DeepL

Subscribe to DeepL Pro to translate larger documents.
Visit www.DeepL.com/pro for more information.

Integreret kemisk og molekylær vurdering af spildevandets indflydelse på Vejle Fjord

ivl
Swedish Environmental Research Institute

Rapportnummer: U11051
Forfatter: Mikael Dahl

Bestilt af: Bæredygtigt Landbrug

Foto: Mikael Dahl

[eDNA, sediment, spildevand, kemikalier]

Resumé

IVL Swedish Environmental Research Institute takker Bæredygtigt Landbrug for muligheden for at udføre denne opgave. Undersøgelsen var specifikt designet til at fastslå, om mikroorganismer og farmaceutiske rester, der indikerer påvirkning fra spildevandsrensningsanlæg (WWTP), kunne påvises i sedimenter fra Vejle Fjord. Der blev ikke foretaget målrettede analyser af forurenende stoffer eller mikrobielle signaler relateret til landbrug, naturlige processer eller andre diffuse kilder.

Vejle Fjord blev valgt, fordi den repræsenterer en typisk dansk fjord med en klar gradient fra byområder i det indre bassin til mere marine forhold mod Kattegat. Sedimentprøver blev indsamlet ved 19 stationer langs fjorden og to yderligere steder i Vejle Å. Analyserne omfattede 16S rRNA-metabarcoding og shotgun-metagenomik, suppleret med målrettet kemisk analyse af lægemidler i det samme sedimentmateriale.

Resultaterne afslørede tydelige tegn på spildevandsrelaterede mikroorganismer og farmaceutiske rester i den indre fjord, især nær udledningsstedet. Flere bakterietaxa, der er karakteristiske for aktivt slam-processer – såsom *Candidatus Accumulibacter*, *Tetrasphaera* og Nitrospira – var koncentreret i disse områder, mens deres forekomst aftog mod den ydre fjord. Der blev fundet forhøjede koncentrationer af antidepressiva og antibiotika i samme region. Samlet set viser disse konsistente molekylære og kemiske mønstre, at mikrobielle og farmaceutiske indikatorer effektivt kan spore spildevandets indflydelse i fjordsedimenter, selv ved lave forureningsniveauer.

Indholdsfortegnelse

Resumé **3**

1 Indledning **5**

Begrundelse for den foreliggende undersøgelse 9

2 Metodologi **10**

Feltarbejde 10

DNA-ekstraktion 10

Metabarkodning og PCR-amplifikation 11

Metagenomisk sekventering 12

Bioinformatisk analyse metabarcoding 12

Bioinformatisk analyse metagenomik 13

Metode til identifikation af mikrobielle indikatorer for spildevandspåvirkning 13

Lægemidler 15

3 Resultater **16**

3.1 Metabarcoding 16

3.2 Metagenomiske resultater 18

3.3 Farmaceutiske rester 23

4 Diskussion/ analyse **26**

5 Referenceliste **30**

Bilag **35**

1 Indledning

Lokale spildevandsrensningsanlæg

Vejle Spildevand driver flere rensningsanlæg i kommunen, hvoraf Vejle Centralrenseanlæg er det største og det, der er mest direkte forbundet med Vejle Fjord. Anlægget anvender mekaniske, biologiske, nitrifikations-, denitrifikations- og kemiske rensningsprocesser (MBNDK) og rensede i 2023 ca. 99.768 m³ kommunalt spildevand. Den årlige belastning svarede til ca. 74 ton nitrogen, 2,7 ton fosfor og 33,9 ton
biologisk nedbrydeligt organisk stof (BOD_5). Andre anlæg, herunder Haraldskær og Brejning Centralrenseanlæg, bidrager til de samlede udledninger i kommunen, men Vejle Centralanlæg er fortsat den største enkeltstående punktkilde, der påvirker fjorden. Haraldskær rensningsanlæg, der ligger opstrøms langs Vejle Å, betjener primært den vestlige del af oplandet. Det udleder renset spildevand til flodsystemet, som i sidste ende løber ud i den indre fjord. Selvom Haraldskær har mindre kapacitet end det centrale anlæg, kan det stadig påvirke de kemiske og biologiske forhold i sedimenterne i den øvre estuarine zone, især i perioder med høj vandføring eller kombineret afstrømning.

I sin rapport om overløb i 2023 dokumenterede Vejle Spildevand en betydelig reduktion i overløbsmængden fra sit hovedudløb – fra ca. 213.000 m³ i 2022 til 47.000 m³ i 2023, på trods af usædvanligt store regnmængder det år (Vejle Spildevand, 2023). I 2022 udgjorde dette udløb næsten 30 % af det samlede overløbsvolumen i kommunen, men i 2023 faldt andelen til 4 %. Reduktionen tilskrives idriftsættelsen af en ny renselinje i 2022, som fordoblede den hydrauliske kapacitet fra 2.500 $m^3\ h^{-1}$ til 5.000 $m^3\ h^{-1}$. Denne tekniske opgradering har sammen med forbedret processtyring og bufferkapacitet klart forbedret anlæggets hydrauliske og miljømæssige ydeevne. Ikke desto mindre har beboere langs den sydlige kystlinje nær Ibæk Strandvej rapporteret om lokale slamaflejringer, der formodes at stamme fra spildevandssystemet – et problem, der i øjeblikket undersøges.

Hydrodynamik og cirkulation i Vejle Fjord

Vejle Fjord, der ligger på Jyllands østkyst, er en 22 km lang, halvt lukket flodmunding, der er kendetegnet ved stejle batymetriske hældninger og begrænsede lavvandede områder. Fjorden modtager ferskvandsindstrømning hovedsageligt fra Vejle Å og munder ud i

Kattegat. Dens cirkulation følger et typisk estuarinmønster, hvor brakvand strømmer ud mod havet, og saltvand strømmer ind fra Kattegat. Denne to-lags strømning drives primært af vindkraft, tidevandsudveksling og densitetsgradienter mellem ferskvand og saltvand.

Vindinducerede strømme forårsager ofte en udstrømning langs den sydlige kyst og en indstrømning langs den nordlige side. Da fjorden hurtigt bliver dybere fra kysten, er vandudvekslingen mellem dens indre og ydre dele begrænset, hvilket resulterer i lange opholdstider for vandet og stærke rumlige gradienter i saltholdighed, ilt- og næringsstofkoncentrationer (Christensen et al., 1999). Denne cirkulationsdynamik er afgørende for fortolkningen af mønstre for transport af forurenende stoffer, sedimentering og økologiske gradienter i fjorden.

Nylige simuleringer fra Syddansk Universitet (Lees et al., 2022) giver en kvantitativ kontekst for næringsstofbelastning og cirkulationsmønstre i fjorden. Modelresultaterne indikerer en markant eutrofieringsgradient, der strækker sig fra den indre til den ydre fjord, hovedsageligt drevet af diffuse tilførsler fra landbrug og naturlig afstrømning fra afvandingsområdet. Punktkilder såsom kommunalt spildevand og akvakulturanlæg bidrog med mindre, men alligevel målbare andele af det samlede nitrogen og fosfor. Undersøgelsen fremhævede også, at de hydrodynamiske opholdstider er længst i den indre fjord, hvor begrænset vandudveksling forstærker næringsstofeffekterne og understøtter en forhøjet planktonproduktion. Disse fund er i overensstemmelse med den konceptuelle ramme for denne undersøgelse, hvor molekylære og kemiske indikatorer forventedes at vise lignende rumlige gradienter, der afspejler det kumulative menneskeskabte pres snarere end en enkelt dominerende kilde.

Miljøtilstand og menneskeskabt pres på Vejle Fjord

Vejle Fjord har længe været betragtet som et af Danmarks mest belastede kystøkosystemer. Den har lidt under kronisk eutrofiering, tab af ålegræs (*Zostera marina*) og blåmuslingebanker (*Mytilus edulis*) samt hyppig iltudtømning (Miljøstyrelsen, 2023). Fjorden er i øjeblikket klassificeret som havende dårlig økologisk tilstand og ikke god kemisk tilstand i henhold til det danske nationale overvågningsprogram (NOVANA).

SUND Vejle Fjord-projektet, ledet af Syddansk Universitet, har modelleret vandopholdningstider, næringsstofreduktionseffekter, genopretning af ålegræs og overløbsbegivenheder for at vejlede den lokale forvaltning (SDU, 2022). Disse undersøgelser fremhæver fjordens begrænsede selvrensende kapacitet og høje følsomhed over for både diffuse og punktkilder.

I sensommeren 2023 blev fjorden beskrevet som værende tæt på økologisk sammenbrud efter en omfattende iltudtømning, der forårsagede massedød blandt bentiske dyr og fisk (Miljøstyrelsen, 2023). Sådanne hypoxiske episoder er blevet hyppigere under forhold med høj næringsstofbelastning og stigende sommertemperaturer.

Lægemiddelrester som nye forurenende stoffer

Farmaceutiske rester er et stadig mere anerkendt miljøproblem på grund af deres persistens, bioaktivitet og potentiale for akkumulering i vandmiljøer. Spildevandsrensningsanlæg er vigtige indgangssteder for lægemidler til overfladevand (aus der Beek et al., 2016). Farmaceutiske stoffer såsom antibiotika, analgetika og psykofarmaka påvises ofte i vand- og kystsedimenter over hele verden (Gaw et al., 2014; Maghsodian et al., 2022). Selv i lave koncentrationer kan disse forbindelser ændre sammensætningen af mikrobielle samfund og potentielt påvirke økosystemets funktion (Świacka et al., 2023). Kronisk eksponering og bioakkumulering har også vist sig at sprede sig gennem akvatiske fødenet, hvilket understreger risikoen for langsigtede økologiske effekter (Xie et al., 2017).

De fleste konventionelle spildevandsrensningssystemer er ikke designet til at fjerne disse mikrokontaminanter, hvilket betyder, at mange aktive forbindelser passerer igennem og når ud i recipientvandet (Jelić et al., 2012). Når lægemidlerne er kommet ud i vandmiljøet, kan de eksistere opløst i vandsøjlen eller adsorberet til partikler, der bundfælder sig i sedimenter, hvilket gør sedimenterne til både en dræn og et langsigtet reservoir for disse forbindelser (aus der Beek et al., 2016).

Selv i lave koncentrationer kan visse lægemidler forstyrre livet i vandmiljøet. Syntetiske østrogener fra præventionsmidler kan forårsage feminisering hos fisk (Kidd et al., 2007), antibiotika kan fremme antibiotikaresistente bakterier (Martinez, 2009; Bengtsson-Palme & Larsson, 2016), og ikke-steroide antiinflammatoriske lægemidler (NSAID'er) kan forringe fiskes organfunktion og adfærd (Corcoran et al., 2010).

Mikroorganismer som indikatorer for miljøpåvirkning

Mikroorganismer spiller en central rolle i næringsstofkredsløbet og økosystemets funktion og er følsomme indikatorer for menneskeskabte påvirkninger. Mikrobielle samfund i sedimenter reagerer kraftigt på tilførsel af næringsstoffer og organiske stoffer fra både landbrug og spildevand (Beattie et al., 2020). Antibiotikaresistensgener (ARG'er) er blevet påvist i sedimenter nedstrøms for rensningsanlæg, ofte spredt via horisontal genoverførsel mellem bakterier (Marti et al., 2013).

Metagenomiske og metabarcoding-analyser af mikrobielle samlinger kan således afsløre ændringer i samfundssammensætning, økosystemfunktion og resistensmønstre og dermed danne grundlag for økologisk risikovurdering (Rizzo et al., 2013).
Ved at kombinere kemiske analyser af lægemidler med molekylær profilering af mikrobielle samfund får man et dobbelt perspektiv på forurening: tilstedeværelsen af forurenende stoffer og de biologiske reaktioner, de udløser.

Sedimentanalyse som et redskab til miljøvurdering

I kystøkosystemer som fjorde fungerer sedimenter både som en dræn og et arkiv for miljøforurening (Förstner & Wittmann, 2012). Forurenende stoffer, der er bundet til fine partikler, akkumuleres over tid og giver et samlet billede af historiske og aktuelle forureningskilder. Sedimentanalyse er derfor en robust metode til at evaluere rumlige og tidsmæssige gradienter af forurening.

I Vejle Fjord er sedimentovervågning særlig relevant, fordi den kan afsløre forureningsgradienter, der strækker sig fra den indre fjord – hvor det største spildevandsudløb er placeret – mod mindre påvirkede ydre zoner. Ud over det centrale anlæg i Vejle bidrager Haraldskær rensningsanlæg, der ligger længere opstrøms langs Vejle Å, også til udledninger inden for afvandingsområdet. De to prøvetagningsstationer i Vejle Å blev derfor medtaget for at vurdere, om spildevandsrelaterede indikatortaxa og kemiske sporstoffer kan påvises længere opstrøms i flodsystemet.

Farmaceutiske rester er særlig bekymrende på grund af deres persistens og biologiske aktivitet. Mange forbindelser nedbrydes langsomt under de iltfattige og lysfattige forhold, der er typiske for fjordsedimenter (Patel et al., 2019). Tilstedeværelsen af sådanne rester er et klart tegn på spildevandets indflydelse og kan fungere som en kemisk sporstof for menneskeskabt pres.

HELCOM-rapporten (2021) om Østersøregionen identificerer kommunale spildevandsrensningsanlæg som den dominerende kilde til lægemidler og anslår, at der årligt udledes flere tusinde tons, hvoraf mindre end halvdelen fjernes effektivt under rensningen. Antiinflammatoriske lægemidler (f.eks. diclofenac, ibuprofen), hjerte-kar-midler og CNS-aktive lægemidler såsom carbamazepin var blandt de hyppigst påviste forbindelser i sedimenter og overfladevand. Den danske NOVANA-overvågning har rapporteret om lignende forbindelsesklasser i nationale undersøgelser, hvilket understreger relevansen af at analysere disse i Vejle Fjord.

Begrundelse for den foreliggende undersøgelse

I fjordøkosystemer fungerer sedimenter både som dræn og arkiver for miljøforurening, idet de integrerer signaler fra flere kilder over tid (Förstner & Wittmann, 2012). Da forurenende stoffer, der er bundet til fine partikler, akkumuleres gradvist, udgør overfladesedimenter en pålidelig indikator for både nylige og historiske forureningsbidrag. I Vejle Fjord, hvor der er et spildevandsudløb i det indre bassin, er sedimentovervågning et effektivt middel til at spore forureningsgradienter, der strækker sig udad mod mindre påvirkede zoner og opstrøms referenceområder i Vejle Å (SDU, 2022).

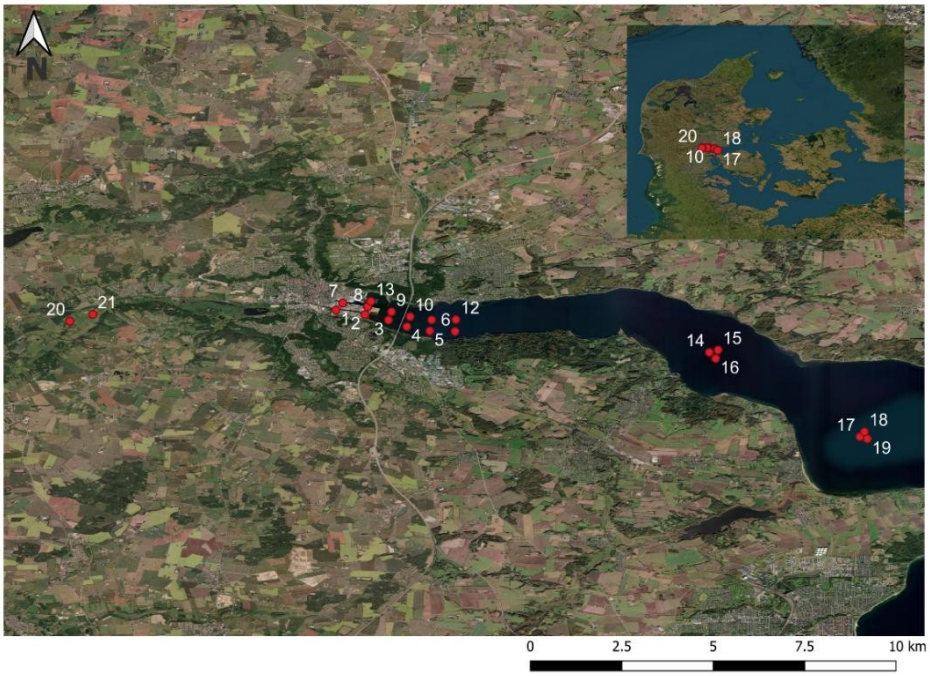
Farmaceutiske rester er særlig bekymrende på grund af deres persistens og biologiske aktivitet. Mange forbindelser nedbrydes langsomt under de iltfattige og lysfattige forhold, der er typiske for fjordsedimenter (Patel et al., 2019). Tilstedeværelsen af sådanne rester er således et klart bevis på spildevandets indflydelse og kan fungere som en kemisk sporstof for menneskeskabt pres. HELCOM-rapporten (2021) om Østersøregionen identificerer kommunale spildevandsrensningsanlæg som den dominerende kilde til lægemidler, der udleder flere tusinde ton årligt, hvoraf mindre end halvdelen fjernes effektivt under rensningen. Dansk NOVANA-overvågning har rapporteret om lignende forbindelsesklasser, herunder antiinflammatoriske lægemidler (f.eks. diclofenac, ibuprofen), hjerte-kar-midler og CNS-aktive lægemidler såsom carbamazepin, hvilket understreger relevansen af at analysere disse forbindelser i Vejle Fjord.

For at indfange både kemiske og biologiske aspekter af sådanne belastninger blev der i maj 2025 indsamlet overfladesedimentprøver (0–5 cm) fra Vejle Fjord og Vejle Å, som repræsenterer det senest aflejrede materiale. Formålet var at få et øjebliksbillede af forekomsten af lægemidler og sammensætningen af mikrobielle samfund i områder, der er påvirket af spildevandsudledninger og landbrugsafstrømning. Ved at kombinere analyse af lægemiddelrester med metagenomisk profilering af mikrobielle samfund giver denne undersøgelse en integreret, følsom og skalerbar ramme for vurdering af menneskeskabte påvirkninger. Resultaterne danner grundlag for evaluering af rumlige forureningsgradienter og for vejledning af fremtidige overvågnings- og restaureringsindsatser, der har til formål at forbedre Vejle Fjords økologiske modstandsdygtighed.

2 Metodologi

Feltarbejde

I midten af maj 2025 blev der udtaget prøver i Vejle Fjord og det omkringliggende område (fig. 1). For et detaljeret kort over den indre fjord og Vejle Å se supplerende kort S1 og S2. Sedimentprøver blev udtaget fra en båd ved hjælp af en Van Veen-gribesampler, undtagen prøvepunkt 1 (taget fra en bro) midt i floden, lige nedstrøms Vejle Centralrenseanlæg. Prøvepunkterne 20 og 21 blev indsamlet fra kysten ved hjælp af den samme gribesampler. Prøver til DNA-relateret arbejde blev indsamlet i tre eksemplarer (n=63) og konserveret i PowerProtect DNA/RNA-stabiliseringsreagens fra QIAGEN, som trænger ind i cellerne og standser den biologiske aktivitet for at bevare mikrobielle samfundsprofiler og nukleinsyres integritet under transport og opbevaring.



Figur 1. Oversigtskort over prøveudtagningsstationer i Vejle Fjord. Kort, der viser de 21 sedimentprøveudtagningsstationer (Vejle 1–21) langs fjordens tværsnit. Placeringen af Vejle Å (station 20–21), det vigtigste udledningspunkt for spildevandsrensningsanlægget og de indre, midterste og ydre fjordzoner er angivet. Baggrundskort: © Geodatastyrelsen, Danmark.

DNA-ekstraktion

DNA blev ekstraheret ved hjælp af MagAttract® PowerSoil® Pro DNA-kittet på et KingFisher Flex-instrument. Der blev inkluderet negative kontroller, og

ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard (D6300) blev anvendt som positiv kontrol efter DNA-ekstraktionen. DNA-koncentrationen blev målt ved hjælp af et Implen Nanophotometer N60.

Metabarkodning og PCR-amplifikation

For at undersøge bakteriesamfundene blev der anvendt en metabarcoding-tilgang baseret på 16S rRNA-genet. Dette gen er en velbevaret genetisk markør, der findes i både bakterier og arkæer. Det indeholder både bevarede og hypervariable regioner, hvilket gør det særligt nyttigt til at skelne mellem forskellige arter. I denne undersøgelse blev V3–V4-regionen valgt på grund af dens egnethed til bred taksonomisk dækning, hvilket muliggør identifikation på et relativt detaljeret niveau – fra slægt til art. Primerparret 341F og 805R (tabel 1) blev anvendt til at amplificere denne region. Metabarcoding blev udført ved hjælp af en totrins-PCR-protokol. I det første trin blev DNA amplificeret med 16S-primere udstyret med Illumina-adaptere (TruSeq-stil SP1/2-steder) i 5'-enden (understreget nukleotider i tabel 1).

Tabel 1. Primerseekvenser anvendt til PCR-amplifikation af V3–V4-regionen af 16S rRNA-genet.

Navn	Sekvens (5'-3')
341F	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCCTACGGGNGGCWGCAG
805R	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACTACHVGGGTATCTAATCC

DNA-amplifikation blev udført ved hjælp af en MiniAmp™ termocycler og ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard (D6300) som positiv kontrol. Hver 20 µl reaktion indeholdt 10 µl 2X Phusion™ Plus Green PCR Master Mix, 0,5 µM af hver primer (341F og 805R; tabel 4), 0,5 mg/ml BSA, 4 µl template-DNA og nukleasefrit vand til et slutvolumen på 20 µl.

Termocyklingsprogrammet bestod af en indledende denaturering ved 98 °C i 30 sekunder, efterfulgt af 30 cyklusser ved 98 °C i 10 sekunder, 57 °C i 30 sekunder og 72 °C i 30 sekunder, med en afsluttende forlængelse ved 72 °C i 2 minutter og et holdtrin ved 6 °C (∞).

De oprensede PCR-produkter blev sendt til BMKgene til sekventering. Hos BMKgene gennemgik de amplificerede PCR-produkter en kvalitetskontrol for at vurdere deres egnethed til sekventering baseret på renhed og koncentration. Alle prøver bestod kvalitetskontrollen og blev forberedt til sekventering ved hjælp af Illumina-sekventeringsadaptere, der blev inkorporeret under den første PCR (tabel 1 ovenfor), og dual-index-primere til

multiplexing. Alle prøver blev godkendt til sekventering og blev sekventeret på Illumina NovaSeq 6000-platformen ved hjælp af parrede 250 bp-læsninger (PE-250).

Metagenomisk sekventering

DNA-ekstrakter fra sedimentprøver blev samlet (10 µl fra hver) fra de samme tredobbelte delprøver, der blev brugt til metabarcoding-analyse, for at opnå en repræsentativ sammensætning for hver prøveudtagningsstation. Derudover blev der inkluderet en positiv kontrol bestående af en ZymoBIOMICS™ Microbial Community Standard (Zymo Research, USA) for at verificere sekventeringsydelsen og den taksonomiske nøjagtighed.

Før forsendelse blev alle DNA-ekstrakter kvantificeret ved hjælp af et Qubit 4-fluorometer (Thermo Fisher Scientific, USA) og vurderet for renhed baseret på A260/280- og A260/230-forhold ved hjælp af et NanoDrop-spektrofotometer. Kun ekstrakter med tilstrækkelig koncentration (>10 ng/µL) og høj renhed (A260/280 ≈ 1,8–2,0) blev udvalgt til sekventering.

Prøverne blev opbevaret ved −20 °C indtil afsendelse og transporteret til BMKgene, der udførte en yderligere kvalitetskontrol ved hjælp af agarosegelelektroforese og kvantificering. Biblioteker blev forberedt ved hjælp af Illumina TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit i henhold til producentens protokol. Sekventering blev udført på en Illumina NovaSeq 6000-platform (paired-end 150 bp-tilstand), hvilket genererede metagenomiske aflæsninger af høj kvalitet, der var egnede til downstream-taksonomisk og funktionel profilering.

Bioinformatisk analyse metabarcoding

Ampliconsekventering af sediment- og kontrolprøver fra Vejle Fjord blev analyseret ved hjælp af nf-core/ampliseq-pipeline (v2.14.0; Straub et al., 2020) implementeret i Nextflow. Rå Illumina-parret-end-læsninger blev kvalitetskontrolleret med FastQC (Andrews, 2010) og opsummeret ved hjælp af MultiQC (Ewels et al., 2016). Primerseekvenser blev fjernet med Cutadapt (Martin, 2011). Efterfølgende støjfjernelse og kvalitetsfiltrering blev udført med DADA2 (Callahan et al., 2016), som omfattede fejlkorrektion, trimning og fjernelse af kimærer.
Taksonomisk tildeling blev udført i DADA2 ved hjælp af SILVA v138.2 prokaryotisk SSU-referencedatabase (Quast et al., 2013).

Bioinformatisk analyse metagenomik

Shotgun-metagenomiske sekvensdata fra Vejle Fjord blev behandlet ved hjælp af den standardiserede og reproducerbare arbejdsgang nf-core/taxprofiler (v2.0.1). Analysen blev udført med Nextflow (v23.10.1) på et lokalt højtydende computersystem under et Linux-miljø. Alle kørsler blev containeriseret med Singularity for at sikre fuld versionskontrol og reproducerbarhed.

Parrede metagenomiske læsninger (*.fastq.gz) blev leveret som input, organiseret i et Nextflow-prøveskema. Taksonomisk klassificering blev udført ved hjælp af Kraken2-modulet i nf-core/taxprofiler, hvor der blev anvendt en lokalt opbygget referencedatabase (k2_standard_2025_08) baseret på NCBI RefSeq, der omfattede bakterier, arkæer, vira og eukaryoter. Kraken2 tildeler taksonomiske identiteter til læsninger ved hjælp af e n k-mer-baseret matchningstilgang, og de resulterende profiler blev eksporteret som .kraken2.report.txt-filer, der indeholdt relative forekomster for hvert detekteret taxon.

For at forbedre estimaterne af artsforekomsten blev Bracken (v2.9) anvendt på alle Kraken2-outputfiler. Bracken estimerer forekomsten på ny på baggrund af den probabilistiske fordeling af k-mere i referencedatabasen, hvilket forbedrer den kvantitative nøjagtighed på lavere taksonomiske niveauer. Tabeller over arts- og slægtsniveau fra både Kraken2- og Bracken-klassificeringer blev behandlet ved hjælp af brugerdefinerede Python-scripts, der matchede de påviste taxa med en foruddefineret liste over indikatororganismer relateret til spildevand. Scriptene anvendte minimumsgrænser (≥50 læsninger og ≥0,01 % relativ forekomst) og tildelte automatisk hver prøve til en af fem rumlige zoner langs Vejle Fjord-transsektet. Outputtet omfattede antallet og den relative forekomst af indikator-taxa pr. prøve og kategori, gennemsnitsværdier pr. zone og de ti mest forekommende indikatorer inden for hver zone, hvilket gav et konsistent grundlag for sammenligning af mikrobielle signaturer forbundet med rensningsanlæg på tværs af fjordgradienten.

Metode til identifikation af mikrobielle indikatorer for spildevandspåvirkning

For at identificere mikrobielle indikatorer for spildevandsrensningsanlægs (WWTP) indflydelse blev der udarbejdet en referenceliste baseret på tidligere undersøgelser, der beskriver bakteriegrupper, der typisk er forbundet med spildevand, rensningsprocesser, patogener og antibiotikaresistensgener i næringsrige recipientmiljøer. Grundlaget blev primært hentet fra Chu et al. (2018) og Beattie et al. (2020), suppleret med undersøgelser med fokus på aktivt slam-mikrobiologi, resistensspredning og forekomsten af opportunistiske patogener inden for og nedstrøms for rensningsanlæg.

Indikatorlisten blev udarbejdet ved at udtrække taksonomiske navne på bakterieslægter og -arter, der i litteraturen er rapporteret at være knyttet til fire hovedkategorier af indflydelse: WWTP_process, Recipient_indicator, Pathogen og ARG (se supplerende tabel 3). Disse kategorier repræsenterer forskellige mikrobielle komponenter i spildevandsrelateret fodaftryk og fungerede som analytisk ramme for fortolkning af både metagenomiske og metabarcoding-data.

Kategorien WWTP_process omfatter bakterielle taxa, der typisk forekommer i biologiske rensningsstadier i rensningsanlæg, hvilket indikerer direkte påvirkning fra procesvand eller lækage af aktivt slam til recipienten. Vigtige eksempler omfatter *Candidatus Accumulibacter, Tetrasphaera, Nitrosomonas, Nitrospira, Thauera, Paracoccus* og *Zoogloea,* som alle spiller en væsentlig rolle i nitrifikation, denitrifikation, fosforoptagelse og biofilmdannelse i aktivt slam (Coskuner & Curtis, 2002; Johnston et al., 2019). Påvisning af disse taxa uden for rensningsprocessen tolkes som bevis for procesrelateret indflydelse.

Kategorien Recipient_indicator omfatter taxa, der ikke er direkte knyttet til rensningsprocessen, men som vides at forekomme i større mængder i næringsstof- og organisk rige sedimenter og vandområder nedstrøms for punktkilder. Typiske eksempler er *Arcobacter, Acinetobacter, Bacteroides, Prevotella, Clostridium, Fusobacterium* og *Enterococcus,* som ofte forekommer i fækal eller bypåvirket vand (Fisher et al., 2014; Kristensen et al., 2020; Ghaju Shrestha et al., 2019; Beattie et al., 2020).
Deres tilstedeværelse fungerer således som en bredere økologisk indikator for spildevandets indvirkning på modtagende miljøer.

Kategorien Patogener omfatter potentielt patogene eller opportunistiske bakterier, der ofte findes i kommunalt eller hospitalsaffaldsvand. Denne gruppe omfatter *Aeromonas, Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Legionella pneumophila* og *Mycobacterium avium*, som alle er rapporteret at overleve rensningsprocesser og forblive i spildevand eller slam (Męcik et al., 2024; Eze et al., 2021). Disse taxa fungerer som specifikke advarselsindikatorer forbundet med sundhedsrelaterede risici.

Endelig omfatter kategorien ARG (antibiotikaresistensgener) bakterielle taxa, der ofte bærer resistensdeterminanter og dermed fungerer som indikatorer for spredning af antibiotikaresistens fra urbane og kliniske punktkilder.
Repræsentative eksempler omfatter *Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli ST131, Enterococcus faecium* og *Enterococcus faecalis*, som alle er

gentagne gange påvist i spildevand, slam og nedstrøms vandmiljøer (Marutescu et al., 2023; Murphy et al., 2021; Park et al., 2024; Radisic et al., 2024).

Listen blev taksonomisk harmoniseret med SILVA v138.1-referencedatabasen for at sikre overensstemmelse med den klassificering, der blev anvendt i 16S rRNA-metabarcoding-analysen.

For det metagenomiske datasæt blev taksonomiske profiler genereret med Kraken2 og justeret med Bracken, hvor sidstnævnte blev brugt til nedstrøms analyser på grund af dens højere nøjagtighed i estimering af artsniveauet. Til 16S rRNA-metabarcoding blev der anvendt ASV-niveau data produceret gennem nf-core/ampliseq-pipeline (DADA2-støjfjernelse; SILVA v138.1-klassificering).

Alle identificerede taxa fra metabarcoding og metagenomisk analyse blev sammenlignet med indikatorlisten, og match blev talt pr. prøve og pr. zone (T1–6 indre, T7–13 midterste, T14–19 ydre, T20–21 flodindløb). For hvert datasæt blev antallet af indikatorregistreringer beregnet, og overlapninger mellem metagenomiske og metabarcoding-indikatorer blev kvantificeret. Kun indikatorer, der forekom i mindst to uafhængige prøver pr. zone, blev bevaret til zonespecifikke sammenligninger. Resultaterne blev visualiseret som "Top 10 indikatorer pr. zone"-diagrammer for både Kraken2 og Bracken og som sammenlignende oversigter på tværs af metoder.

Lægemidler

Sedimentprøver blev ekstraheret ved hjælp af væske-væske-ekstraktion efterfulgt af fastfaseekstraktion (SPE) på HLB-patroner. Analysen blev udført ved hjælp af HPLC–MS/MS på IVL's laboratorium i Stockholm. Følgende isotopmærkede interne standarder blev anvendt til kvantificering: Carbamazepin-$^{13}C^{15}N$, Diclofenac-$^{13}C_6$, Hydrochlorothiazid-$^{13}C_6$, Atenolol-d_7, Metoprolol-d_7, Ibuprofen-d_3, Ciprofloxacin-d_8, Fluconazol-d_4, Sulfamethoxazol-$^{13}C_6$, Clarithromycin-N-methyl-d_3 og Trimethoprim-d_3.

De resulterende koncentrationsdata dannede grundlag for efterfølgende forekomstsscoring og indeksberegninger. For hver analyt og prøveudtagningsstation blev der opnået tre forskellige resultater efter instrumentel kvantificering: (i) kvantificerede koncentrationer over kvantificeringsgrænsen (LOQ), (ii) påvisninger under LOQ og (iii) ikke-påvisninger (ND). For at sikre konsistens på tværs af forbindelser og stationer blev disse kategorier standardiseret i henhold til de konventioner, der anvendes i den farmaceutiske vurdering. Detaljerede beskrivelser af kemikaliet

Analyserne findes i IVL-rapporten Pharmaceuticals, 25–0149, Vejle Fjord (IVL Swedish Environmental Research Institute). Det behandlede datasæt blev efterfølgende organiseret i en matrix med analytter pr. station, hvor humanmedicinske lægemidler og tekniske stoffer blev klassificeret og behandlet separat for at sikre klarhed i fortolkningen. De efterfølgende databehandlings- og scoringsprocedurer er beskrevet nedenfor.

For hver station (s) blev forekomstscoren (OccScore) beregnet som summen af vægtene pr. analyt for alle humane lægemidler. Vægten pr. analyt ($w_{(i,s)}$) blev sat til 1,0, når koncentrationen overskred kvantificeringsgrænsen (LOQ), 0,5, når analyten blev påvist, men var under LOQ, og 0, når den ikke blev påvist (ND). Med andre ord er OccScore for en given station lig med det samlede antal kvantificerede humane lægemidler (> LOQ) plus halvdelen af det antal, der blev påvist < LOQ, hvor ikke-påviste stoffer bidrager med nul (se lægemiddelrapporten, bilag X for LOQ'er og påvisningsfrekvenser).

Σ(6&4)-methylbenzotriazol (MeBT) blev behandlet separat, da det er et teknisk korrosionshæmmende middel og hydrologisk sporstof snarere end et humanmedicinsk lægemiddel.
MeBT-komponenten for station(er) blev defineret som følger: hvis MeBT blev kvantificeret (> LOQ), var komponenten lig med MeBT-koncentrationen divideret med 10; hvis MeBT blev påvist < LOQ, var komponenten lig med 0,5; og hvis MeBT ikke blev påvist, var komponenten lig med 0. Almindeligt benzotriazol blev ikke medtaget i lægemiddelsummen.

Human Pharmaceutical Index (HPI) for hver station blev derefter opnået ved at tilføje OccScore og MeBT-komponenten, således at HPI = OccScore + MeBT-komponent. Der blev udført følsomhedsanalyser ved hjælp af alternative vægtnings- og normaliseringsskemaer for at vurdere indeksets robusthed.

3 Resultater

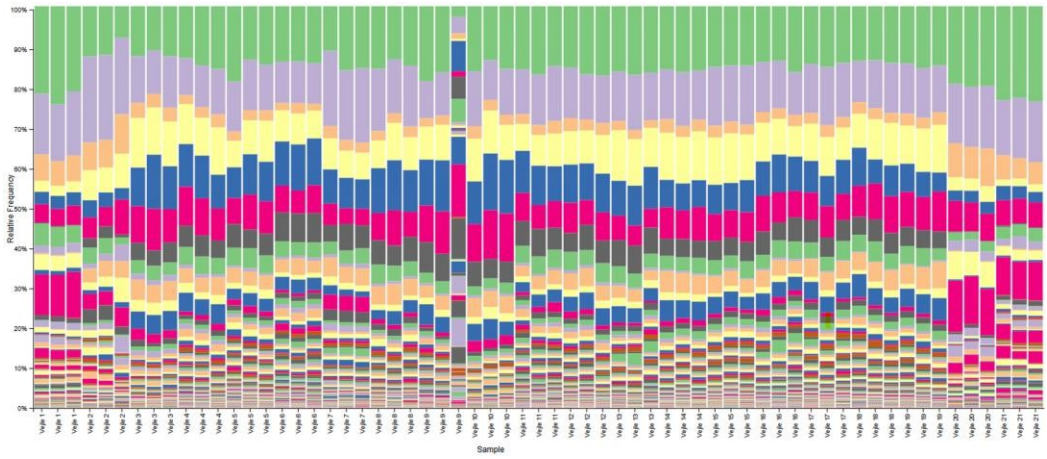
3.1 Metabarcoding

Sekventering og bioinformatik-workflow blev gennemført med succes ved hjælp af nf-core/ampliseq-pipeline (v2.14.0) under Singularity, herunder kvalitetskontrol, primer-trimming, DADA2-støjfjernelse, taksonomisk klassificering og vurdering af læsningsfordeling. Alle prøver bestod de indledende kvalitetsfiltre, og DADA2

konkluderede et stort antal unikke amplikonsekvensvarianter (ASV'er), hvilket indikerer en fremragende sekvensdiversitet og lav støj, mens fjernelsen af kimærer var effektiv med mindre end fem procent af læsningerne markeret som kimære. Barrnap-modulet bekræftede tilstedeværelsen af forventet rRNA-genindhold, hvilket verificerede en vellykket amplifikation af det målrettede område og fravær af off-target- eller kontaminerende sekvenser. Sekventeringsdybden var konsistent på tværs af replikater, som vist i det stablede læsningsfordelingsdiagram, hvilket sikrede sammenlignelighed mellem prøverne.
Taksonomisk klassificering ved hjælp af SILVA v138.1 afslørede en bred repræsentation af bakterielle taxa domineret af Proteobacteria, Bacteroidota og Actinobacteriota, hvor de fleste reads blev klassificeret på slægtsniveau, hvilket indikerer høj database-dækning og pålidelige sekvensdata. Samlet set demonstrerer sekventeringen og analysen høj datakvalitet og metodologisk robusthed, hvilket giver et solidt grundlag for downstream-analyser, herunder evaluering af indikatorarter.

Sekventeringsdataene viste en konsekvent høj læsningsretention og behandlingseffektivitet på tværs af alle 63 Vejle Fjord-prøver (se supplerende tabel 1). I gennemsnit passerede 98,9 % af de rå læsninger den indledende Cutadapt-filtrering, hvilket bekræftede en fremragende sekventeringskvalitet og effektiv primerfjernelse. Den efterfølgende DADA2-behandling opretholdt en tilsvarende høj effektivitet, hvor ca. 90-99 % af læsningerne blev bevaret efter filtrering, støjfjernelse, sammenlægning og fjernelse af kimærer. Det samlede datasæt bestod af 4,78 millioner rå læsninger, hvoraf 4,73 millioner passerede filtrene, og 1,29 millioner højkvalitets sammenføjede, ikke-kimære læsninger blev i sidste ende bevaret som amplikonsekvensvarianter (ASV'er). Disse læsninger repræsenterede 178.644 unikke amplikonsekvensvarianter (ASV'er) på tværs af alle prøver. De enkelte prøver udviste mindre variationer, hvor de fleste bevarede over 90 % af sekvenserne, bortset fra nogle få prøver med lavere udbytte (f.eks. Vejle20–21, Vejle19), der viste et højere læsetab (20–30 %) under sammenlægning og taksonomisk filtrering, hvilket sandsynligvis afspejler variationer i inputbiomassen eller amplikonkvaliteten. Samlet set var dataintegriteten og sekvensgenvindingen fremragende, hvilket bekræftede høj kvalitet af input-DNA og effektiv amplifikation og behandling. Det endelige datasæt er robust og velegnet til downstream-analyser af Vejle Fjord-systemet.

16S rRNA-metabarcoding-analysen gav i alt 178.644 ASV'er på tværs af alle prøver, svarende til 2,46 millioner sekvenstællinger. Størstedelen af ASV'erne blev tildelt bakterier (98,5 %), mens 1,4 % blev klassificeret som arkæer og < 0,2 % som Eukaryota. Den taksonomiske klassificering nåede 90,4 % af ASV'erne på fylum-niveau, 70,2 % på orden-niveau og 26,4 % på slægts-niveau. I alt 9 % af ASV'erne (≈ 16.000) blev med succes klassificeret på artsniveau, hvilket gav en finopløsning af sedimentets mikrobielle samfund.



Figur 2. Relativ forekomst af bakterielle taxa i sedimentprøver fra Vejle Fjord baseret på 16S rRNA-metabarcoding. Hver søjle repræsenterer en sedimentprøve (Vejle 1–21), og farverne angiver den relative hyppighed af taxa på familie- eller slægtsniveau. Der blev analyseret tre tekniske replikater pr. station, hvilket gjorde det muligt at evaluere reproducerbarheden på tværs af prøverne.

Den samlede bakteriesamfundssammensætning er vist i figur 2. Replikaterne udviste generelt høj konsistens, hvilket viser god reproducerbarhed af DNA-ekstraktion og sekventering. Nogle få replikater afveg en smule, hvilket sandsynligvis afspejler små rumlige variationer i sedimentets sammensætning eller variationer i DNA-kvaliteten. Et replikat (Vejle 9-3) afveg mere tydeligt fra de to andre replikater ved samme station. Denne afvigelse kan skyldes lokal mikroskala heterogenitet i sedimentet eller mindre tekniske variationer under ekstraktionen eller amplifikationen. I betragtning af den generelle konsistens på tværs af andre stationer blev dette replikat bibeholdt, men fortolket med forsigtighed.

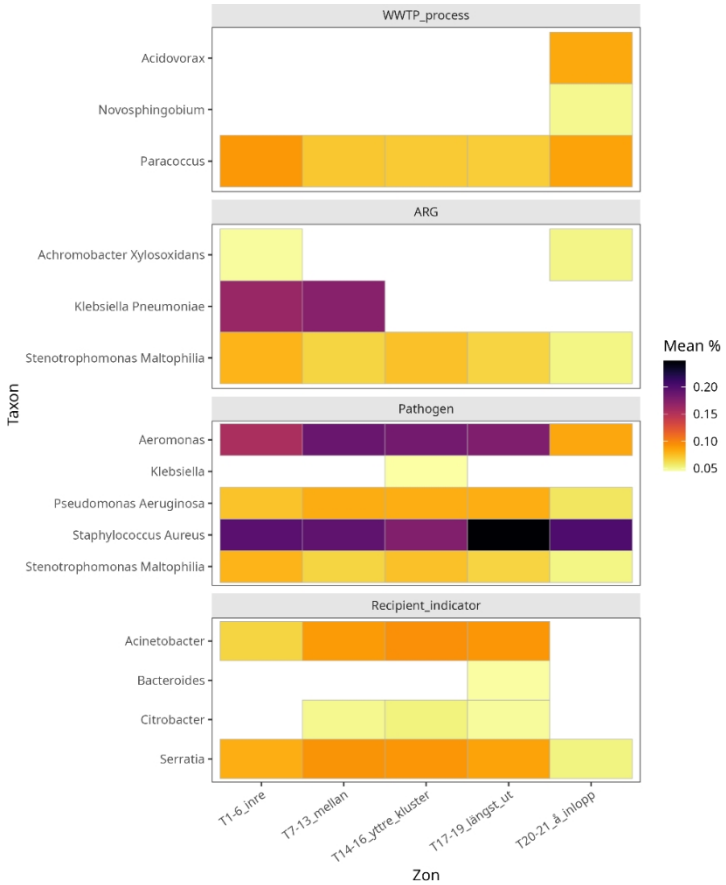
Prøver fra fjordmundingen (Vejle 1) og opstrøms flodsteder (Vejle 20–21) udviste tydelige fællesskabsprofiler sammenlignet med de mere marine stationer, hvilket indikerer en ferskvandspåvirkning på disse steder. Dette mønster afspejler sandsynligvis den gradvise overgang fra marine til brakke og ferskvandsforhold langs fjord-flod-kontinuummet.

3.2 Metagenomiske resultater

I alt 22 metagenomiske sedimentprøver blev sekventeret med succes af BMKgene ved hjælp af Illumina NovaSeq 6000-platformen. Sekventeringsresultatet varierede fra 21,8 til 38,6 millioner parrede læsninger pr. prøve, svarende til 6,5–11,6 Gb data af høj kvalitet (se supplerende tabel 2). På tværs af alle prøver var basekvalitetsscorerne gode, med Q20 = 100 % og Q30-værdier mellem 92,3 %

og 95,1 %, hvilket indikerer høj sekventeringsnøjagtighed og minimale fejlprocenter. GC-indholdet varierede fra 48,5 % til 60,0 %, hvilket afspejler den naturlige diversitet af mikrobielt og eukaryotisk DNA, der er til stede i sedimentmetagenomerne. I alt producerede sekventeringskampagnen ca. 567 millioner læsningspar (≈ 170 Gb) rådata.

De taksonomiske profiler, der blev genereret med nf-core/taxprofiler, afslørede et klart mønster af mikrobielle indikatorer forbundet med spildevandspåvirkning og antibiotikaresistensgener (ARG'er) i de indre dele af Vejle Fjord, med et gradvist fald i forekomsten mod det ydre recipientområde. Klassificering ved hjælp af Kraken2 efterfulgt af justering med Bracken viste lignende overordnede tendenser, men Bracken-resultaterne blev brugt som det primære grundlag for kvantitative sammenligninger, da de giver mere pålidelige estimater af artsrigdommen.



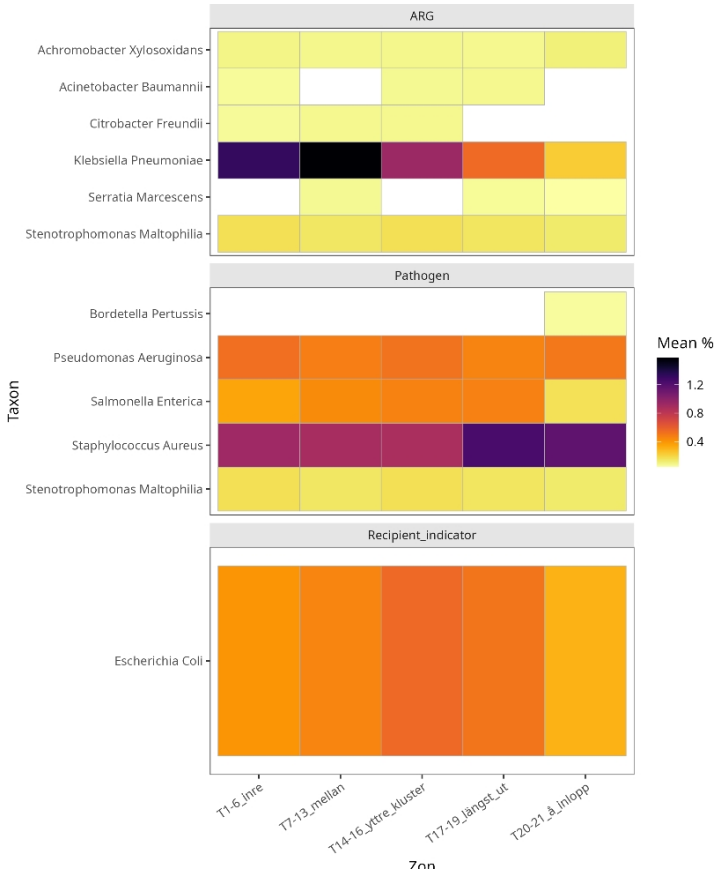
Figur 3. Topindikatorer pr. zone – Kraken2

Den zonale oversigtstabel (tabel x) viser de mest talrige taxa, der matchede de foruddefinerede lister over indikatorer for rensningsanlæg og modtagere. Denne oversigt viser, at taxaer forbundet med spildevandsrensningsprocesser (*Paracoccus, Thauera, Acidovorax, Zoogloea)* dominerer i de indre fjordzoner (1–6) og gradvist aftager mod de ydre zoner og flodzonerne, hvor modtagerrelaterede indikatorer (*Arcobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Enterococcus)* bliver mere hyppige.

Tabel 2. Topindikator-taxa pr. zone baseret på Bracken-resultater. Relativ forekomst (%) er gennemsnit pr. zone. Kun de ti hyppigst forekommende indikator-taxa på tværs af alle prøver er vist.

Zone	Dominerende indikatortaxa (Top 10 samlet)	Indikatorkategori	Gennemsnitlig relativ forekomst (	Fortolkning
1–6 (Indre fjord)	Paracoccus, Acidovorax, Nitrosomonas, Thauera, Zoogloea, Tetrasphaera, Defluviicoccus, Dechloromonas, Candidatus Accumulibacter, Propionivibrio	WWTP_proces	1,0–2,0	Stærkt WWTP-signal; domineret af typiske nitrifikatorer og denitrifikatorer knyttet til aktiverede slamprocesser.
7–13 (Mid fjord)	Paracoccus, Rhodocyclus, Thauera, Zoogloea, Nitrospira, Acidovorax	WWTP_proces	0,5–1,0	Overgangszone; reduceret forekomst af WWTP-associerede taxa.
14–16 (Ydre fjord)	Nitrospira, Candidatus Amarolinea, Propionivibrio, Candidatus Microthrix	WWTP_proces	0,2–0,6	Lav forekomst af resterende procesrelaterede taxa; baggrundssamfundet dominerer.
17–19 (Ydre fjord)	Arcobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Pseudomonas, Shewanella	Recipient_indikator	0,2–0,6	Skift mod generelle modtagerindikatorer og marine heterotrofer.
20–21 (Flodtilstrømning)	Arcobacter, Acinetobacter, Aeromonas, Enterococcus, Vibrio	Modtagerindikator	0,4–0,8	Stærk indflydelse fra ferskvand; dominans af recipient- og fækalindikatorer.

Det tilhørende heatmap visualiserer den samme rumlige gradient for yderligere indikatorkategorier – antibiotikaresistens (ARG), patogener og recipientindikatorer – og viser, hvordan den relative forekomst af disse grupper varierer mellem zonerne.



Figur 4. Topindikatorer pr. zone – Bracken

Sammen giver disse resultater et konsistent billede af indikatorfordelingen, hvor de indre fjordzoner er kendetegnet ved spildevands- og patogenrelaterede taxa, mens de ydre og opstrøms zoner i stigende grad domineres af modtager- og ferskvandsrelaterede indikatorer.

Taxa forbundet med spildevandsrensningsprocesser, såsom *Paracoccus* og *Acidovorax*, blev hovedsageligt påvist i de indre zoner tættest på udledningspunktet (1–6_inre og 20–21_å_inlopp). Deres forekomst faldt kraftigt længere ude i fjorden, hvilket indikerer en tydelig gradient af spildevandsrelateret indflydelse.

ARG-associerede taxa, herunder *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia* og *Achromobacter xylosoxidans*, viste forhøjede forekomster i de indre zoner (1–6 og 14–16), hvor *K. pneumoniae* udgjorde den højeste relative andel (>1 % af aflæsninger pr. prøve). Forekomsten faldt mod den ydre recipient (17–19), hvilket tyder på, at antibiotikaresistensmarkører spredes fra udledningspunktet, men fortyndes, når de spredes gennem fjorden.

Patogene bakterier såsom *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* og *Stenotrophomonas maltophilia* dominerede flere zoner, især nær udledningspunktet og i den indre fjord. *S. aureus* og *P. aeruginosa* udviste den højeste forekomst blandt alle indikatorgrupper og nåede op på 1,2 % af det samlede antal aflæsninger pr. prøve i Bracken-resultaterne. Disse fund indikerer, at disse arter er robuste indikatorer for mikrobiel påvirkning fra spildevand.

Taxa klassificeret som recipientindikatorer, herunder *Escherichia coli*, *Bacteroides* og *Acinetobacter*, blev fundet i alle zoner, men nåede deres højeste relative forekomst i den indre fjord. *E. coli* viste konsekvent forhøjede værdier i alle zoner, hvilket indikerer baggrundspåvirkning snarere end tydelig punktkildeforurening.

Sammenligning mellem Kraken2 og Bracken

Kraken2 og Bracken afslørede stort set ens gradienter og dominerende taxa, men Kraken2 havde en tendens til at overvurdere taxa med lav sekvensunikhed (f.eks. Klebsiella spp.). Bracken-korrektionen reducerede disse effekter og gav en klarere adskillelse mellem indikatorgrupperne. Zoneopdelte oversigter viste, at Bracken gav en højere samlet andel af læsninger klassificeret som indikatorer, især for ARG'er og patogener (2–2,5 % sammenlignet med <1 % for Kraken2). De samlede resultater viser, at mikrobielle indikatorarter, der er knyttet til både antibiotikaresistens og patogenicitet, er koncentreret i de indre fjordområder, især nær spildevandsudledningen. Resultaterne fra Bracken viser, at den gennemsnitlige andel af reads, der blev tildelt ARG- og patogengrupperne, varierede mellem 1–2 % i de indre zoner (1–6 og 7–13) og faldt gradvist mod de ydre fjordzoner (17–19). Modtagerindikatorerne forblev konsekvent under 0,6 %. Se tabel X for en zoneopdelt oversigt.

Tabel 3. Zoneopdelt oversigt over indikatorgrupper (Bracken-resultater).
Gennemsnitsværdierne repræsenterer den relative andel af aflæsninger (%) og antallet af identificerede taxa pr. indikatorgruppe og fjordzone.

Zone	ARG – gennemsnitlig %	ARG – taxa (n)	Patogen – gennemsnitlig %	Patogen – taxa (n)	Modtager – gennemsnitlig %
1–6	1,86	62	2,13	57	0,4
7–13	2,12	75	2,1	78	0,45
14–16	1,55	34	2,2	34	0,56
17–19	1,12	36	2,49	37	0,51
20–21	0,6	16	2,05	13	0,31

Bracken-resultaterne viser gennemsnitsværdier for tre indikatorgrupper – antibiotikaresistente bakterier (ARG), patogene indikatortaxa og recipientindikatorer – beregnet pr. zone i Vejle Fjord. Værdierne repræsenterer den gennemsnitlige andel af aflæsninger (%) og antallet af identificerede taxa i hver kategori. De højeste gennemsnitsværdier for både ARG'er og patogene indikatorer blev observeret i de indre fjordzoner (1–6 og 7–13), hvilket indikerer en rumlig gradient, der er i overensstemmelse med påvirkningen fra spildevandsrensningsanlæggets udløb, overlejret på naturlige og diffuse baggrundsvariationer.
Modtagerindikatorerne viste lavere og mere stabile værdier i hele fjorden. Dette indikerer, at både resistente og potentielt patogene bakterier transporteres ind i modtager miljøet, men gradvist fortyndes og aftager i mængde mod den åbne fjord.

Økologisk og miljømæssig fortolkning

Resultaterne afslører klare mikrobielle signaturer, der er i overensstemmelse med påvirkningen fra spildevandsrensningsanlæg. De dominerende indikatortaxa i de indre fjordzoner – såsom *Paracoccus*, *Acidovorax*, *Klebsiella pneumoniae* og *Pseudomonas aeruginosa* – er velkendte beboere i rensningsanlægsmiljøer og fungerer derfor som stærke markører for denne type påvirkning. Samtidig blev der også påvist organismer med bredere økologisk udbredelse, hvilket tyder på, at fjorden er påvirket af en kombination af kilder, herunder naturlige mikrobielle samfund og diffus afstrømning fra omgivende afvandingsområder.

Den observerede gradient, med højere forekomster af disse indikatorer i den indre fjord og gradvist lavere niveauer længere ude, understøtter fortolkningen af, at spildevandets indflydelse kan påvises og afgrænses geografisk ved hjælp af metagenomiske metoder. Resultaterne bør dog fortolkes under hensyntagen til fjordens komplekse hydrologi og de kumulative virkninger fra flere sektorer. Denne undersøgelse viser, at miljø-DNA og metagenomik kan bruges til objektivt at skelne mellem og kvantificere påvirkningen fra punktkilder, samtidig med at der tages højde for bidrag fra andre menneskeskabte eller naturlige processer.

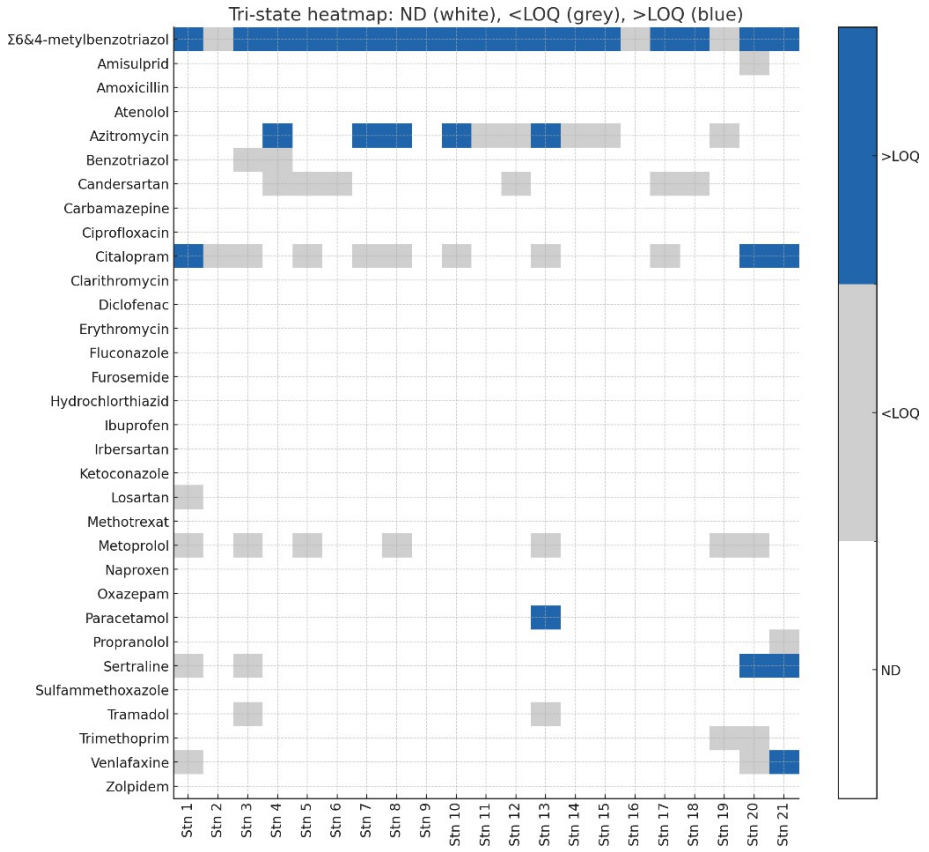
3.3 Farmaceutiske rester

Samlede resultater og kategorisering

Detektionsmatricen for 32 lægemidler, herunder korrosionshæmmeren Σ(6&4)-methylbenzotriazol (MeBT), er vist i figur 5. Hver forbindelse er kategoriseret som ikke påvist (ND), påvist under kvantificeringsgrænsen (<LOQ) eller kvantificeret over LOQ (>LOQ).

Σ(6&4)-MeBT blev påvist ved alle 21 stationer og kvantificeret over LOQ ved de fleste lokaliteter, hvilket bekræfter dets egnethed som en robust sporstof for input fra byområder og spildevand. Flere lægemidler, herunder azithromycin, citalopram, metoprolol og oxazepam, blev også påvist – primært i sedimenter fra stationerne i den indre og midterste del af fjorden – mens der blev fundet færre forbindelser i den ydre del af fjorden og ved floderne.

Dette rumlige mønster indikerer en gradient, der er i overensstemmelse med spildevandspåvirkning, der stammer fra den indre fjord og aftager mod mindre påvirkede zoner.



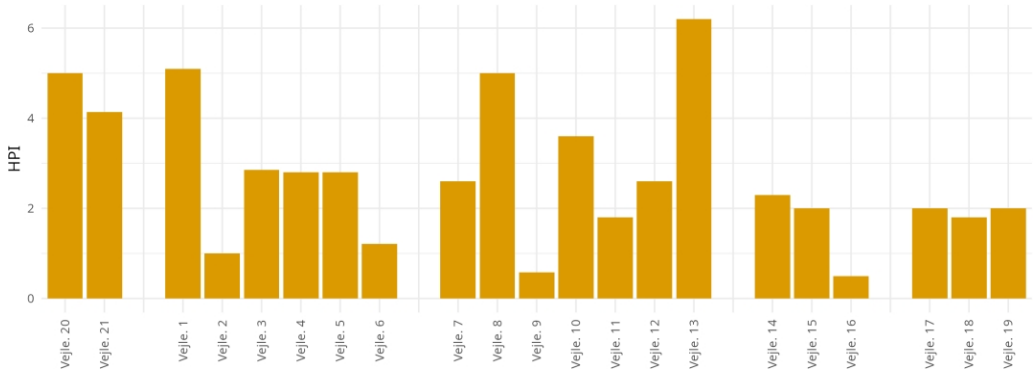
Figur 5. Tredelt heatmap, der viser påvisningsfrekvenser for Σ(6&4)-methylbenzotriazol og udvalgte lægemidler på 21 sedimentstationer i Vejle Fjord. Hvid = ikke påvist (ND), grå = <LOQ (under kvantificeringsgrænsen), blå = >LOQ (kvantificeret).

Humanmedicinske lægemidler – forekomst, niveauer og fortolkning

Ud over MeBT blev der påvist flere humanmedicinske lægemidler, som tilsammen dannede et tydeligt tegn på forurening i byområder. SSRI/SNRI-antidepressiva forekom både som kvantificerede koncentrationer og som <LOQ-påvisninger. Citalopram blev kvantificeret nær udløbet (Stn 1 ≈ 4) og især i flodstationerne (Stn 20

≈ 5,9; Stn 21 ≈ 21), hvilket viser en klar menneskelig indflydelse selv opstrøms for den indre fjord. Sertralin (Stn 20 ≈ 3,4; Stn 21 ≈ 8,5) og venlafaxin (Stn 21 ≈ 10) fulgte lignende mønstre. Samtidig f o r ekomst af flere antidepressiva er typisk for kommunalt spildevand og indikerer kontinuerlige snarere end episodiske emissioner. Azithromycin forekom i kvantificerbare niveauer ved flere stationer (f.eks. Stn 4 ≈ 5; Stn 10 ≈ 4; Stn 13 ≈ 9,3) og som <LOQ-detektioner andre steder; sammen med trimethoprim (hovedsageligt <LOQ) understøtter dette e n overvejende menneskelig snarere end veterinær oprindelse. Paracetamol viste en tydelig top i marinaen (Stn 13 ≈ 24), hvilket tyder på nylig menneskelig tilførsel og/eller begrænset nedbrydning under beskyttede forhold. Hjerte-kar-lægemidler såsom metoprolol, losartan og candesartan var hovedsageligt <LOQ, men deres udbredte forekomst bidrog til det samlede kemiske profil i byområder.

Samlet set underbygger disse fund fortolkningen af et signal domineret af rensningsanlæg, mens typiske agrokemiske markører var fraværende i det analytiske panel. Det sammensatte Human Pharmaceutical Index (HPI), der opsummerer antallet af kvantificerede forbindelser pr. station, er vist i figur 6.



Figur 6. Human Pharmaceutical Index (HPI) pr. sedimentstation i Vejle Fjord. Indekset repræsenterer antallet af lægemidler, der er kvantificeret over kvantificeringsgrænsen (>LOQ) ved hver station.

Lokale mønstre og kildeindikationer

Plumen fra det primære rensningsanlæg er tydelig i den indre fjord, men viser hydrodynamisk kompleksitet. Inden for sektoren Stn 1–6 forblev MeBT-koncentrationerne konstant forhøjede, og der blev påvist flere humane lægemidler, men koncentrationerne faldt ikke proportionalt med afstanden fra udløbet. Dette tyder på, at blanding, lokale cirkulationsmønstre og tilbageholdelse har lige så stor indflydelse på den observerede fordeling som simpel rumlig geometri. Længere ude afspejles dette ved station 8, hvor MeBT nåede op på ca. 30 trods afstanden fra udledningspunktet, hvilket indikerer resterende påvirkning og/eller retentionzoner. Station 10 også

et højt niveau (MeBT ~21), og i marinaen (station 13) blev mønsteret for akkumulering tydeligt: højt MeBT (~27) faldt sammen med paracetamol (~24) og azithromycin (~9,3), hvilket er typisk for et beskyttet miljø, hvor kemikalier kan akkumuleres og recirkulere mellem vand og overfladesediment. I Vejle Å (station 20–21) forekom flere SSRI/SNRI-forbindelser i kvantificerede niveauer (Citalopram 5,9/21; Sertralin 3,4/8,5; Venlafaxin 9,8), hvilket indikerer, at den urbane indflydelse allerede er stærk opstrøms for den indre fjord, og at floden fungerer som en transportvej for humanmedicinske lægemidler nedstrøms. De stationer, hvor MeBT kun blev påvist <LOQ (station 2, 16, 19), tyder på områder med mindre primær påvirkning eller stærkere fortynding på prøvetagningstidspunktet. Samlet set indikerer den geografiske fordeling – forstærket af HPI-rangeringen, hvor Stn 13 er højest efterfulgt af Stn 1/8/20 – at de observerede mønstre er i overensstemmelse med påvirkningen fra spildevandsudledninger; dog kan yderligere tilførsel fra bymæssig afstrømning og andre kilder ikke udelukkes.

4 Diskussion/analyse

Indikator-taxa og kildefortolkning

For at sætte de kvantitative resultater i tabel 1 i kontekst blev der foretaget en kvalitativ vurdering af de mest forekommende mikrobielle indikatortaxa, der blev observeret via Bracken-justeret metagenomisk profilering. Disse taxa kan groft inddeles i to kategorier: (i) slægter, der er stærkt forbundet med aktiveret slam og spildevandsrensningsprocesser, og (ii) slægter, der indikerer menneskelig eller fækal/zoonotisk oprindelse. Fortolkningen er primært baseret på Bracken-resultater; Kraken2 er kun angivet som supplerende kontekst.

Blandt slægter, der er forbundet med processer/aktiveret slam, blev *Paracoccus* og *Acidovorax* konsekvent påvist og er veldokumenteret i mikrobielle kerner fra rensningsanlæg. For eksempel blev *Paracoccus limosus* isoleret fra aktiveret slam i et kommunalt spildevandsrensningsanlæg (Lee & Lee, 2013). Disse slægter fungerer således som troværdige indikatorer for biomasse fra spildevandsrensningsanlæg i sedimenter og vandsøjler, især i indre fjordzoner. Acinetobacter er også ofte beriget i aktivt slam-systemer, undertiden forbundet med spredning af antibiotikaresistente gener (Kisková et al., 2023). Dens forhøjede relative forekomst i de indre zoner understøtter fortolkningen af et mikrobielt signal relateret til rensningsanlæg.

Den anden gruppe af taxa omfatter slægter som *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Staphylococcus aureus*, som ofte er forbundet med spildevand af human/klinisk oprindelse. For S. *aureus* har undersøgelser af rensningsanlæg f.eks. vist en prævalens af methicillinresistente isolater nedstrøms for rensningsanlæg (Amirsoleimani et al., 2019; Oladipo et al., 2023). Deres tilstedeværelse i sediment-/vandprofilen styrker yderligere en menneskelig/rensningsanlægs-komponent i det mikrobielle fodaftryk.

Slægter som *Escherichia coli* og *Salmonella enterica* er stadig vigtige som fækale eller zoonotiske indikatorer, men er mindre kildespecifikke: De kan stamme fra kommunalt spildevand, afstrømning af regnvand eller afstrømning fra landbruget. Undersøgelser viser f.eks. påvisning af *Salmonella enterica* i overfladevand i forbindelse med afstrømning fra husdyr (Chung et al., 2023). Deres forekomst i fjorden skal derfor fortolkes mere forsigtigt med hensyn til spildevandsrensningsanlægsspecifik indflydelse.

De relative forekomster, der er observeret her – typisk i området fra nogle få tiendedele af en procent op til ~1–2 % pr. takson – er rimeligt sammenlignelige med værdier observeret i fuldskalaundersøgelser af aktivt slam-samfund. For eksempel viste en stor undersøgelse af danske kommunale aktivt slam-anlæg, at kernearter udgjorde store andele af aflæsningerne, men at individuelle slægter ofte bidrog med meget mindre (Vestergaard et al., 2024). Den rumlige gradient, der observeres i tabel 1 – højere indikatorforekomster i de indre fjordzoner (tættest på udledningen) og reducerede niveauer i de ydre zoner – er i overensstemmelse med et scenarie med fortynding og blanding af behandlet spildevand i fjorden.

Sammenfattende afspejler de påviste indikatorarter hovedsageligt mikrobielle samfund, der stammer fra spildevandsrensningsprocesser, hvilket understøtter undersøgelsens mål om at identificere en specifik signatur for rensningsanlæg. Samtidig understreger forekomsten af generelle fækale/zoonotiske slægter, at andre veje (herunder landbrugs-/landbaseret afstrømning) ikke kan udelukkes. Samlet set indikerer resultaterne, at spildevandsudledningen har en målbar indflydelse på den mikrobielle sammensætning i de indre fjordzoner, mens yderligere diffuse tilførsler fra andre kilder også kan bidrage til de observerede mønstre.

Forekomstmønstre for lægemidler og relaterede forurenende stoffer

I alt blev der påvist 13 forskellige forbindelser i sedimentprøverne fra Vejle. Blandt disse var Σ(6&4)-methylbenzotriazol dominerende (påvist i alle 21 prøver, 18 over LOQ), efterfulgt af citalopram (14/21), azithromycin (11/21), metoprolol og candesartan (7/21 hver), sertralin (6/21) og venlafaxin (5/21).

Andre stoffer blev fundet mere sporadisk (trimethoprim 3/21; benzotriazol, tramadol 2/21; paracetamol, losartan, propranolol, amisulprid 1/21). For flere forbindelser var en stor del af påvisningerne under LOQ, hvilket indikerer en udbredt, men lav forekomst i sedimenterne. Denne påvisningsprofil er i overensstemmelse med tidligere fund fra Østersøområdet, hvor CNS-lægemidler (SSRI/SNRI), hjerte-kar-midler (betablokkere, ARB'er) og analgetika/antiinflammatoriske lægemidler har været de hyppigst rapporterede i vandmiljøer, især i nærheden af kommunale spildevandsudledninger (HELCOM, 2021).

Det stof, der blev påvist i alle prøver, var Σ(6&4)-methylbenzotriazol, med koncentrationer over LOQ i 18 af 21 sedimentprøver. Dette stof, der anvendes som korrosionshæmmer i industriprodukter, er ikke et lægemiddel i sig selv, men er kendt for sin persistens og hyppige forekomst i bymæssige og industrielle recipientvande. Den beslægtede forbindelse benzotriazol blev også påvist, men kun i to prøver og under LOQ, muligvis på grund af lavere anvendelse eller forskellig transportadfærd. Blandt lægemidlerne var antibiotikummet azithromycin et af de hyppigst påviste (11/21 prøver, 6 >LOQ). Azithromycin er et makrolidantibiotikum, der er kendt for sin miljømæssige stabilitet og bidrag til udviklingen af antimikrobiel resistens. Tilsvarende blev antidepressiva citalopram fundet i 14 prøver, dog kun 4 over LOQ. Disse forbindelser er begge meget udbredt i husholdninger og har fysisk-kemiske egenskaber, der fremmer langvarig akkumulering i sedimenter. Andre antidepressiva, såsom sertralin (6/21, 2
>LOQ) og venlafaxin (5/21, 2 >LOQ) forekom mindre hyppigt, men bekræfter stadig, at psykofarmaka er almindelige i miljøet, selv i spormængder. Det er påvist, at de påvirker fiskes adfærd og reproduktion i miljømæssigt relevante koncentrationer. Analgetika som tramadol og paracetamol blev fundet i færre prøver (henholdsvis 2 og 1), hvilket er i overensstemmelse med deres relativt hurtige nedbrydning i vandmiljøer. Betablokkere og antihypertensiva såsom metoprolol (7/21), candesartan (7/21), losartan (1/21) og propranolol (1/21) forekom generelt under LOQ, hvilket kan afspejle lav sedimentaffinitet eller nedbrydning i vandsøjlen før sedimentering. Antibiotikummet trimethoprim, der ofte påvises i overfladevand, blev kun fundet i 3 prøver i meget lave niveauer (<LOQ) på trods af dets kendte persistens.

Interaktioner mellem kemiske egenskaber og miljøadfærd

Mønstrene for forekomsten i sedimentet afspejler nøje kendte miljøegenskaber såsom lav nedbrydelighed, høj anvendelsesfrekvens og fysisk-kemiske egenskaber, der fremmer partikeladsorption. Forbindelser, der er vandopløselige, men alligevel modstandsdygtige over for nedbrydning (f.eks. azithromycin, citalopram) er mere

ofte påvist end dem, der er mere biologisk nedbrydelige eller mindre udbredte. Det faktum, at mange påvisninger ligger under LOQ, men stadig er målbare, understreger vigtigheden af analytisk følsomhed og tyder på, at selv lave koncentrationer bør tages i betragtning ved vurderingen af miljørisikoen – især for stoffer med additive eller synergistiske virkninger.

Sammenligninger med regionale undersøgelser viser, at resultaterne fra Vejle ligner det typiske spildevandsrelaterede mønster, der observeres i akvatiske sedimenter. Den høje påvisningsfrekvens af Σ(6&4)-methylbenzotriazol – et korrosionshæmmende middel af urban oprindelse – sammen med flere lægemidler, der ofte forbindes med kommunalt spildevand (f.eks. SSRI/SNRI-antidepressiva, betablokkere, ARB'er og antibiotika), tyder på, at spildevandsudledninger sandsynligvis udgør en vigtig kildekomponent i den indre fjord. Samtidig er den høje andel af <LOQ-fund i overensstemmelse med tidligere observationer af, at lægemidler i sedimenter ofte forekommer i lave koncentrationer, men stadig kan være økologisk relevante (HELCOM, 2021).
Eksperimentelle undersøgelser i regionen har f.eks. vist, at citalopram kan ændre fiskenes adfærd ved ≤0,15 µg/L (Brodin et al., 2013; Kellner et al., 2015), og at forbindelser som propranolol, diclofenac og ibuprofen kan påvirke blåmuslingers byssusproduktion, energibalance (Scope for Growth) og algefotosyntese ved lave niveauer (Ericson et al., 2010; Eriksson Wiklund et al., 2011; Kumblad et al., 2015; Oskarsson et al., 2012, 2014). Dette indikerer, at selv de sub-LOQ-koncentrationer, der findes i sedimenter i Vejle, kan bidrage til langsigtede økologiske effekter, især i kombination. Samlet set er det farmaceutiske profil for sedimenter i Vejle ikke kun i overensstemmelse med regionale mønstre, men tyder også på potentielle risici for kroniske økologiske påvirkninger.

Integration af molekylære og kemiske indikatorer

Integrationen af molekylære og kemiske beviser giver et sammenhængende billede af spildevandets indflydelse i Vejle Fjord. Både metagenomiske og metabarcoding-datasæt blev analyseret i forhold til en foruddefineret liste over spildevandsrelaterede indikatortaxa, der repræsenterer tre funktionelle kategorier: (i) indikatorer for rensningsanlægsprocesser (f.eks. Paracoccus, Tetrasphaera, Nitrospira), (ii) antibiotikaresistensassocierede taxa (ARG-indikatorer) og (iii) recipientindikatorer, der afspejler miljørespons.

I de metagenomiske data var den relative forekomst og antallet af indikatorer højest i de indre fjordzoner, især nær udledningsområdet, og faldt gradvist mod de ydre fjordzoner. Denne tendens faldt sammen med forhøjede koncentrationer af lægemidler såsom antidepressiva og antibiotika, der blev påvist i sedimentprøver, hvilket bekræftede tilstedeværelsen af et spor af byspildevand.

16S-metabarcoding-datasættet blev evalueret separat ved hjælp af den samme indikatorliste for at muliggøre en direkte sammenligning mellem metoderne. Flere WWTP-proces- og ARG-associerede taxa blev udelukkende påvist i prøverne fra den indre fjord, mens recipientindikatorerne var mere jævnt fordelt eller forekom i lav relativ abundans i hele fjorden. Overensstemmelsen mellem de to molekylære tilgange styrker fortolkningen af, at disse taxa er pålidelige indikatorer for spildevandets indflydelse på fjordsedimenterne.

Sammenlignet med de kemiske resultater stemte de molekylære indikatorer – især *Tetrasphaera*, *Nitrospira*, *Paracoccus* og Acidovorax – overens med de zoner, der viste den højeste kumulative farmaceutiske belastning. Sammen afgrænser disse molekylære og kemiske signaler en klar rumlig gradient, der er i overensstemmelse med den hydrodynamiske og næringsstofmodellering af Vejle Fjord (Lees et al., 2022). De integrerede beviser tyder på, at sedimenter i den indre fjord fungerer som en lokal dræn for mikroorganismer og forbindelser fra spildevand, mens zoner i den ydre fjord afspejler baggrunds- eller diffuse tilførsler.

5 Referenceliste

Amirsoleimani, A., et al. (2019). Prevalence and characterization of Staphylococcus aureus in municipal wastewater treatment plants. Journal of Water and Health, 17(3), 450–462.

aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Lægemidler i miljøet – globale forekomster og perspektiver.
Miljøtoksikologi og kemi, 35(4), 823–835.*

Beattie, R. E., et al. (2020). Mikrobielle samfund i ferskvandssedimenter er ikke modstandsdygtige over for forstyrrelser fra afstrømning fra landbrugsjord. Frontiers in Microbiology, 11, 539921.*

Bengtsson-Palme, J., & Larsson, D. G. J. (2016). Koncentrationer af antibiotika, der forventes at udvælge resistente bakterier: Foreslåede grænser for miljøregulering. Environment International, 86, 140–149.*

Christensen, P. B., Rysgaard, S., Sloth, N. P., Dalsgaard, T., & Schwærter, S. (1999). Sedimentmineralisering, næringsstofstrømme, denitrifikation og dissimilatorisk nitratreduktion til ammonium i en estuarin fjord (Aarhus Bugt, Danmark). Marine Ecology Progress Series, 179, 13–25.*

Chu, B. T. T., et al. (2018). Metagenomik afslører spildevandsrensningsanlægs indvirkning på spredningen af mikroorganismer og gener i akvatiske sedimenter. Applied and Environmental Microbiology, 84(5), e02168-17.*

Chung, T., et al. (2023). Betingede skovmodeller opbygget ved hjælp af metagenomiske data for Salmonella-forurening af nordøstlige vandløb. Environmental Science & Technology, 57(12), 7129–7140.*

Corcoran, J., Winter, M. J., & Tyler, C. R. (2010). Lægemidler i vandmiljøet: En kritisk gennemgang af dokumentationen for sundhedsmæssige virkninger hos fisk. Critical Reviews in Toxicology, 40(4), 287–304.*

Coskuner, G., & Curtis, T. P. (2002). In situ-karakterisering af nitrifikatorer i et aktivt slam-anlæg: Påvisning af Nitrosomonas og Nitrobacter ved hjælp af FISH. Journal of Applied Microbiology, 93(3), 431–437.*

Eze, E. C., et al. (2021). Antibiotikaresistens og biofilmdannelse af Acinetobacter baumannii isoleret fra hospitalsaffaldsvand. Science of the Total Environment, 788, 147819.*

Fisher, J. C., et al. (2014). Populationsdynamik og økologi af Arcobacter i spildevand. Applied and Environmental Microbiology, 80(1), 163–172.*

Förstner, U., & Wittmann, G. T. W. (2012). Metalforurening i vandmiljøet. Springer Science & Business Media.*

Gaw, S., Thomas, K. V., & Hutchinson, T. H. (2014). Kilder, virkninger og tendenser for lægemidler i havmiljøet. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 369(1656), 20130572.*

Ghaju Shrestha, R., et al. (2019). Reduktion af Arcobacter på to konventionelle spildevandsrensningsanlæg i det sydlige Arizona, USA. Pathogens, 8(4), 175.*

HELCOM. (2021). Lægemidler i Østersømiljøet. Baltic Sea Environment Proceedings No. 167. Helsinki-kommissionen.*

Jelić, A., Gros, M., Ginebreda, A., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F., Petrovic, M., & Barceló, D. (2012). Forekomst, fordeling og fjernelse af lægemidler i spildevands- og slamprøver fra forskellige rensningsanlæg. Water Research, 46(3), 1165–1176.*

Johnston, J., et al. (2019). Sammensætning og dynamik i det aktiverede slam-mikrobiom i et spildevandsrensningsanlæg i tempereret klima. Scientific Reports, 9, 971.*

Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., & Flick, R. W. (2007). Sammenbrud af en fiskebestand efter eksponering for syntetisk østrogen. PNAS, 104(21), 8897–8901.*

Kisková, J., et al. (2023). Antibiotikaresistens og genetisk variabilitet i Acinetobacter-samfundet afhængigt af spildevandsrensningens stadium. Environmental Science and Pollution Research, 30(12), 24978–24989.*

Kristensen, J. M., et al. (2020). Arcobacter er rigeligt forekommende i tilstrømningen og kan påvises i behandlet spildevand fra kommunale rensningsanlæg. Applied and Environmental Microbiology, 86, e03044-19.*

Kümmerer, K. (2009). Lægemidler i miljøet: Kilder, skæbne, virkninger og risici (3. udgave). Springer.*

Lee, M.-J., & Lee, S.-S. (2013). Paracoccus limosus sp. nov., isoleret fra aktivt slam i et rensningsanlæg. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(4), 1311–1316.*

Lees, M. K., Flindt, M. R., & Canal-Vergés, P. (2022). Modelaktivitet i projekt Sund Vejle Fjord: Simulering af opholdstid, næringsstofreduktioner, ålegræsudplantning og overløbshændelser. SDU Biologi-rapport, Biologisk Institut, Syddansk Universitet.*

Maghsodian, Z., et al. (2022). Forekomst og fordeling af antibiotika i vand, sedimenter og organismer i akvatiske miljøer. Environmental Sciences Europe, 34, 132.*

Marutescu, L. G., et al. (2023). Spildevandsrensningsanlæg som en "flugtvej" for antimikrobiel resistens. Frontiers in Microbiology, 14, 1193907.*

Martinez, J. L. (2009). Miljøforurening med antibiotika og antibiotikaresistensdeterminanter. Environmental Pollution, 157(11), 2893–2902.*

Męcik, M., et al. (2024). Spildevand fra hospitaler og kommuner som kilde til opportunistiske patogener, herunder Acinetobacter baumannii. Environmental Microbiology Reports, 16(1), e100876.*

Miljøstyrelsen. (2023). Vejle Fjord: Iltsvind og miljøstatus 2023. København: Miljøstyrelsen.*

Munk, P., et al. (2022). Genomic analysis of sewage from 101 countries reveals global patterns in antimicrobial resistance genes. Nature Communications, 13, 396.*

Murphy, A., et al. (2021). Flodvand i nærheden af spildevandsrensningsanlæg viser tilstrømning af multiresistent Acinetobacter baumannii. Microbiology Spectrum, 9(2), e00941 -21.*

Oladipo, A. O., et al. (2023). Påvisning af mecA-positive stafylokokker i et spildevandsrensningsanlæg. Environmental Science and Pollution Research, 30(4), 3256 – 3265.*

Park, J. H., et al. (2024). Omfattende undersøgelse af antibiotikaresistens hos Enterococcus spp. i spildevandsrensningsanlæg. Science of the Total Environment, 916, 170537.*

Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman Jr, C. U., & Mohan, D. (2019). Lægemidler, der giver anledning til bekymring i akvatiske systemer: Kemi, forekomst, virkninger og fjernelsesmetoder. Chemical Reviews, 119(6), 3510–3673.*

Pillay, S., et al. (2025). Metagenomisk analyse af antibiotikaresistens i det urbane spildevandskontinuum. Heliyon, 11, e01300.*

Radisic, V., et al. (2024). Multiresistente Enterococcus faecium-stammer kommer ud i miljøet via rå og renset spildevand. Water Research, 242, 120352.*

Rizzo, L., et al. (2013). Urbane spildevandsrensningsanlæg som hotspots for antibiotikaresistente bakterier og spredning af gener til miljøet: En gennemgang. Science of the Total Environment, 447, 345–360.*

Świacka, K., et al. (2023). Påvirker lægemidler mikrobielle samfund i vandmiljøer miljøer? En gennemgang. Frontiers in Environmental Science, 10, 1093920.*

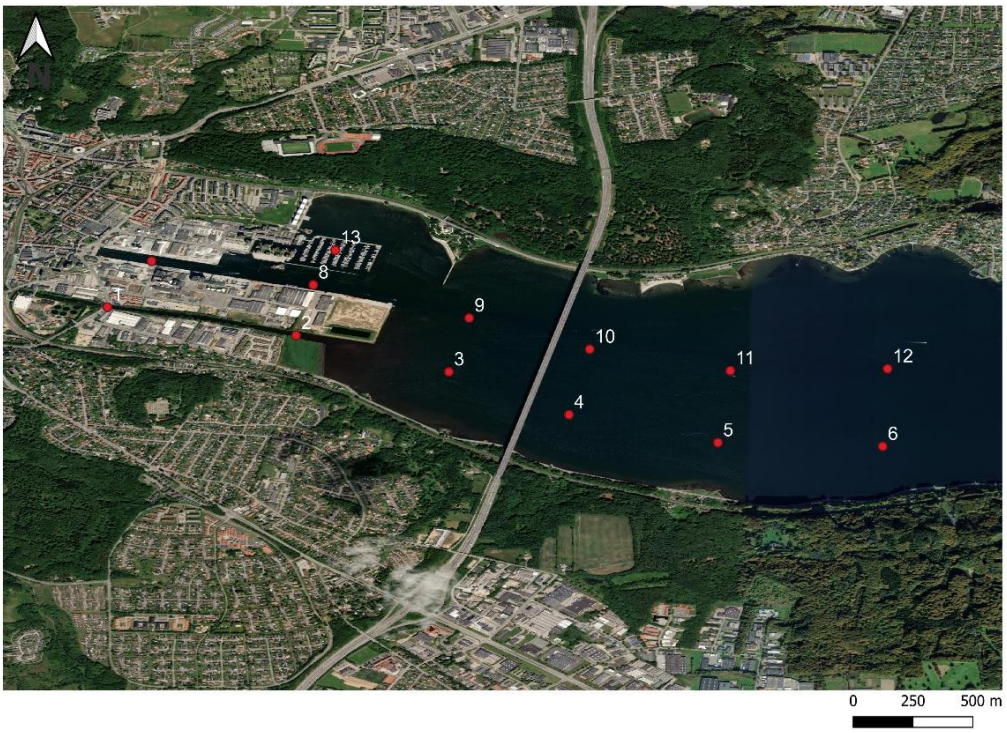
Uluseker, C., et al. (2021). En gennemgang af forekomsten og spredningen af antibiotikaresistens i spildevand og spildevandsrensningsanlæg: Mekanismer og perspektiver. Frontiers in Microbiology, 12, 717809.*

Syddansk Universitet (SDU). (2023). Vejle Fjord-modellen – Statusrapport. Biologisk Institut, Syddansk Universitet.*

Vestergaard, S. Z., et al. (2024). Mikrobielle kernesamfund i aktivslambehandlingsanlæg påvirkes ikke af procesdesign, men viser geografiske signaturer. Environmental Microbiome, 19, 14.*

Xie, Z., et al. (2017). Bioakkumulering og trofisk overførsel af lægemidler i Taihu-søen, Kina. Environment International, 107, 137–147.*

Bilag



Figur S1. Zonegruppering af prøvetagningsstationer i Vejle Fjord. Kort, der illustrerer de fire rumlige zoner, der er anvendt i analyserne: Indre fjord (stationer 1–6), Midterste fjord (7–13). Baggrundskort: © Geodatastyrelsen, Danmark.

Figur S2. Prøvetagningsstationer i Vejle Å (station 20–21). Baggrundskort: © Geodatastyrelsen, Danmark.

Supplerende tabel S1. Kvalitetskontrol og oversigt over læsningsbehandling for repræsentative sedimentprøver fra Vejle Fjord (nf-core/ampliseq v2.14.0). Tabellen opsummerer de vigtigste behandlingstrin fra rå læsninger til endelige taksonomisk klassificerede sekvenser af prøver (BaVejle1–63). Kolonnerne viser antallet af læsningspar i hvert trin af arbejdsgangen: samlet antal læsninger behandlet af Cutadapt, læsninger, der passerer primer- og kvalitetsfiltre, og læsninger, der bevares.
efter DADA2-filtrering, støjfjernelse, sammenlægning og fjernelse af kimærer. "Input tax filter" refererer til antallet af læsninger, der er underlagt taksonomisk klassificering, mens "filtered tax filter" viser antallet af læsninger, der er klassificeret med succes. "Beholdt procent" angiver andelen af læsninger, der er bevaret efter alle kvalitetskontrolstrin, og "tabt procent" repræsenterer læsninger, der er fjernet under filtrering og kimæredetektion. Samlet set var datakvaliteten og læsningsbevarelsen høj (>90 % i de fleste prøver), hvilket bekræfter effektiv sekventering og robust bioinformatisk behandling.

prøve	cutadapt samlet behandlet	cutadapt passerer filtre	cutadapt passerende filtre procent	DADA2 input	filtreret	støjfjernetF	støjfjernetR	sammenlagt	nonchim	input skatterfilter	filtreret skatterfilter	tabt	bevaret procent	tabt procent
BaVejle1	93.452	92.321	98,8	92321	85161	64063	68440	26203	23899	23899	21681	2218	90,7	9,3
BaVejle2	81.165	79.589	98,1	79589	69907	52446	56285	21794	19548	19548	17450	2098	89,3	10,7
BaVejle3	74.992	74.021	98,7	74021	68467	51384	55102	21785	19842	19842	17789	2053	89,7	10,3
BaVejle4	76.954	76.320	99,2	76320	69020	54105	57549	25256	22838	22838	17197	5641	75,3	24,7
BaVejle5	56.826	55.986	98,5	55986	50915	38462	40997	17144	15995	15995	13072	2923	81,7	18,3
BaVejle6	95.065	94.145	99,0	94145	87018	67519	71794	28193	25302	25302	25105	197	99,2	0,8
BaVejle7	64.773	64.081	98,9	64081	58944	46370	48047	19430	17511	17511	17378	133	99,2	0,8
BaVejle8	67.923	67.237	99,0	67237	62372	49312	50862	19856	17652	17652	17259	393	97,8	2,2
BaVejle9	64.539	63.916	99,0	63916	57881	45426	47068	18939	17038	17038	16528	510	97,0	3,0
BaVejle10	77.993	77.287	99,1	77287	70869	55623	57363	22665	20344	20344	19584	760	96,3	3,7
BaVejle11	65.760	65.116	99,0	65116	58597	45400	46807	18430	16628	16628	15591	1037	93,8	6,2
BaVejle12	57.694	57.061	98,9	57061	50984	39128	41119	15617	14307	14307	14184	123	99,1	0,9
BaVejle13	88.503	87.524	98,9	87524	78976	61000	63316	24254	22260	22260	20868	1392	93,7	6,3
BaVejle14	52.669	52.004	98,7	52004	47390	36087	37619	14900	13784	13784	13135	649	95,3	4,7
BaVejle15	85.463	84.346	98,7	84346	76050	59320	61362	23932	21492	21492	20204	1288	94,0	6,0
BaVejle16	74.965	74.176	98,9	74176	67835	53382	54770	22518	20819	20819	20433	386	98,1	1,9
BaVejle17	72.179	71.624	99,2	71624	65380	51989	53725	22868	21037	21037	20659	378	98,2	1,8
BaVejle18	92.675	91.522	98,8	91522	80206	63859	66098	26144	23763	23763	23389	374	98,4	1,6
BaVejle19	100.220	99.413	99,2	99413	90311	73849	76339	36605	28337	28337	21856	6481	77,1	22,9
BaVejle20	130.325	128.922	98,9	128922	109602	90595	93290	45743	34806	34806	24944	9862	71,7	28,3
BaVejle21	53.229	52.579	98,8	52579	47500	37754	39351	18980	15081	15081	10168	4913	67,4	32,6
BaVejle22	63.106	62.511	99,1	62511	56850	44338	45853	17738	16011	16011	14622	1389	91,3	8,7
BaVejle23	67.843	67.248	99,1	67248	60714	47858	49429	19329	17338	17338	16785	553	96,8	3,2
BaVejle24	65.148	64.398	98,8	64398	59719	46713	48890	20124	18060	18060	16848	1212	93,3	6,7
BaVejle25	92.862	91.673	98,7	91673	84048	69619	71304	31903	27657	27657	26910	747	97,3	2,7
BaVejle26	83.925	83.146	99,1	83146	76168	62185	63857	26775	23148	23148	21940	1208	94,8	5,2
BaVejle27	111.293	110.291	99,1	110291	99071	80860	84479	42567	36500	36500	36157	343	99,1	0,9
BaVejle28	69.756	68.995	98,9	68995	62469	51016	53001	23293	19897	19897	17599	2298	88,5	11,5
BaVejle29	66.273	65.687	99,1	65687	59489	48427	50088	21352	18729	18729	17464	1265	93,2	6,8
BaVejle30	103.727	102.764	99,1	102764	93498	77199	78958	34099	28196	28196	25406	2790	90,1	9,9
BaVejle31	80.135	79.351	99,0	79351	71346	55627	57708	22272	20513	20513	19944	569	97,2	2,8
BaVejle32	63.000	62.389	99,0	62389	56709	43624	45342	17611	16447	16447	15692	755	95,4	4,6
BaVejle33	98.481	97.350	98,9	97350	87719	69104	70953	28934	26401	26401	24955	1446	94,5	5,5
BaVejle34	91.757	90.797	99,0	90797	82417	65081	67329	27454	24722	24722	23839	883	96,4	3,6
BaVejle35	65.993	65.425	99,1	65425	59967	46684	48090	19735	18009	18009	17145	864	95,2	4,8
BaVejle36	52.910	52.146	98,6	52146	47743	36482	37805	14122	12974	12974	12328	646	95,0	5,0
BaVejle37	52.999	52.570	99,2 %	52570	47738	37212	38395	14647	13134	13134	12858	276	97,9	2,1
BaVejle38	50.680	50.241	99,1	50241	45438	35511	36943	14409	12961	12961	12787	174	98,7	1,3
BaVejle39	68.245	67.576	99,0	67576	61331	49261	50614	20922	18915	18915	18802	113	99,4	0,6
BaVejle40	59.385	58.612	98,7	58612	52894	41294	42795	17755	16364	16364	15884	480	97,1	2,9
BaVejle41	89.097	88.122	98,9	88122	76322	60059	62205	24992	22962	22962	21759	1203	94,8	5,2
BaVejle42	65.560	64.797	98,8	64797	59126	46105	47873	19594	17949	17949	17122	827	95,4	4,6
BaVejle43	83.094	82.169	98,9	82169	74595	58564	61036	24313	21705	21705	20561	1144	94,7	5,3
BaVejle44	67.043	66.479	99,2	66479	60504	47386	49455	21126	19393	19393	18375	1018	94,8	5,2
BaVejle45	78.252	77.506	99,0	77506	70391	54639	57160	22240	19849	19849	18806	1043	94,7	5,3
BaVejle46	73.218	72.577	99,1	72577	65497	51887	54004	24054	21827	21827	19182	2645	87,9	12,1
BaVejle47	71.139	70.543	99,2	70543	64812	50439	52525	21095	19290	19290	17771	1519	92,1	7,9
BaVejle48	86.617	85.548	98,8	85548	78477	62037	64257	27658	25450	25450	23489	1961	92,3	7,7
BaVejle49	77.888	77.225	99,1	77225	71065	55990	57907	23883	21467	21467	20776	691	96,8	3,2
BaVejle50	90.400	89.443	98,9	89443	83098	66384	68015	29241	25900	25900	23794	2106	91,9	8,1
BaVejle51	66.457	65.849	99,1	65849	59575	46057	47597	18867	17406	17406	16712	694	96,0	4,0
BaVejle52	88.201	87.177	98,8 %	87177	76490	60871	62803	25740	23041	23041	22698	343	98,5	1,5
BaVejle53	56.329	55.632	98,8	55632	50634	38229	39905	15515	14414	14414	13899	515	96,4	3,6
BaVejle54	91.118	90.303	99,1	90303	78991	62320	64457	25821	23113	23113	22633	480	97,9	2,1
BaVejle55	76.034	75.427	99,2	75427	68564	53897	55959	23037	20918	20918	20247	671	96,8	3,2
BaVejle56	70.360	69.345	98,6	69345	63479	49566	51797	20964	19113	19113	18602	511	97,3	2,7
BaVejle57	101.452	100.342	98,9	100342	92252	74882	77409	34743	30347	30347	29316	1031	96,6	3,4
BaVejle58	71.207	70.259	98,7	70259	64136	49133	52703	20828	18951	18951	18563	388	98,0	2,0
BaVejle59	61.878	61.246	99,0	61246	56204	42495	45710	17774	16410	16410	15891	519	96,8	3,2
BaVejle60	50.563	49.964	98,8	49964	45267	33864	36690	14128	13105	13105	13046	59	99,5	0,5
BaVejle61	84.625	83.746	99,0	83746	75667	58317	61790	24714	22660	22660	21266	1394	93,8	6,2
BaVejle62	74.119	73.419	99,1	73419	66736	50802	54477	21687	19567	19567	17774	1793	90,8	9,2
BaVejle63	69.726	69.030	99,0	69030	63097	48103	51415	20304	18702	18702	17338	1364	92,7	7,3

Supplerende tabel S2. Sekventeringsoutput og kvalitetsmålinger for metagenomiske biblioteker fra Vejle Fjord. Tabellen opsummerer rå læsestatistikker og sekventeringskvalitet for 22 metagenomiske sedimentprøver (Vejlemg1–22) genereret på Illumina NovaSeq 6000-platformen (paired-end 150 bp-tilstand). Kolonnerne viser det samlede antal læsningspar, det samlede udbytte i gigabaser (Gb) og andelen af baser med Phred-kvalitetsscores over henholdsvis 20 (Q20) og 30 (Q30). GC (%) angiver det samlede guanin-cytosinindhold pr. prøve, hvilket afspejler diversiteten af mikrobielt og eukaryotisk DNA i sedimenterne. Alle biblioteker udviste fremragende sekventeringskvalitet med Q20 = 100 % og Q30-værdier mellem 92 % og 95 %, hvilket bekræfter høj dataintegritet, der er egnet til efterfølgende taksonomiske og funktionelle analyser.

Prøve-ID	Læsninger (par)	Udbyttet (Gb)	Q20 (	Q30 (%)	GC (%)
Vejlemg1	22304465	6,683377369	100	92,38	59,31
Vejlemg2	23393777	7,008491058	100	93,38	55,39
Vejlemg3	29180892	8,745954016	100	94,05	54,72
Vejlemg4	28946747	8,674894994	100	94,44	54,46
Vejlemg5	26681671	7,997727472	100	94,35	53,52
Vejlemg6	22636369	6,785153765	100	94,33	53,55
Vejlemg7	21870940	6,555224707	100	94,83	51,19
Vejlemg8	22158983	6,641665532	100	94,54	53,65
Vejlemg9	23849941	7,148843457	100	94,05	54,46
Vejlemg10	28558956	8,560087442	100	94,13	54,55
Vejlemg11	23678435	7,097179152	100	94,66	53,12
Vejlemg12	38617208	11,57452438	100	94,24	54,38
Vejlemg13	24115415	7,228564323	100	94,31	53,59
Vejlemg14	22716253	6,809193432	100	94,25	54,05
Vejlemg15	27928705	8,371147633	100	94,67	53,08
Vejlemg16	24046659	7,207355545	100	93,56	53,67
Vejlemg17	24609205	7,376088902	100	94,36	53,06
Vejlemg18	24877417	7,45672646	100	94,35	53,36
Vejlemg19	22996199	6,89198172	100	94,06	53,46
Vejlemg20	33545316	10,05158125	100	92,29	60,03
Vejlemg21	27456195	8,227805445	100	92,6	59,27
Vejlemg22	22604588	6,776484011	100	95,06	48,51

Supplerende tabel S3. Liste over indikatortaxa, der er anvendt til klassificering af spildevandsrelateret påvirkning i sedimenter i Vejle Fjord og Vejle Å. Taxa er inddelt i fire kategorier, der repræsenterer (i) indikatorer for rensningsanlægsprocesser, (ii) generelle recipientindikatorer, (iii) humane patogener og (iv) antibiotikaresistensgen (ARG)-associerede taxa.

kategori	taxon	kategori	taxon
WWTP_proces	candidatus accumulibacter	Patogen	aeromonas
WWTP_proces	tetrasphaera	Patogen	klebsiella
WWTP_proces	dechloromonas	Patogen	pseudomonas aeruginosa
WWTP_proces	defluviicoccus	Patogen	stenotrophomonas maltophilia

WWTP_proces	candidatus competibacter	Patogen	legionella pneumophila
WWTP_proces	nitrosomonas	Patogen	mycobacterium avium
WWTP_proces	nitrospira	Patogen	yersinia enterocolitica
WWTP_proces	parcubacteria	Patogen	salmonella enterica
WWTP_proces	saprospiraceae	Patogen	shigella
WWTP_proces	thauera	Patogen	vibrio cholerae
WWTP_proces	zoogloea	Patogen	vibrio vulnificus
WWTP_proces	paracoccus	Patogen	vibrio parahaemolyticus
WWTP_proces	rhodocyclus	Patogen	listeria monocytogenes
WWTP_proces	propionivibrio	Patogen	streptococcus pneumoniae
WWTP_proces	hyphomicrobium	Patogen	streptococcus pyogenes
WWTP_proces	novosphingobium	Patogen	staphylococcus aureus
WWTP_proces	acidovorax	Patogen	helicobacter pylori
WWTP_proces	pseudoxanthomonas	Patogen	Chlamydia trachomatis
WWTP_proces	candidatus amarolinea	Patogen	neisseria meningitidis
WWTP_proces	candidatus microthrix	Patogen	Bordetella pertussis
WWTP_proces	candidatus vilivitalis	Patogen	clostridioides difficile
WWTP_proces	candidatus poribacteria	Patogen	burkholderia cepacia-kompleks
Recipient_indikator	arcobacter	ARG	acinetobacter baumannii
Modtager_indikator	acinetobacter	ARG	klebsiella pneumoniae
Modtager_indikator	bacteroides	ARG	escherichia coli st131
Modtager_indikator	prevotella	ARG	proteus mirabilis
Modtager_indikator	clostridium	ARG	providencia stuartii
Modtager_indikator	fusobacterium	ARG	Morganella morganii
Modtager_indikator	enterococcus	ARG	citrobacter freundii
Modtager_indikator	escherichia coli	ARG	bacteroides fragilis
Modtager_indikator	citrobacter	ARG	prevotella intermedia
Modtager_indikator	serratia	ARG	staphylococcus epidermidis
Modtager_indikator	moraxella	ARG	enterococcus faecalis
Modtager_indikator	kingella	ARG	enterococcus faecium
Modtager_indikator	campylobacter	ARG	corynebacterium striatum
Modtager_indikator	leptotrichia	ARG	serratia marcescens
Modtager_indikator	treponema	ARG	stenotrophomonas maltophilia
Modtager_indikator	veillonella	ARG	achromobacter xylosoxidans
Modtager_indikator	bifidobacterium	ARG	ralstonia pickettii
Modtager_indikator	lactobacillus		
Modtager_indikator	rikenellaceae		
Modtager_indikator	parabacteroides		

STOCKHOLM
Boks 21060, 100 31 Stockholm

GÖTEBORG
Box 53021, 400 14 Göteborg

MALMÖ
Nordenskiöldsgatan 24
211 19 Malmö

KRISTINEBERG
(Center for marin forskning og innovation)
Kristineberg 566
451 78 Fiskebäckskil

SKELLEFTEÅ
Kanalgatan 59
931 32 Skellefteå

BEJING, KINA
Værelse 612A
InterChina Commercial Building No.33
Dengshikou Dajie
Dongcheng District
Beijing 100006 Kina

© IVL SWEDISH ENVIRONMENTAL RESEARCH INSTITUTE LTD. | Telefon: 010 -788 65 00 | www.ivl.se

Denne rapport er blevet gennemgået og godkendt i overensstemmelse med IVL's revisions- og godkendelsesstyringssystem.