nya prover tas för att ett större material av partiklar skall kunna samlas in och därmed göra analysen mer känslig. Materialbalansen visar i vart fall att slammet är den mest intressanta matrisen för fluorokinoloner, därtill visar resultaten från materialbalansen att mängderna är de som vi kan förvänta oss från de förbrukningsdata vi har tillgängliga. Det förbrukas ~4 ton fluorokinoloner årligen i Sverige, vilket innebär att 300-400 kg kan förmodas belasta Henriksdal, med korrigeringar för metabolisk nedbrytning kommer vi då hamna ganska nära de 140 kg som Henriksdal släpper ut i slam och utgående vatten varje år.

Slutsatser

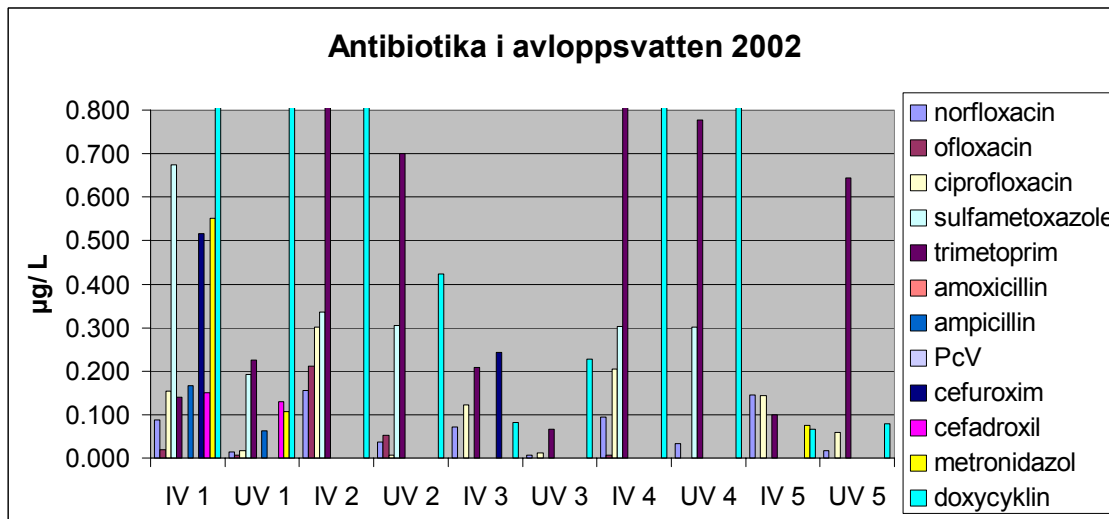
En screening av 13 antibiotika substanser har genomförts i Sverige. Provtagningar har gjorts vid två skilda tidpunkter och vid ett antal olika reningsverk av olika karaktärer. Screeningen har resulterat i att vi har en bättre bild av i vilken omfattning antibiotika sprids ut i miljön. Potentiella problemsubstanser har också identifierats, koncentrationen av fluorokinoloner i slam är hög och kan medföra effekter på de mikrobiella ekosystemen om detta material sprids i miljön. En betydligt mer komplicerad frågeställning är vilken effekt det faktum har att de fem undersökta reningsverken årligen släpper ut ~340 kg av de 13 undersökta antibiotika substanserna i sina recipienter. Mätningar i recipient vatten är planerade och kommer att genomföras inom det närmaste året. Ett antal fiskprover har analyserats och ciprofloxacin har bestämts i mycket låga koncentrationer, detta kan tyckas anmärkningsvärt och oroande men koncentrationerna är mycket låga. Antibiotika bestämdes också i två sjukhusavloppsvatten och koncentrationerna här varierade kraftigt med mycket höga max koncentrationer vilket kan orsaka ett selektionstryck som gynnar antibiotika resistent bakteriestammar. För framtiden rekommenderar vi mätningar i slam och recipientvatten eller utgående avloppsvatten om målsättningen är att övervaka halterna av antibiotika i miljön. Teoretiska beräkningar av halterna av antibiotika i miljön, liknande de som genomfördes av Naturvårdsverket 1994, bör genomföras.

Referenser

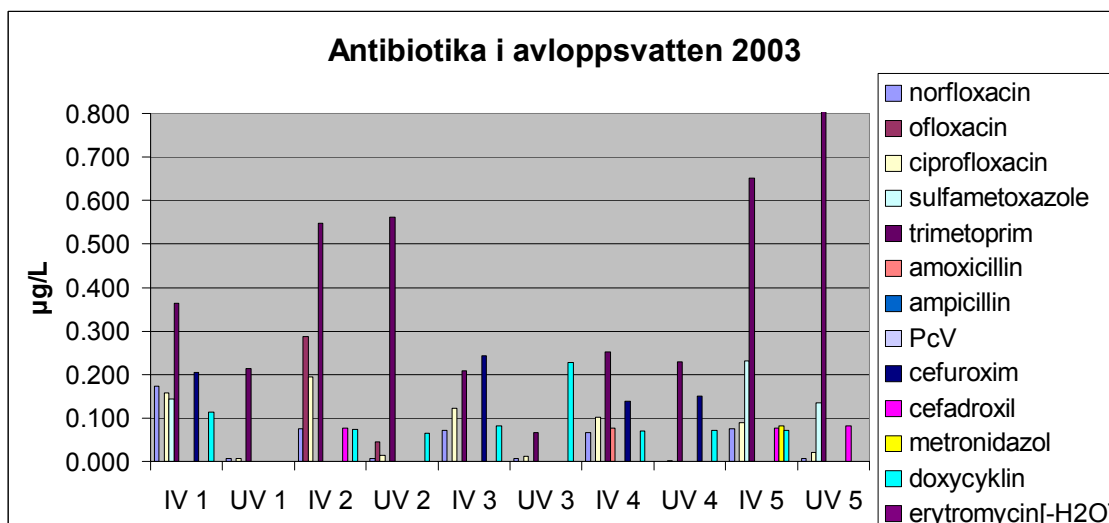
1. Miller J.C. and Miller J. N., "Statistics for analytical chemistry" 2nd edition, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 1988.
2. Kümmerer, K., "Pharmaceuticals in the environment", Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Tyskland, 2001.

Appendix

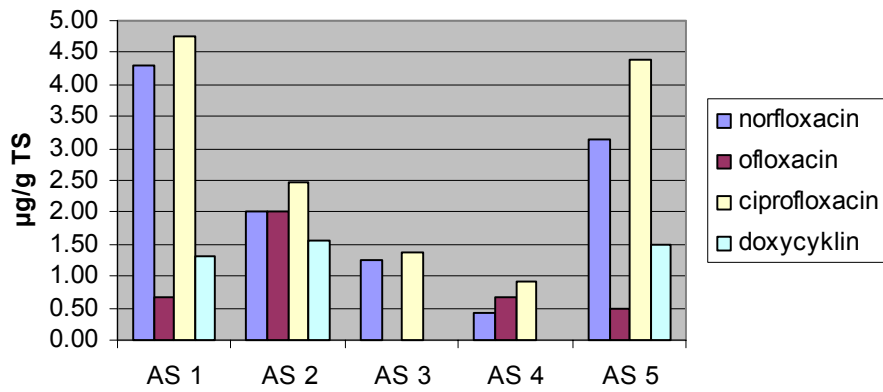
I appendix visas några stapeldiagram på koncentrationer av antibiotika i avloppsvatten och slam för att öka möjligheten för direkta jämförelser mellan de olika avloppsreningsverken. Observera att samma information återges i tabellerna 6, 7 och 8.



Anm. observera att y-axelns skala inte täcker in samtliga mätvärden.



Fluorokinoloner och doxycyklin i slam 2002



Fluorokinoloner i slam 2003

