

Kemiska föroreningar i avloppsvatten – nya innovativa analys- metoder

Effektbaserade analysmetoder är ett nytt och kraftfullt sätt att detektera miljöfarliga kemikalier. Analyserna görs i odlade celler, som gjorts känsliga för specifika effekter, till exempel hormonstörande eller DNA-skadande effekter. Metoderna mäter den totala effekten av oönskade kemikalier i vatten – såväl kända som okända ämnen, omvandlingsprodukter och metaboliter samt cocktaileffekter. I detta White Paper beskrivs hur sådana metoder kan användas som komplement till kemiska analysmetoder.

Kemiska föroreningar i vattenmiljön...

Tiotusentals syntetiska kemikalier används i samhället idag. Vissa av dessa har skadliga effekter på miljön och människors hälsa eller omvandlas till ämnen med skadliga effekter. Kunskapen om vilka ämnen som har sådana hälso- och miljöfarliga egenskaper är dock mycket begränsad (SOER, 2020).

Alla de kemikalier som används i samhället riskerar att förorena avloppsvattnet. Det handlar till exempel om läkemedelsrester, hushållskemikalier, industrikemikalier, kosmetika och hygienprodukter. Då det renade avloppsvattnet i många fall släpps ut i vattensystem som också används för dricksvattenproduktion, kan det innebära en risk för människors hälsa ifall sådana hälsofarliga kemikalier inte avlägsnas från vattnet under avloppsreningsprocessen.

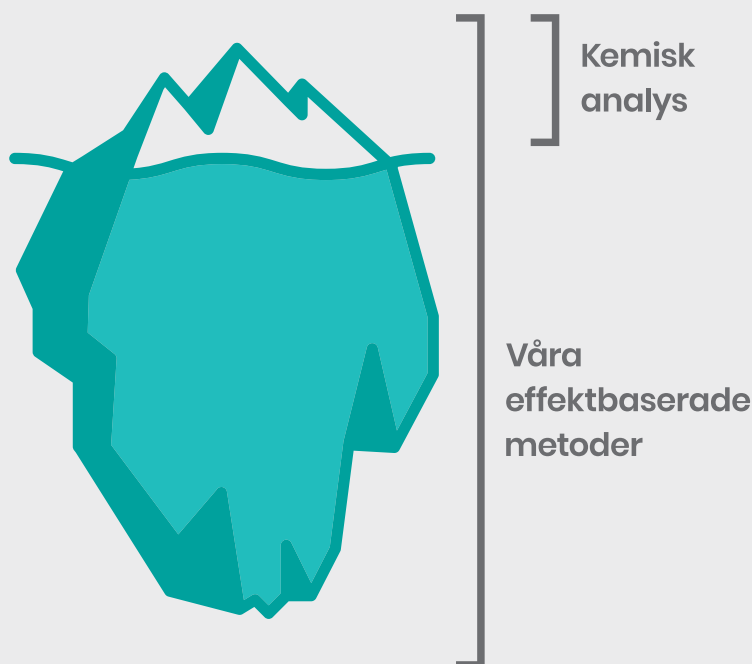
Historiskt har avloppsreningstekniker ofta fokuserat på att minska halterna av näringsämnen och patogena mikroorganismer i vattnet, men mindre uppmärksamhet har ägnats åt kemiska föroreningar. Under senare år har detta område, och särskilt frågan om läkemedelsrester, fått ökad uppmärksamhet.

För att undersöka hur mycket kemiska föroreningar som finns i orenat avloppsvatten, hur effektivt de avskiljs i ett reningsverk och hur mycket som släpps ut i miljön används idag kemisk analys, och halter av vissa utvalda ämnen mäts. Den stora begränsningen med den tekniken är att den kräver att man på förhand känner till den kemiska strukturen på det ämne man vill studera och att den inte ger någon information om okända ämnen eller den skadliga effekten av hela blandningen, den så kallade cocktaileffekten.

...men vad ska vi mäta?

Ett stort antal internationella forskarrapporter har visat att de välkända och oftast analyserade kemiska föroreningarna bara står för en bråkdel av de skadliga effekter som man kan uppmäta i vattenprover. Upp till 99% av de toxiska effekterna orsakas av okända kemiska ämnen eller cocktaileffekter som kan uppstå då flera kemiska ämnen verkar tillsammans.

För att få en helhetsbild av vilka miljö- och hälsofarliga kemikalier som finns i vårt avloppsvatten, och hur effektivt de avskiljs i avloppsreningsverket, behöver vi nya analysmetoder.



Effektbaserade metoder mäter hela isberget av skadliga effekter och inte bara isbergets topp. Upp till 99% av de skadliga effekterna av kemiska föroreningar i vattenprover har visat sig komma från okända ämnen eller cocktail-effekter, vilka riskerar att missas helt om man förlitar sig enbart på kemisk analys.

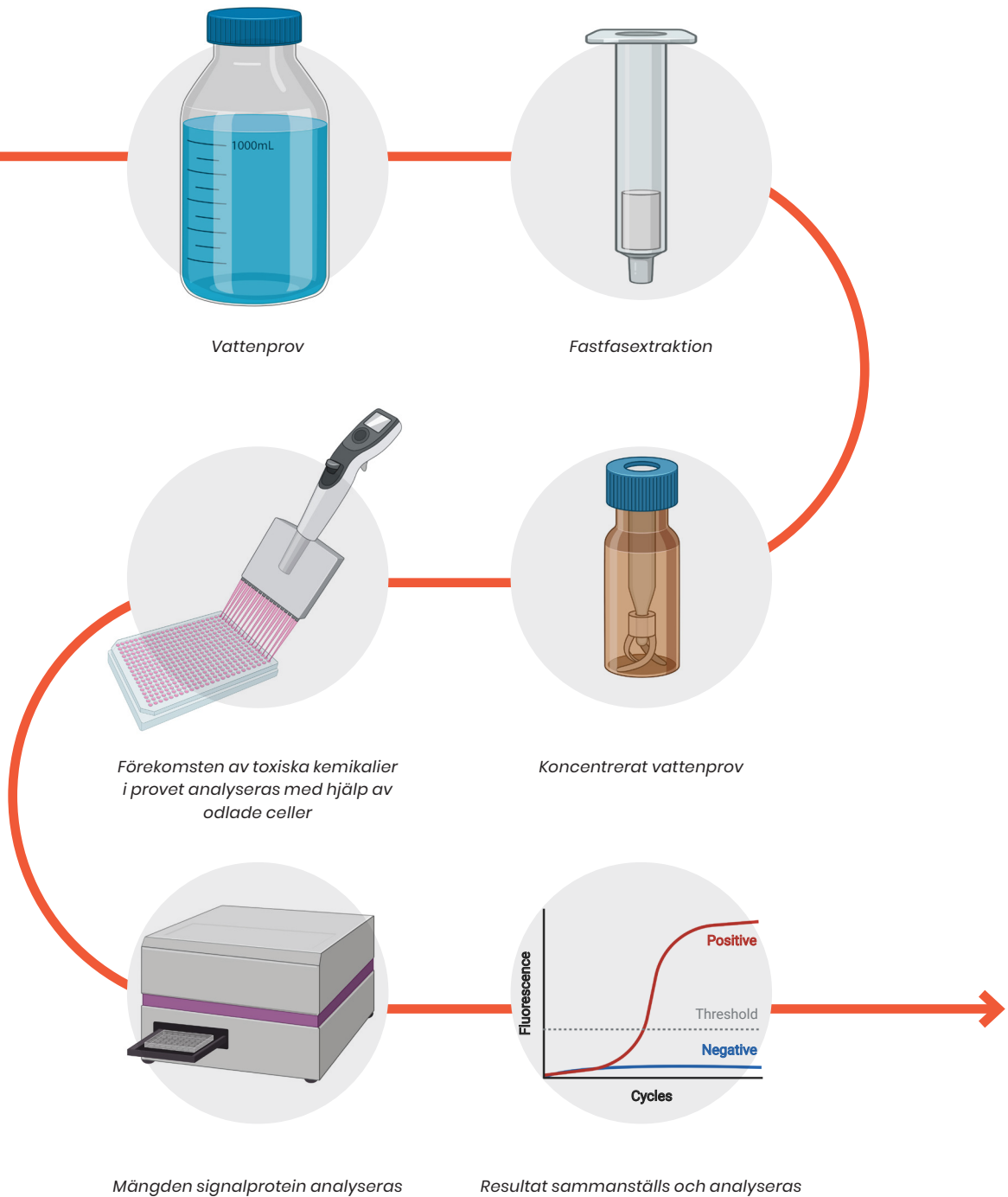
En ny strategi: effektbaserade metoder

Under senare år har det inom forskningen utvecklats en ny strategi för att mäta hälsofarliga egenskaper hos kemikalier i vattenmiljön. Denna strategi baseras på att man mäter de biologiska effekterna av alla hälsofarliga- och miljöfarliga kemikalier i ett vattenprov. Effekterna av hälso- och miljöfarliga kemikalier i proverna mäts med hjälp av laboratorieodlade celler, som modifierats för att kunna upptäcka specifika toxiska effekter, exempelvis hormonstörande effekter. När cellerna exponeras för ett prov som innehåller kemiska ämnen som orsakar de specifika effekter som studeras så utsöndrar cellerna ett signalprotein som är enkelt mätbart. Genom att exponera cellerna för t.ex. ett avloppsvattenprov och sedan mäta mängden utsöndrat signalprotein får man snabbt ett svar på om, och i vilken grad provet är förorenat med kemikalier som ger skadliga effekter.

Med dessa metoder kan man mäta effekterna av blandningen av föroreningar i dricksvatten, den så kallade cocktaileffekten. Detta är viktigt eftersom upp till 95–99 % av vattenföroreningarnas skadliga effekter kommer från okända ämnen som vi idag inte analyserar.

I revisionen av EU:s ramdirektiv för vatten (EU, 2013) ingick planer på att införa effektbaserade metoder för övervakning av vattenkvalitet för att förbättra underlaget för beslut om åtgärder (Brack et al., 2019). I juli 2020 beslutade Europakommissionen att avbryta revideringen av direktivet. Effektbaserade metoder kom därför inte in i lagstiftningen, men rekommenderas och används för en mer effektiv övervakning av ytvatten och bedömning av reningseffekt i avloppsverk (Völker et al., 2019; Dopp et al. 2021). Naturvårdsverket rekommenderar användning av effektbaserade metoder för mätning av östrogen aktivitet och mutagenicitet (DNA-skada) vid testning av anläggningar för läkemedelsrening i avloppsvatten. De effektbaserade metoderna för att mäta östrogen aktivitet i vatten har mycket hög känslighet, vilket är nödvändigt för att kunna detektera östrogener i de koncentrationer som kan orsaka skadliga effekter i miljö. De effektbaserade metoderna som BioCell Analytica erbjuder har en detektionsgräns omkring 0,01–0,05 ng östradiolekvivalenter/L. För kemisk analys är detektionsgränsen för östradiol drygt 100 gånger högre.

Så här går det till:



Vid effektbaserad analys koncentreras först vattenprovet med fastfasextraktion, i likhet med hur prover ofta koncentreras inför kemisk analys. Det koncentrerade vattenprovet analyseras sedan med hjälp av odlade celler, för att mäta förekomsten av kemikalier som kan orsaka olika typer av toxiska effekter.

ODLADE CELLER FÖR ATT UPPTÄCKA MILJÖ- OCH HÄLSOFARLIGA FÖRORENINGAR

Under senare år har det utvecklats en ny strategi för att mäta hälso- och miljöfarliga egenskaper hos kemikalier och miljöprover. Med de nya metoderna mäter man kemikaliernas skadliga effekter på biologiska processer i odlade celler istället för att mäta deras toxiska egenskaper i djurförsök.

Cellerna är modifierade för att påvisa specifika toxiska effekter, till exempel på hormonreceptorer (östrogena och androgena) med hjälp av så kallade reporter-gen-tester. När cellerna exponeras för ett prov med kemiska ämnen som orsakar de specifika effekterna, så aktiveras en reporter-gen och cellerna utsöndrar ett signalprotein. Ju mer provet innehåller av ämnen som ger effekten, desto högre blir signalen. DNA-skadande effekter kan mätas i celler genom att detektera bildade mikrokärnor. Cellernas överlevnad studeras som ett allmänt mått på toxicitet. Vid testerna används referenssubstanter för att översätta de uppmätta effekterna till halt av referenssubstanten, vilket möjliggör en direkt jämförelse med andra prov.

Den stora fördelen med dessa metoder är att de mäter effekterna av alla hälso- och miljöfarliga kemikalier i ett prov, istället för att mäta halten av ett fåtal kemikalier. Detta är viktigt eftersom upp till 99% av de toxiska effekterna av kemikalier i miljön orsakas av okända kemikalier eller cocktaileffekter.

Det finns nu en rad effektbaserade metoder tillgängliga för att övervaka vattenkvaliteten, t.ex. för att mäta hormonstörande, inflammatoriska och stressrelaterade effekter samt om vattnet innehåller ämnen som kan orsaka DNA-skador, vilket i förlängningen riskerar orsaka cancer eller påverka fortplantningsförmågan.



VILKA TYPER AV EFFEKTER KAN MÄTAS OCH VILKA ÄMNEN KAN ORSAKA OLIKA EFFEKTER?

Effekter på könshormon-receptorer. Ämnen kan aktivera eller blockera östrogen- och androgenreceptorn. Östrogener och androgener har många viktiga fysiologiska funktioner förutom för reproduktionen också för hjärt-kärl-, immun-, muskulära- och nervsystemet. Exempel på kemiska föroreningar i vatten som påverkar könshormonreceptorer är naturliga könshormoner, p-piller, läkemedel som används vid bröst- och prostatacancer, liksom växtbaserade isoflavoner (så kallade fitoöstrogener) och vissa plastkemikalier.

AhR-aktivitet (arylhydrokarbon-receptorn). Vid aktivering av Ah-receptorn induceras metaboliserande enzym och effekten av AhR-aktivering kallas ofta metabolisk aktivering. Ah-receptorn har många fysiologiska funktioner, såsom vid utveckling av olika organ-system och vid reglering av inflammatoriska reaktioner. Många toxiska ämnen aktiverar Ah-receptorn, till exempel halogenerade organiska miljöföroreningar, polycykliska aromatiska kolväten (PAH:er), vissa pesticider och läkemedel, och naturligt förekommande ämnen som indoler och stilbener.

Oxidativ stress. Oxidativ stress beror på att reaktiva syreradikaler bildats i överskott. Det är en vanlig mekanism bakom olika typer av toxiska effekter, t ex inflammatoriska effekter och cancer. Många toxiska ämnen, t.ex. organiska miljögifter, pesticider, naturliga ämnen, kan orsaka oxidativ stress. Oxidativ stress induceras även av desinfektionsbiprodukter, som kan bildas vid vattenrening. Närmare 700 sådana desinfektionsprodukter har identifierats.

Genotoxisk aktivitet. Genotoxicitet eller DNA-skadande effekt är en allvarlig effekt, som kräver omfattande testning och utredning vid registrering av till exempel bekämpningsmedel, livsmedelstillsatser och aromämnen. DNA-skada i kroppsceller kan leda till cancer och andra sjukdomar och till reproduktionsstörningar om det drabbar könsceller.

”ALTHOUGH MORE THAN 500 CHEMICALS WERE ANALYZED, THE DETECTED CHEMICALS EXPLAINED TYPICALLY LESS THAN 10% OF THE MEASURED BIOLOGICAL EFFECT...”

– Neale et al, Water Res X, 2020

Tre exempel på effektbaserade studier av avloppsvatten – jämförelse med kemisk analys

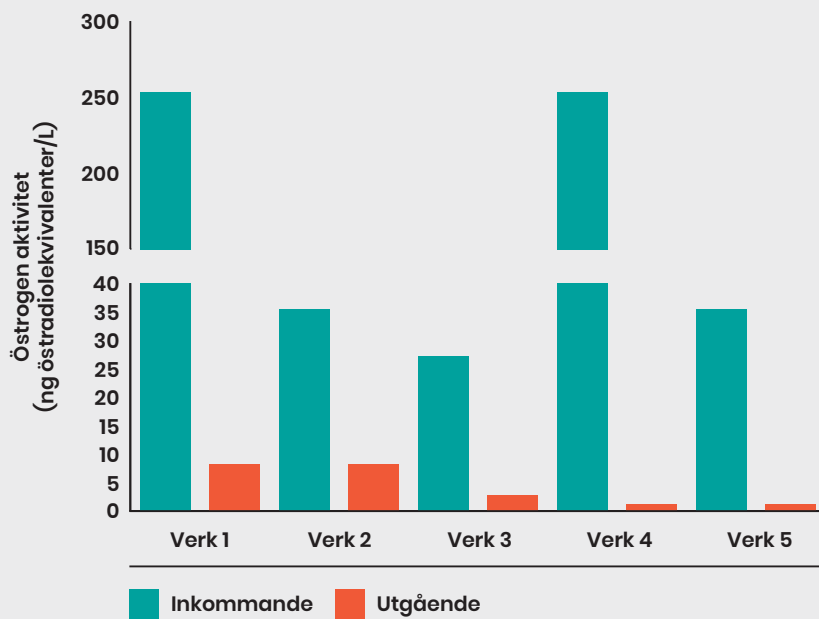
1. I en forskningsstudie av Neale och medarbetare (Neale et al., 2017) användes effektbaserade metoder för att analysera toxiciteten i vattenprover från vattendrag där renat avloppsvatten släpps ut. Parallellt så analyserades halterna av 400 kända miljögifter. När forskarna jämförde den totala toxiciteten i proverna med den toxicitet som man kunde förvänta sig av de detekterade ämnena, visade det sig att enbart 0,2-1,6% av de observerade toxiska effekterna kunde förklaras av dessa 400 ämnen. I storleksordningen 99% av toxiciteten orsakades alltså av okända kemikalier eller cocktaileffekter.

2. I en liknande studie av König och medarbetare (König et al., 2017) jämfördes toxiciteten i prover från ett vattendrag samtidigt som halterna av 276 kända miljöföroreningar bestämdes med kemisk analys. Även här såg man att en mycket liten andel av viktiga toxiska effekter som observerades i vattenproverna kunde förklaras av de detekterade föroreningarna. Exempelvis för oxidativ stress, kunde bara enstaka procent av den observerade toxiciteten förklaras av de analyserade 276 föroreningarna. I en annan

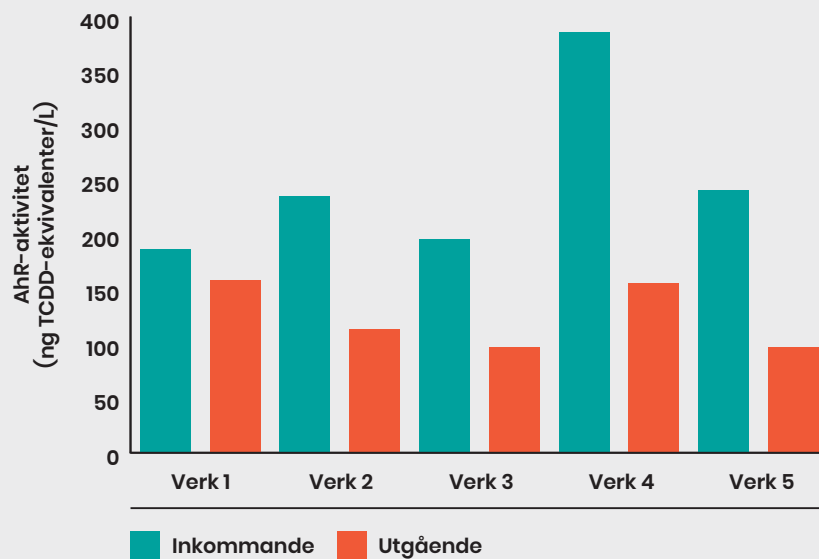
studie har Escher och medförfattare (Escher et al., 2013) visat att enbart 0,1% av den observerade toxiciteten i form av oxidativ stress kunde förklaras av de 269 kemikalier som haltbestämdes i den studien.

3. Neale och medarbetare (Neale et al., 2020) använde effektbaserade metoder för att undersöka reningseffektiviteten i tio australiensiska avloppsreningsverk och analyserade samtidigt halterna av mer än femhundra kända miljöföroreningar, inklusive läkemedelsrester. Det var stora skillnader i reningseffektivitet mellan olika reningstekniker och ozonering var en av de reningstekniker som hade högst effektivitet i denna studie. Författarna rapporterade också att de mer än femhundra kemikalier som analyserades med kemisk analys enbart kunde förklara enstaka procent av den observerade toxiciteten för de flesta typer av biologiska effekter.

Dessa studier visar sammantaget att det inte räcker med att analysera halterna av enskilda ämnen, om än hundratals sådana, för att få en helhetsbild av de hälso- och miljöfarliga kemiska föroreningarna i ett prov.

**FIGUR 1.**

Östrogena effekter i avloppsvatten från fem svenska avloppsreningsverk (resultat från Lundqvist et al 2019)

**FIGUR 2.**

Effekter av kemikalier som kan aktivera Ah-receptorn, i avloppsvatten från fem svenska avloppsreningsverk (resultat från Lundqvist et al 2019)

I en svensk studie (Lundqvist et al., 2019) användes en panel av effektbaserade metoder för att undersöka hur effektivt bioaktiva kemiska föroreningar i avloppsvatten renades bort i fem avloppsreningsverk. Studien visade att reningseffektiviteten i dessa fem verk var hög för vissa av de toxiska parametrarna, t.ex. östrogena effekter (Figur 1) medan andra typer av effekter avskiljdes i lägre utsträckning, t.ex. AhR-aktivitet (Figur 2).

En annan svensk studie på renat avloppsvatten, med utlopp i Göta älv, visade hög aktivitet av östrogen, antiandrogen aktivitet, liksom på AhR (se faktaruta), som ger utslag för ett stort antal syntetiska och naturliga kemiska ämnen (Oskarsson et al., 2021).

Stora investeringsbehov – ny teknik och läkemedelsrester

VA-branschen och avloppsreningsverken står inför stora investeringsbehov som t.ex. ny- och utbyggnad av reningsverk, investeringar i rörnätet och införandet av nya reningstekniker för att avlägsna kemiska föroreningar. Stora satsningar görs för att minska förekomsten av miljöskadliga läkemedel i vatten (Svenskt Vatten, 2020). Nya tekniker och material måste testas så att de klarar av att avskilja skadliga kemikalier från vattnet och inte heller introducerar några nya föroreningar. Detta för att undvika kostsamma felinvesteringar. Idag baseras sådana utvärderingar framför allt på kemiska analyser av ett begränsat antal ämnen. Detta är ett problem eftersom det finns stora kunskapsbrister om vilka enskilda kemikalier som är hälsofarliga. Med effektbaserade metoder som komplement kan man få en samlad bild av hur effektivt en ny beredningsteknik avlägsnar såväl kända som tidigare okända hälsofarliga ämnen ur vattnet. Det finns flera exempel från forskningen där man visat hur effektbaserade metoder kan användas för att utvärdera nya vattenreningstekniker.

Dopp och medarbetare (Dopp et al., 2021) har rapporterat från ett omfattande tyskt projekt, där effektbaserade metoder använts för att utvärdera olika reningsmetoder för organiska miljöföroreningar, inklusive läkemedel i avloppsvatten. Ospecifik toxicitet, östrogena och genotoxiska effekter uppmättes både före och efter rening. Som regel minskade effekterna efter ozonbehandling, men resultaten varierade med råvattnets sammansättning. Man konstaterade också att den effektbaserade metoden för att mäta östrogen aktivitet i celler är betydligt känsligare än kemiska metoder.

En genomgång av publicerade studier som använt effektbaserade metoder för att utvärdera avloppsrening (Völker et al., 2019) visar bland annat att:

- både ozon och aktivt kol effektivt minskar ospecifika och många specifika toxiska effekter
- ozonbehandling kan ge upphov till toxiska omvandlingsprodukter, som vanligen minskar vid efterbehandling
- östrogena effekter visserligen minskar efter ozon eller aktivt kol, men att återstående halter ändå är på nivåer som kan ge miljöeffekter
- det är brist på data om blockerande effekter på hormonreceptorer, trots att många läkemedel verkar enligt en sådan mekanism
- Slutsatserna är att ett väl sammansatt batteri av effektbaserade metoder behövs för att utvärdera reningseffektivitet och som underlag för beslut om införande av nya metoder efter pilotprojekt.

Sammanfattning

Effektbaserade metoder, där odlade celler används för att upptäcka toxiska föroreningar i avloppsvatten, visar den totala effekten av såväl kända som okända ämnen, omvandlingsprodukter, metaboliter och cocktaileffekter. Metoderna har en hög känslighet och är ett utmärkt komplement till kemisk analys för att undersöka förekomsten av toxiska föroreningar i vatten och för att utvärdera nya reningstekniker, exempelvis för läkemedelsrening.

Kontakta oss gärna för att diskutera hur metoderna kan användas i er verksamhet.

EXEMPEL PÅ HUR EFFEKTBASERADE METODER KAN ANVÄNDAS

- Analysera inkommande avloppsvatten
- Analysera renat avloppsvatten
- Utvärdera reningseffektivitet för miljö- och hälsofarliga kemikalier av olika reningsmetoder
- Utvärdera hur effektivt nya avloppsreningstekniker avlägsnar toxiska kemikalier
- Följa förändringar över tid

Författare

Detta White Paper har skrivits av Johan Lundqvist och Agneta Oskarsson. Agneta Oskarsson är professor em i livsmedelstoxikologi vid Sveriges lantbruksuniversitet och Johan Lundqvist är docent i molekylär toxikologi vid samma universitet. De har lång erfarenhet av att utveckla och använda biologiska testmetoder för att upptäcka kemiska föroreningar i vatten. Tillsammans har de startat BioCell Analytica.

AGNETA
OSKARSSON

JOHAN
LUNDQVIST



Lästips

- Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment, bok av Beate Escher m.fl., IWA Publishing. Finns tillgänglig online: <https://iwaponline.com/ebooks/book/832/Bioanalytical-Tools-in-Water-Quality-Assessment>
- Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment, artikel av Beate Escher m.fl. i tidskriften Science: <https://www.science.org/lookup/doi/10.1126/science.aay6636>

Referenser

- Brack, W., Ait Aissa, S., Backhaus, T., et al., 2019. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environ. Sci. Eur.*, 31:10. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0192-2>
- Dopp, E., Pannekens, H., Gottschlich, A., Schertzinger, G., et al., 2021. Effect-based evaluation of ozone treatment for removal of micropollutants and their transformation products in waste water. *J. Toxicol., Environ. Health, Part A*, 84, 418-439. <https://doi.org/10.1080/15287394.2021.1881854>
- Escher, B.I., van Daele, C., Dutt, M., Tang, J.Y.M., et al., 2013. Most oxidative stress response in water samples comes from unknown chemicals: the need for effect-based water quality trigger values. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 7002-7011.
- EU, 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.
- König, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., et al., 2017. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. *Environ. Pollut.*, 220, 1220-1230. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.011>
- Lundqvist, J., Mandava, G., Lungu-Mitea, S., Lai, F.Y., et al., 2019. In vitro bioanalytical evaluation of removal efficiency for bioactive chemicals in Swedish wastewater treatment plants. *Sci. Rep.*, 9:7166. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43671-z>
- Neale, P. A., Munz, N.A., Ait-Aissa, S., Altenburger, R., et al., 2017. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Sci. Tot. Environ.*, 576, 785-795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.141>
- Neale, P.A., O'Brien, J.W., Glauch, L., König, M., et al., 2020. Wastewater treatment efficacy evaluated with in vitro bioassays. *Water Research X*, 9, 100072. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100072>
- Oskarsson, A., Rosenmai, A.K., Mandava, G., Johannisson, A., et al., 2021. Assessment of source and treated water quality in seven drinking water treatment plants by in vitro bioassays – Oxidative stress and antiandrogen effects after artificial infiltration. *Sci. Tot. Environ.*, 758, 144001. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144001>
- SOER, 2020, The European environment – state and outlook 2020. Knowledge for transition to a sustainable Europe. Chapter 10. Chemical Pollution, sid 230-251, European Environment Agency, 2019.
- Svenskt Vatten, 2020. ReningsVÄRK. Läkemedelsrester i vår gemensamma vattenmiljö. M149. Meddelande, November 2020.
- Völker, J., Stapf, M., Miehe, U. and Wagner, M., 2019. Systematic review of toxicity removal by advanced wastewater treatment technologies via ozonation and activated carbon. *Environ. Sci. Technol.*, 53, 7215-7233. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00570>



BioCell
ANALYTICA

biocellanalytica.se

kontakt@biocellanalytica.se