

Kemiska föroreningar i sjöar och vattendrag – miljöövervakning med effektbaserade metoder i celler

Kemiska föroreningar i miljön är ett alltmer uppmärksammat problem. Förekomsten i sjöar och vattendrag övervakas idag främst med kemiska analyser av utvalda ämnen, vilket tyvärr bara ger en mycket liten bild av den totala mängden skadliga ämnen. Effektbaserade analyser, som utförs i odlade celler, är ett nytt och kraftfullt sätt att detektera farliga kemikalier i vatten. Metoderna mäter totala effekter av oönskade kemikalier i vatten – såväl kända som okända ämnen och cocktaileffekter. Nyligen kom förslag på nya vattendirektiv från EU, med krav på effektbaserade metoder för analys av östrogena ämnen och för övervakning av blandningseffekter av kemiska ämnen i ytvatten. I detta White Paper beskrivs effektbaserade cell-tester och hur de kan användas som komplement till kemiska analysmetoder i ytvatten för att detektera organiska föroreningar i vatten.

Kemiska föroreningar i sjöar och vattendrag – hur sker övervakningen idag?

Organiska föroreningar i miljön är ett ökande problem med negativa konsekvenser för akvatiska organismer och för människors hälsa, då ytvatten används som källa för dricksvatten.

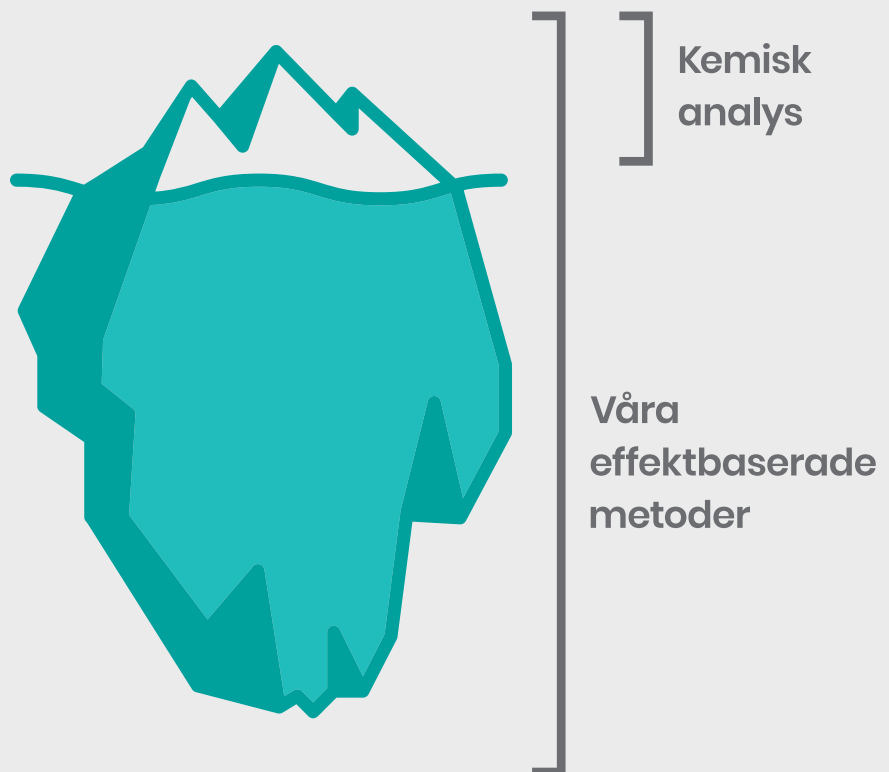
Källor till föroreningar kan vara utsläpp från avloppsverk och industrier, urlakning från deponier, förorenad mark och deposition från luften. Miljö- och hälsofarliga kemiska ämnen i vatten kan vara syntetiska, till exempel läkemedel, industri- och hushållskemikalier, bekämpningsmedel, eller naturliga ämnen, till exempel hormoner och algtoxiner.

För att undersöka hur mycket organiska föroreningar som finns i vattnet används idag kemisk analys av vissa utvalda ämnen, vanligen de ämnen som har miljö kvalitetsnormer eller bedömningsgrunder enligt Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om klassificering och miljö kvalitetsnormer avseende ytvatten (HVMFS 2019:25). Gränsvärden för kemisk ytvattenstatus finns idag för 45 ämnen eller ämnesgrupper som har miljö kvalitetsnormer enligt det så kallade prio-ämnesdirektivet (EU 2013/39). Ytterligare 32 särskilt förorenande ämnen eller ämnesgrupper har fastställda bedömningsgrunder, varav 25 är organiska ämnen eller ämnesgrupper.

Kemisk analys visar koncentrationen av de detekterbara analyserade ämnena. De stora begränsningarna med kemisk analys av vattenprover är att man på förhand måste bestämma vilka ämnen man vill analysera och att det inte ger information om skadliga effekter.

För att få en helhetsbild av de miljöfarliga kemikalerna i ytvatten behövs effektbaserade metoder som komplement till de kemiska analyserna. Man kan göra liknelsen att riktad kemisk analys mäter toppen av ett isberg, medan effektbaserade metoder mäter hela isberget av effekter från alla kemiska föroreningar i blandningen, inklusive cocktaileffekter (Figur 1). Ett stort antal studier har nämligen visat att de välkända och oftast analyserade kemiska föroreningarna bara står för en bråkdel av de skadliga effekter som man kan uppmäta i vattenprover (Escher et al., 2013; Tang et al., 2014; Neale et al., 2017a; Neale et al., 2017b; Touseva et al., 2017). Upp till 99% av toxiska effekter orsakas av okända kemiska ämnen eller cocktail-effekter. Undantaget är östrogena effekter, där en stor del kan förklaras av naturliga östrogena ämnen. Ett problem är dock att detektionsgränserna vid kemisk analys av naturliga östrogener inte är tillräckligt låga för att mäta halter som har tydliga östrogena effekter.

Figur 1: 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 cocktaileffekter, vilka riskerar att missas helt om man förlitar sig enbart på kemisk analys.



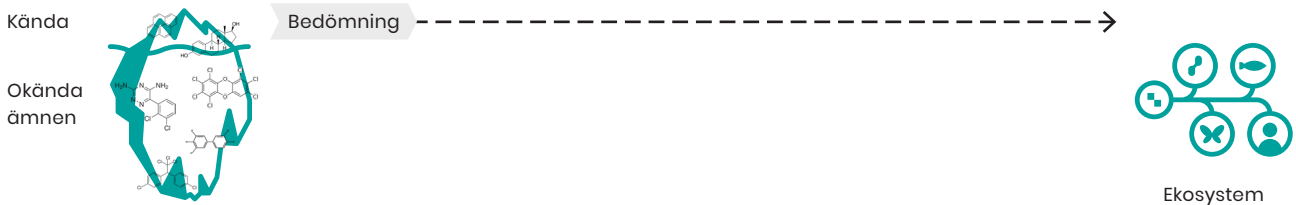
Hur kan miljöövervakningen av ytvatten förbättras?

För att fånga upp de skadliga effekterna av den totala blandningen av miljögifter krävs effektbaserade metoder. Effekterna kan mätas i hela organismer eller på vävnader från organismer ute i miljön eller i laboriemiljö (Carvalho et al., 2019; Schuijt et al., 2021). Detta görs i miljöövervakning på några enskilda arter, t ex någon fiskart, kräftdjur eller musslor och ger viktig information om tillståndet i de studerade arterna (Figur 2C). Nackdelen är att metoderna är resurskrävande djurstudier och ger begränsad information om effekter i andra arter än de studerade. Ett alltmer använt, mer etiskt, allmängiltigt och kostnadseffektivt alternativ är att mäta de toxiska egenskaperna i vattnet, som alla de vattenlevande organismerna lever i, istället för i enskilda organismer. Detta kan göras genom att exponera odlade djurceller för vattenprover och mäta överlevnaden av celler och relevanta toxiska effekter, som är konserverade mellan olika arter, till

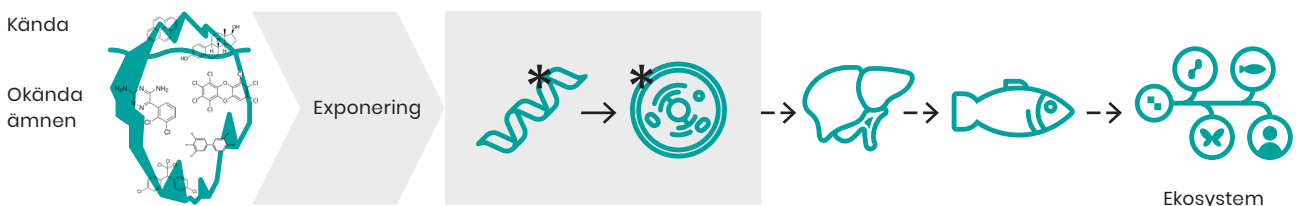
exempel hormonstörande och DNA-skadande effekter, och som orsakas av den totala blandningen av kemiska ämnen i vattenprovet.

Cellbaserade metoder, ibland omnämnda som in vitro-metoder eller bioanalytiska metoder, har visats vara ett kraftfullt och resurseffektivt komplement till den kemiska och ekotoxikologiska övervakningen som görs idag (Figur 2B). Finlayson et al. (2022a; 2022b) har utvärderat den ekologiska relevansen av effektbaserade in vitro-tester. De noterade en hög korrelation mellan in vitro- och in vivo-data för mortalitet och reproduktion, inklusive effekter på könshormonreceptorer, medan effekter på tillväxt och utveckling inte kan mätas lika väl i in vitro-tester (Finlayson et al. 2022a). Samma författare har också publicerat en översiktsartikel om in vitro-metoder för mätning av andra hormonstörande effekter än de östrogena och androgena, påverkan på metabolism, cancer, oxidativ stress, inflammation, immunotoxicitet och neurotoxicitet (Finlayson et al. 2022b).

A. Kemisk analys Bedömning baserad på exponering-aktivitets-modeller



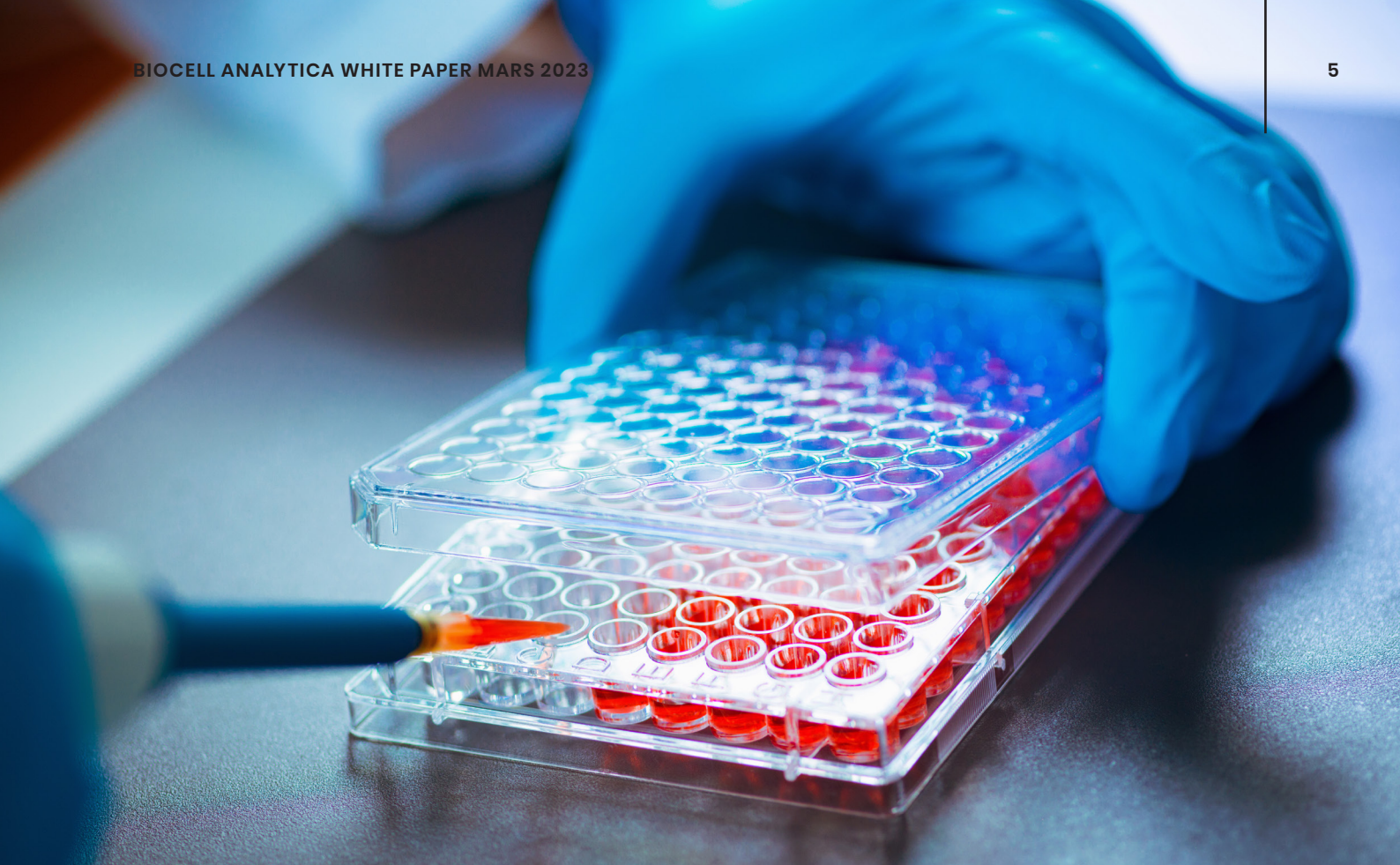
B. Effektbaserad testning i celler Toxiska effekter på celler som kan leda till skada i olika organismer



C. Ekotoxikologisk testning in vivo Toxisk effekt i en art



Figur 2. Teststrategier för miljöövervakning. A visar kemisk analys av utvalda ämnen och bedömning av effekter med hjälp av modeller. B visar effektbaserade metoder in vitro, där interaktion mellan kemiska ämnen och makromolekyler initierar toxiska effekter i celler, effekter som i slutändan kan leda till toxiska effekter i hela organismer, enligt principen för Adverse Outcome Pathway (AOP). C visar ekotoxikologisk testning in vivo, som i regel görs i en art. *Indikerar var skadan mäts. Helldragen linje indikerar uppmätt effekt och streckad linje uppskattad/förväntad effekt.



Effektbaserad testning av toxicitet i celler

Denna nya strategi att använda odlade celler för att studera toxiska egenskaper hos kemikalier har utvecklats starkt under senare år, dels för att minska användningen av djurförsök i toxikologisk testning, och dels för att få kunskap om toxiska mekanismer. Cellbaserade tester har sedan lång tid använts i toxicitetstestning för att mäta mutagenicitet (Ames test i bakterier) och genotoxicitet (i celler från däggdjur eller fisk) och har först på senare tid utvecklats för att mäta ett brett spektrum av andra oönskade biologiska effekter av kemiska ämnen. Metoderna fångar upp basala och mer specifika toxiska effekter på molekylär och cellulär nivå – effekter som ingår i den kedja av processer, som i slutändan leder till oönskade effekter i hela organismen eller i hela populationer (Figur 2B).

Denna kedja av kritiska steg på olika biologiska nivåer, kallad Adverse Outcome Pathway (AOP), togs först fram av den amerikanska miljömyndigheten EPA (Environmental Protection Agency) som en strategi att användas vid faroanalys och riskbedömning inom ekotoxikologi (EPA fact sheets). Strategin används nu allmänt för faroanalys av kemiska ämnen. Metodiken har fått en allt större användning vid testning av blandningar av kemiska ämnen, till exempel i vattenprover (Escher et al., 2014; Neale et al. 2019; Escher et al., 2021). Ett koncentrerat vattenprov tillsätts det medium som cellerna växer i och specifika biologiska effekter

i cellerna registreras liksom effekter på cellöverlevnad. För komplexa blandningar där flertalet ingående ämnen är okända, är de effektbaserade metoderna ett kostnadseffektivt och relevant sätt att bedöma den potentiellt skadliga miljöeffekten.

Effektbaserade metoder är väl etablerade i internationella studier för kartläggning och bedömning av vattenkvalitet i ytvatten, avloppsvatten och dricksvatten. Flest studier har gjorts på avloppsvatten, där kemiska föroreningar finns i högst halter, toxiska effekter är frekvent förekommande och det är viktigt att utvärdera reningseffektiviteten. Vi har tidigare beskrivit hur dessa metoder används för att analysera kemiska föroreningar i avloppsvatten (White Paper BioCell Analytica, oktober 2021) och i dricksvatten (White Paper BioCell Analytica, mars 2022).

EU föreslår krav på effektbaserad metodik i vattendirektivet

Införande av effektbaserade metoder i miljöövervakning av kemiska föroreningar har efterfrågats sedan länge för att få en mer heltäckande bild av skadliga effekter av ämnen i ett vattenprov (Brack et al., 2019). Inför revideringen av EU:s ramdirektiv för vatten tillsattes en arbetsgrupp för att utreda möjlig implementering av effektbaserade metoder för kartläggning och bedömning av risker från kemikalier i miljön (CIS, 2021). Rapporten ger klara rekommendationer för användning av effekt-

baserade metoder, dels för bedömning av kemisk och ekologisk status och dels som underlag för att prioritera vilka sjöar och vattendrag som behöver ytterligare kartläggning.

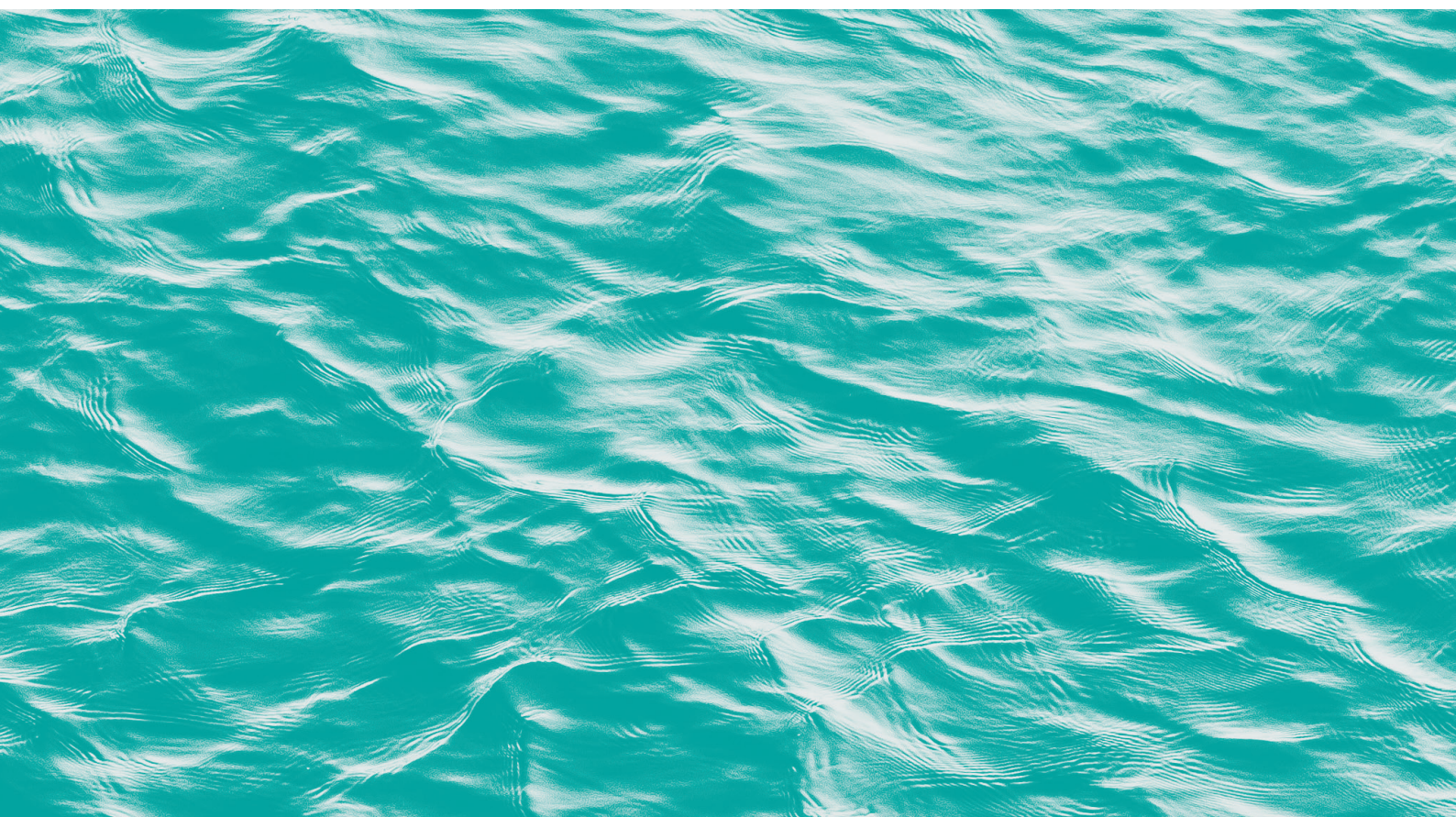
EU-kommissionen presenterade i oktober 2022 ett förslag till direktiv om ändring av ramdirektivet för vatten, prioämnesdirektivet och grundvattendirektivet (COM₂, 2022). I förslaget ingår obligatorisk övervakning av östrogena effekter i ytvatten med effektbaserade metoder, liksom framtagande av riktlinjer för effektbaserad metodik vid övervakning av blandningar av föroreningar. Man föreslår också att listan över prioriterade ämnen utökas och att flera gränsvärden revideras. Miljödepartementet kommenterar förslaget till det nya ramdirektivet i Faktapromemoria 2022/23:FPM19 och säger bland annat: "Regeringen är positiv till effektbaserade metoder eftersom de förbättrar förutsättningarna för att mäta effekter på miljön eller människors hälsa och identifiera lämpliga åtgärder".

Effektbaserade celltester för övervakning av vattenkvalitet – hur går det till?

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 störande effekter på biologiska processer i odlade celler istället för att mäta deras toxiska effekter i djurförsök. Testerna utgår från OECD-guidelines.

Vid effektbaserad analys koncentreras först vattenprovet med fastfasextraktion, i likhet med

hur prover ofta koncentreras inför kemisk analys av organiska föroreningar (Figur 3). Effekterna av hälso- och miljöfarliga kemikalier i vattenproverna mäts med hjälp av laboratorieodlade däggdjurs- eller fiskceller, antingen i omodifierade celler (cellviabilitet och genotoxicitet) eller i celler som modifierats för att kunna upptäcka specifika toxiska effekter, exempelvis hormonstörande. 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 ett vattenprov 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. Genotoxisk aktivitet (DNA-skada) kan mätas i celler genom att detektera bildade mikrokärnor. Effekter på cellviabilitet studeras som ett allmänt mått på toxicitet och för att säkerställa att testerna på specifika effekter görs vid icke cytotoxiska koncentrationer av provet. Vid testerna används referenssubstanser för att uttrycka de uppmätta effekterna som biologiska ekvivalenter av referenssubstanten, vilket möjliggör en direkt jämförelse med andra prov (Figur 3). Resultatet visar den totala skadliga effekten av alla ingående ämnen, inklusive okända kemiska ämnen och cocktaileffekter. Detta är viktigt, eftersom det har visats att så mycket som 99% av vissa toxiska effekter kommer från okända ämnen eller från blandningar, som inte identifierats i de kemiska analyserna.



ODLADE CELLER FÖR ATT UPPTÄCKA MILJÖ- OCH HÄLSOFARLIGA FÖRORENINGAR

Vanligen används reporter-gen-tester. Cellerna är genetiskt modifierade med en reporter-gen (till exempel luciferas), som regleras av ett DNA-fragment, känsligt för just den biologiska aktivitet man vill mäta, till exempel aktivering av hormonreceptorer (östrogena och androgena). När cellerna exponeras för ett prov med kemiska ämnen som aktiverar receptorerna, så aktiveras reporter-genen och cellerna utsöndrar ett signalprotein (till exempel luciferin). Ju högre koncentration och toxisk potens av ämnen som aktiverar receptorerna som ett prov innehåller, desto högre blir signalen. Vid testerna används en spädningsserie av referenssubstanter (specifika för varje test) för att jämföra de uppmätta effekterna i provet med effekterna av ett känt ämne som har denna effekt. Med hjälp av resultaten kan aktiviteten i provet då uttryckas som en biologisk ekvivalent koncentration (BEQ) av referenssubstansen (ISO 23196, 2022). Om ett vattenprov har ett BEQ-värde om 10 pg/L betyder det alltså att den biologiska aktiviteten i provet motsvarar den aktivitet som 10 pg/L av referenssubstansen skulle orsaka. BEQ-värdet beräknas för att kunna jämföra aktiviteten mellan prover och mellan studier. (Figur 3)

DNA-skadande effekter kan mätas i celler genom att detektera bildade mikrokärnor. Med hjälp av flödescytometri kan ett stort antal mikrokärnor räknas, vilket ger en hög känslighet.

Cellernas överlevnad kan studeras som ett allmänt mått på toxicitet, orsakad av till exempel skador på cellmembran och andra cellstrukturer. Ett test för mätning av akut toxicitet i fiskceller har nyligen utarbetats och finns som en OECD guideline (OECD Test guideline No. 249 Fish cell line acute toxicity: The RTgill-W1 cell line assay, 2021) och en ISO-standard (ISO 21115, 2019). Jämförande in vivo-studier har visat att celltestet väl kan förutsäga akut toxicitet i fisk.

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

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

Akut toxicitet i fiskceller: I OECD-testet och ISO-standarden för akut toxicitet används gälceller från regnbåge. Tre olika parametrar mäts: metabolisk aktivitet, cellmembranintegritet, och integritet av lysosommembran. Effekten i celltestet har visat god överensstämmelse med letala effektkoncentrationer i fisk, med undantag för neurotoxiska ämnen som verkar via specifika jonkanaler eller receptorer i hjärnan. Positiv kontroll i testet är 3,4-dikloroanilin.

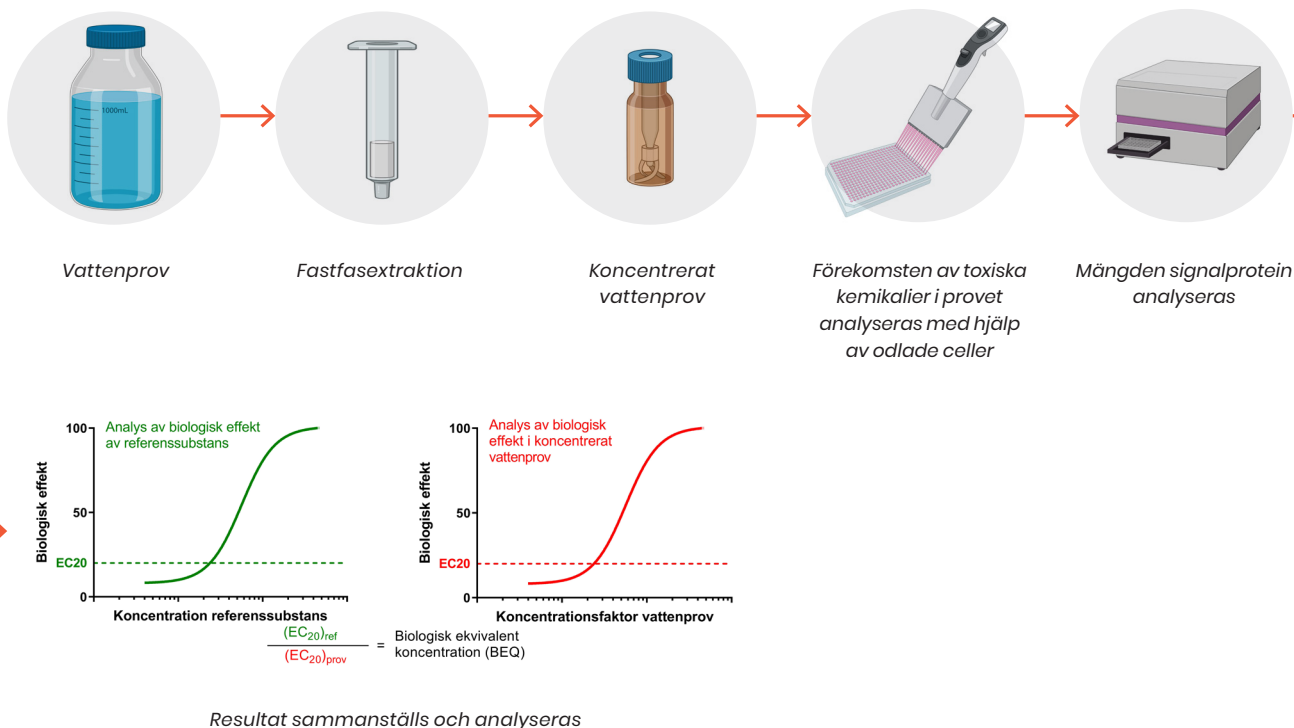
Effekter på könshormon-receptorer. Ämnen kan aktivera eller blockera östrogen- och androgenreceptorn. Östrogener och androgener påverkar reproduktion och könsutveckling. Ökad feminisering och intersex har setts i fisk efter exponering för östrogener. Exempel på kemiska föroreningar i vatten som påverkar könshormonreceptorer är naturliga könshormoner, p-piller, läkemedel som används vid bröst- och prostatacancer, liksom växtbaserade isoflavoner (så kallade fytoöstrogener) och vissa plastkemikalier.

AhR-aktivitet (arylhydrokarbon-receptorn). Vid aktivering av Ah-receptorn induceras metaboliserande CYP-enzym, vilket kan leda till aktivering av vissa ämnen till mer toxiska metaboliter eller till mer vattenlösliga metaboliter som utsöndras. Ah-receptorn har många andra fysiologiska funktioner, såsom vid utveckling av olika organsystem 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. AhR har kallats en "miljösensor".

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 reaktioner och cancer. Många toxiska ämnen, t.ex. organiska miljögifter, pesticider och naturliga ämnen, kan orsaka oxidativ stress. Oxidativ stress induceras även av desinfektionsbiprodukter, som kan bildas vid vattenrening. Nrf2 (nuclear transcription factor erythroid 2-related factor 2) är en markör för oxidativ stress, som vi mäter i våra metoder.

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 köns-celler. Bildande av mikrokärnor är en markör för genotoxicitet, som vi mäter i våra tester.

Så här går det till:



Figur 3. Vattenprovet koncentreras med fastfasextraktion och analyseras sedan med hjälp av odlade celler, för att mäta förekomsten av kemikalier som kan orsaka olika typer av toxiska effekter. Genom att samtidigt analysera spädningsserier av provet och en referenssubstans kan provets biologiska ekvivalenta koncentration (BEQ) beräknas. Skapad med Biorender.com

Resultat från effektbaserade studier av ytvatten

Kartläggning av vattenkvalitet med hjälp av effektbaserade metoder har ökat stort och metoden används nu alltmer för studier av framför allt råvatten för dricksvattenproduktion, avloppsvatten och ytvatten. Nedan presenteras resultat från våra studier i Sverige på ytvatten och recipienter från avloppsreningsverk. Dessutom ges några exempel på internationella studier där effektbaserade in vitro-metoder använts vid undersökning av kemisk vattenkvalitet i sjöar och vattendrag.

Svenska studier

Vi har använt effektbaserade metoder för att studera förekomsten av kemiska föroreningar i ytvatten, särskilt i vatten som används som råvatten i produktion av dricksvatten (Rosenmai et al., 2018; Lundqvist et al., 2019; Oskarsson et al., 2021; Yu et al., 2021) och i recipienter från avloppsreningsverk (Holm och Önnby, 2022).

Resultaten från våra studier i svenska ytvattenverk har visat flera biologiska effekter i det ytvatten som används som råvatten. Effekter på råvatten, inklusive tillrinningsområden, till Görvälns dricksvattenverk har undersökts med effektbaserade metoder vid flera tillfällen. AhR-aktiviteten, som ökade nedströms Kungsängens avloppsreningsverk i Uppsala jämfört med uppströms, låg sedan kvar på förhöjd nivå i Ekoln och Görväln, liksom i utgående vatten från dricksvattenverket (Rosenmai et al., 2018). Yu et al., (2021) visade aktiviteter av AhR, oxidativ stress, östrogena och genotoxiska effekter i inkommande ytvatten till Görvälnverket. Effekterna var starkt säsongsb beroende. I Göta älv uppmättes hög antiandrogen och AhR-aktivitet i utgående vatten från två avloppsverk, vilket kan ha orsakat den antiandrogena aktiviteten som fanns i dricksvattenverkens råvatten (Oskarsson et al., 2021).

SVENSK STUDIE PÅ RECIPIENTER FRÅN AVLOPPSRENINGSVERK

Nyligen har Sweco (Holm och Önnby, 2022) genomfört ett omfattande projekt där de har utvärderat effektbaserade metoder som ett verktyg för att bedöma reningseffektiviteten i sex stora till medelstora avloppsreningsverk och miljöriskerna i inlands- och kustrecipienter. Det är välkänt att en betydande del av de kända organiska föroreningarna inte tas bort vid konventionella avloppsreningsprocesser och därmed hamnar i recipienten (Golovko et al., 2021), och det finns även en oro för att okända miljöfarliga ämnen kan passera genom reningsverken och förorena miljö. Syftet med detta projekt var att undersöka hur effektbaserade mätningar i celler kan komplettera kemisk analys vid utvärdering av reningseffektivitet och ytvattenpåverkan från mikroföroreningar.

Resultaten visade att effektbaserade analyser var ett värdefullt och känsligt verktyg för att undersöka förekomsten av miljöfarliga ämnen i vatten. Flera parametrar ingick i utvärderingen, inklusive effekter på östrogena (ER) och androgena (AR) receptorer, oxidativ stress (Nrf2), AhR-aktivitet och genotoxicitet. Tydliga effekter påvisades i de flesta prover, men reningsprocessen minskade effekterna markant (vanligtvis >80%). Trots detta var exempelvis ER-aktiviteten i utgående vatten fortfarande hög från flera av de studerade reningsverken.

Naturliga östrogener är väldigt potenta och kan därmed orsaka biologiska effekter vid väldigt låga koncentrationer. Det är därför extra viktigt att använda analysmetoder med hög känslighet för sådana ämnen. Ett viktigt fynd i denna studie var att en stor del av de östrogena ämnena inte hade kunnat upptäckas med konventionella kemiska metoder eftersom detektionsgränsen är flera storleksordningar för hög. Endast 3 % av de östrogena effekterna kunde förklaras av de kemiska analyserna av östrogener. De östrogena effekterna överskred bedömningsgrunden (årsmedelvärde) för 17 β -östradiol för inlandsytvatten i tre av de studerade avloppsverken. Dessutom visade den effektbaserade analysen att östrogen-aktiviteten överskred bedömningsgrunden (årsmedelvärde) för god status för kustnära vatten i de två avloppsverk som hade kustvatten som recipient.

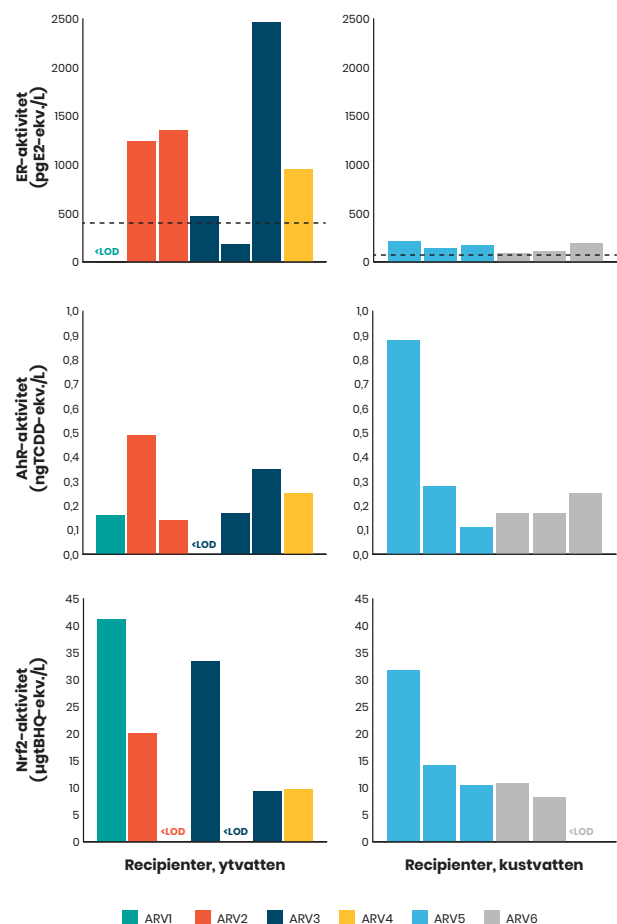
Sammantaget visar studien att effektbaserade metoder är ett viktigt komplement till kemisk analys vid utvärdering av reningseffektivitet och miljörisker vid avloppsreningsverk. Arbetsflödet och verktygen passar för de flesta typer av screening av miljögifter i miljöövervakning och uppströmsarbete för att identifiera sannolika utsläppskällor. Det är ett nytt och kraftfullt verktyg som ger utredare ett par extra glasögon.

Resultat från den ovan beskrivna studien på avloppsreningsverk (Holm och Önnby, 2022) har sammanfattningsvis visat (Figur 4 och 5):

Den östrogena aktiviteten, uttryckt som pg östradiolekvivalenter per liter vatten (pg E2eq/L) jämfördes med bedömningsgrunderna för 17 β -östradiol, som är 80 pg/L för kustnära vatten och 400 pg/L för inlandsytvatten (medelvärde på årsnivå) (HVMFS 2019:25). Resultaten visade överskridande av bedömningsgrunderna för 5 av 7 prover från inlandsvatten och för alla 6 proverna från kustvatten (figur 4). För östrogen aktivitet har även föreslagits ett ekotoxikologiskt effektbaserat "trigger value" (EBT) på 400 pg E2eq/L (Kunz et al, 2015, Simon et al, 2022).

- I studien gjordes också kemisk analys av proverna. Varken 17 β -östradiol eller etinylöstradiol (från p-piller) kunde detekteras i något av proverna (LOD=0.1 ng/L) medan östron och bisfenol A hade detekterbara halter. Den beräknade östrogena aktiviteten från de kemiska analyserna motsvarade som högst 3% av den detekterade aktiviteten från den effektbaserade analysen. Detta innebär alltså att mer än 97% av aktiviteten från östrogena ämnen skulle missas om man bara förlitade sig på kemisk analys.
- AhR-aktivitet detekterades i alla prov utom ett, dock relativt låga aktiviteter. Oxidativ stress (Nrf2-aktivitet) uppmättes i alla prover utom tre, med varierande aktivitet vid olika provtagnings-tillfällen (Figur 4).
- Inget tydligt mönster i föroreningsgrad sågs mellan parametrarna, dvs samma recipient kunde t ex ha låg aktivitet av ER, men hög AhR- och Nrf2-aktivitet, medan en annan recipient hade låg AhR, men hög Nrf2. Detta indikerar att det är olika typer av föroreningar som orsakar de olika effekterna och att föroreningarna inte följs åt. Därför är viktigt att mäta olika effekter för att få en mer komplett bild av förorenings-förekomsten.
- Olika provtagningsstillfällena visade i de flesta fall helt olika effekter och grad av effekter, vilket visar att det är viktigt att göra upprepade provtagning för att fånga dessa variationer.
- Inget av recipientproverna hade androgen aktivitet. Två prover hade antiandrogen aktivitet men på en låg nivå

I Swecos studie mättes också genotoxisk aktivitet med mikrokärntest. Figur 5 visar resultaten i form av positivt (rött) och negativt (grönt) resultat. Alla inkommande prover till avloppsreningsverket, och de flesta renade utgående från avloppsverket var genotoxiska, medan flertalet nedströms recipient-prover var icke-genotoxiska.



Figur 4. Resultat från effektbaserade mätningar av östrogena (ER), AhR-, och Nrf2 (oxidativ stress) aktiviteter i recipient från avloppsreningsverk (ARV), fyra recipienter var ytvatten (vänster) och två var kustvatten (höger), 1-3 provtagningsstillfällena per avloppsreningsverk. Den streckade linjen för ER-aktivitet visar bedömningsgrunderna för 17 β -östradiol för inlandsytvatten (400 pg/L) respektive kustnära vatten (80 pg/L). (Modifierad från Holm och Önnby, 2022).

	Inkommande ARV	Utgående ARV	Utgående våtmark	Uppströms recipient	Nedströms recipient
ARV1	Red	Red	Grey	Grey	Green
ARV2	Red	Green	Red	Grey	Green
ARV2	Red	Green	Red	Grey	Red
ARV3	Red	Red	Grey	Green	Green
ARV3	Red	Red	Grey	Red	Green
ARV4	Red	Red	Grey	Grey	Red
ARV5	Red	Red	Grey	Grey	Green
ARV5	Red	Red	Grey	Grey	Green
ARV5	Red	Red	Grey	Grey	Green
ARV6	Red	Red	Grey	Grey	Red
ARV6	Red	Red	Grey	Grey	Red
ARV6	Red	Red	Grey	Grey	Green

Figur 5. Analys av genotoxicitet, mätt med mikrokärntest, i prover från sex avloppsreningsverk (ARV): inkommande, utgående och recipient uppströms och nedströms. Rött visar positiva resultat (genotoxicitet), grönt negativa, och grått visar provpunkter som inte testats. Delade celler visar resultat från dubbelprover. (Modifierad från Holm och Önnby, 2022).

Internationella studier

Den vanligaste effekten som studeras i prover av ytvatten är östrogen aktivitet. Vissa studier av ytvatten inkluderar även tester för AhR, oxidativ stress, genotoxicitet, antiandrogen, progesteron, glukokortikoid och peroxisomproliferation-aktiviteter. Nedan ges exempel på studier där effektbaserade metoder i celler har använts för att utvärdera olika frågeställningar om kemiska ämnens påverkan på vattenmiljön.

De naturliga östrogenerna 17β-östradiol och östron tillsammans med 17β-etinylöstradiol infördes i bevakningslistan under EU:s vattendirektiv år 2015, vilket innebär att de ska analyseras i vatten. Problemet är att kemiska analyser inte är tillräckligt känsliga för att upptäcka låga halter av dessa ämnen. Många studier har liksom våra, visat den betydligt högre känsligheten i cellbaserade östrogentester, ofta 100 gånger högre. Simon et al. (2022) mätte östrogen aktivitet och gjorde kemisk analys av östrogena ämnen i mer än 70 ytvatten från 14 länder i Europa. Östrogen aktivitet detekterades i 72% av proverna (0,01 – 1,3 ng E2eq/L), medan kemisk analys detekterade östrogener endast i 24% av proverna.

Flera studier har jämfört resultat från olika in vitro-tester för östrogen aktivitet. Könemann et al. (2018) jämförde fyra olika celltester i prover från ytvatten och avloppsvatten och fann god korrelation i resultat mellan testerna, men att känsligheten kan variera något mellan tester beroende på den relativa potensen hos enskilda östrogena ämnen.

Harraka et al. (2021) mätte östrogen aktivitet i vatten utefter Santa Ana River i Kalifornien, en flod med mycket utsläpp från tätbebyggda områden. Vid normalflöden var aktiviteterna mellan 0,5 och

1,4 ng E2eq/L, med ökande aktivitet upp till 10 ng E2eq/L efter kraftiga regn. Endast östradiol och östron kunde detekteras med kemisk analys och halterna kunde bara förklara en liten del av den uppmätta östrogena aktiviteten.

Jia et al. (2019) rapporterade östrogena och mutagena effekter i vatten från lake Taihu i Kina. Östrogenaktiviteten varierade mellan 0,1 och 1 ng E2eq/L.

Neale et al. (2020) rapporterade en markant ökning i kemikaliebelastning och toxisk aktivitet efter regn, i små vattendrag i tyska jordbruksområden. Hög östrogen aktivitet i många prover tolkades som påverkan från avlopp och bräddning i avloppsreningsverk.

Neale et al. (2017a) testade 34 vanligt förekommande miljöföroreningar i ett batteri av in vitro-tester, och jämförde med testresultat från vattenprover från Donau. Resultaten visade, liksom många tidigare studier, att för de flesta testerna kunde mindre än 1% av effekterna i Donau-proverna förklaras med de detekterade miljöföroreningarna, med undantag för den östrogena effekten, som till stor del kom från östron.

Ett stort antal studier har mätt påverkan i ytvatten från utsläpp från avloppsreningsverk. Neale et al. (2017b) mätte halter av 405 kemiska ämnen och aktivitet i 13 bioassays i prover från vattendrag uppströms och nedströms tre avloppsreningsverk i Schweiz. Bioaktivitet från litteraturen och databasen ToxCast användes för att beräkna hur mycket de uppmätta kemiska ämnena bidrog till den uppmätta aktiviteten i vattenproverna. De enda tester som hade en högre förklaringsgrad än enstaka procent var ett test för fotosynteshämning, där herbicider förklarade 100% av aktiviteten och

AhR-testet, där fungiciden propikonazol förklarade upp till 30% av aktiviteten.

Zhou et al. (2022) har följt variationer i anti-androgen aktivitet under tre år uppströms och nedströms ett avloppsreningsverk med utlopp i floden Holtemme i Tyskland. En studie på samma avloppsreningsverk har identifierat ett mycket potent antiandrogen ämne, 4-metyl-7-dietylamino-koumarin (C47) och två aktiva derivat av ämnet, som sammanlagt bidrog med 35% av den antiandrogena aktiviteten i proverna (Muschket et al., 2021).

Nivala et al. (2018) har använt effektbaserade metoder kombinerat med kemisk analys för att utvärdera reningseffektiviteten i en våtmark. Östrogen aktivitet minskade med 97–99,5%, medan reningen var lägre för andra biologiska effekter. Författarna rekommenderade AhR, östrogen aktivitet och oxidativ stress som lämpliga testmetoder för att utvärdera reningseffektivitet av våtmarker.

Bedömning av bioaktivitet i vatten

Det är förstås omöjligt att med kemisk analys mäta alla ämnen som kan orsaka oönskade biologiska effekter i vattenmiljön. Även om det vore möjligt att identifiera och haltbestämma alla ämnen i ett prov, skulle det ändå inte gå att bedöma den sammanlagda risken för skadliga effekter, eftersom de flesta ämnen saknar information om toxicitet och på grund av svårigheten att bedöma blandningseffekter från ett stort antal ämnen. Effektbaserad analys av vattenprover visar den sammanlagda effekten av de ämnen som har den specifika biologiska effekt, som analysen testar för. En nackdel är att man inte vet vilket eller vilka ämnen som orsakar effekten. Vid upptäckt av en hög toxisk aktivitet i vattenprov är dock det primärt viktigaste att spåra källan för att kunna eliminera föroreningen. Källspårning kan göras genom effektbaserad mätning uppströms och i tillrinningsområden. Man kan också försöka identifiera orsakande ämne eller ämnen genom effekt driven analys. Detta innebär upprepad fraktionering av provet för att få en tillräckligt ren fraktion med hög aktivitet, där det kemiska ämnet som orsakar aktiviteten kan identifieras. Ett fåtal rapporter finns där detta har lyckats, till exempel den tidigare beskrivna identifieringen av det antiandrogena ämnet från floden Holtemme i Tyskland (Muschket et al., 2021).

För att kunna jämföra biologiska aktiviteter mellan olika studier används en standardsubstans, som är specifik för varje metod. Vattenprovet analyseras i en spädningsserie, som jämförs med standardsubstansen och en biologisk ekvivalent koncentration (BEQ) av standarden beräknas för

provet (ISO, 2022). Till exempel anges östrogen aktivitet som östradiolekvivalenter/L vatten (E2eq/L), vilket innebär att vattenprovet har en total östrogen aktivitet som motsvarar en viss koncentration av östradiol. Den östrogena aktiviteten kan komma från olika ämnen som har östrogen aktivitet. På detta sätt kan effekterna jämföras mellan olika studier.

Effektbaserade studier är väl lämpade för att följa miljötillståndet i ytvatten över tid och rum. Med hjälp av BEQ-värden kan effekter i olika vattendrag och i prover från olika tidpunkter jämföras. Medianvärden, 10- och 90%-iler av historiska data utgör ett slags referensvärden och anger ett intervall som representerar normalvärden. De uppmätta aktiviteterna kan jämföras med detta normalintervall och avvikande värden indikerar att vattenproverna bör följas upp för källspårning och åtgärder.

För effektbaserade analyser finns inga fastställda gränsvärden. Däremot finns flera förslag på hur riktvärden, så kallade effektbaserade trigger values (EBT), skulle kunna beräknas för effekter på hormonreceptorer och för ekotoxikologiska effekter i ytvatten (Escher et al., 2018; Brionet et al., 2019; Escher and Neale, 2021; Finckh et al., 2022; Neale et al., 2023). För östrogena effekter kan man utgå från bedömningsgrunden för östradiol på 400 pg/L. Det kan finnas andra ämnen med östrogen aktivitet i vattenprovet, som bör adderas till effekten av östradiol. Den totala östrogenaktiviteten i vattenprov bör därmed inte överskrida 400 pg E2eq/L.

Till skillnad från annan toxicitet så saknas en säker tröskeldos för viss typ av genotoxicitet, det vill säga det finns ingen säker dos under vilken ingen genotoxisk effekt uppstår. Mekanismen bakom genotoxicitet är oftast inte känd, och man kan därför inte säkert säga om effekten har en tröskeldos eller inte. Detta gäller särskilt i komplexa blandningar, såsom i vatten, där genotoxiciteten kan vara orsakad av flera olika ämnen.

I Sverige efterfrågas mer kunskap för beslut om åtgärder

Inte bara på EU-nivå utan även på nationell nivå har nyligen efterfrågats mer och bättre kunskap om miljöpåverkan av utsläpp som underlag för beslut om åtgärder. Naturvårdsverket har just lämnat en fördjupad utvärdering av Sveriges miljömål till regeringen, där ett avsnitt behandlar "Vatten i landskapet" (SNV, Rapport 7091, jan 2023). Man konstaterar att bättre kunskap krävs om utsläppens källor och storlek och fortsätter: "Eftersom påverkan till stor del är okänd är det svårt att utforma en välriktad övervakning av tillståndet i miljön".

Styrning och genomförande av miljöövervakning i Sverige kompliceras av det stora antal aktörer inom området: Naturvårdsverket, Havs- och vattenmyndigheten och Sveriges geologiska undersökning är föreskrivande och vägledande myndigheter, medan länsstyrelser tillsammans med Vattenmyndigheterna driver arbetet med miljöövervakning i vatten. I rapporten från Naturvårdsverket föreslås dessa aktörer tillsammans ”ta fram en långsiktig plan för att utveckla en mer sammanhållen miljödataförvaltning och förbättrad kunskapsförsörjning om miljöfarliga utsläpp till vatten samt mätningar i recipienten”.

Effektbaserade metoder, som också föreslås i Vattendirektivet, är ett värdefullt komplement till kemiska analyser för att förbättra kunskapen om miljöpåverkan, utsläppens källor och storlek samt identifiera lämpliga åtgärder.

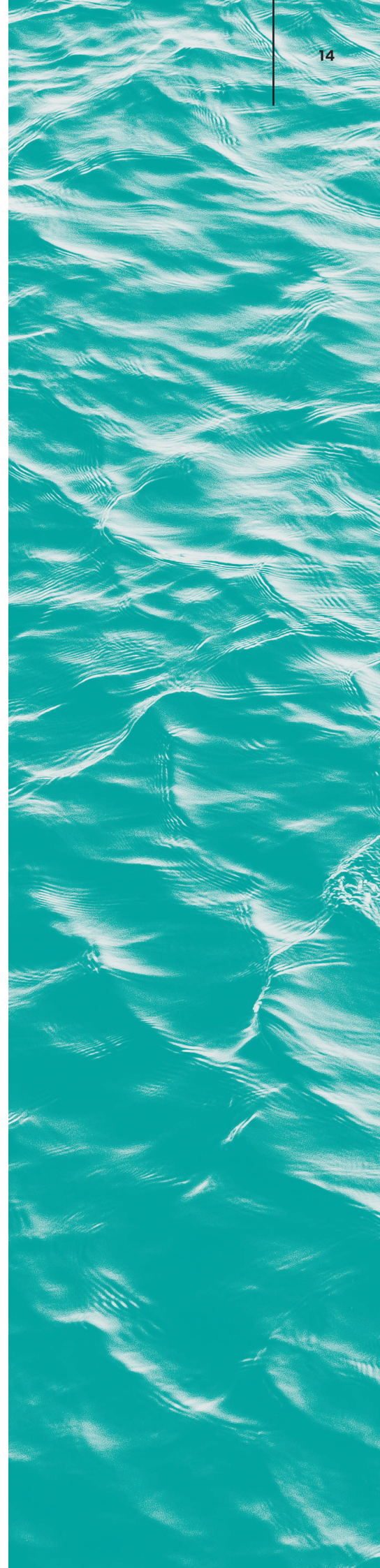
Exempel på hur effektbaserade metoder kan användas

- Komplettera den kemiska analysen, som görs enligt föreskrifter från HaV, med en effektbaserad analys för att mäta effekter av hela den komplexa blandningen av föroreningar.
- Följa miljötilståndet för kemiska föroreningar i ytvatten geografiskt och över tid.
- Spåra utsläppskällor.
- Analysera ytvatten som används till dricksvatten i olika steg från tillrinningsområde till dricksvattenverk, enligt kravet på riskbaserad strategi i nya EU-direktivet.
- Prioritera vilka vattenförekomster som behöver åtgärder eller ytterligare kartläggning.

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

biocellanalytica.se

kontakt@biocellanalytica.se





Johan
Lundqvist

Elin
Lavonen

Agneta
Oskarsson

Mattias
Sörengård

Författare

Detta White Paper har skrivits av Agneta Oskarsson, Johan Lundqvist, Elin Lavonen och Mattias Sörengård. Agneta Oskarsson är professor emerita 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 effektbaserade testmetoder för att upptäcka kemiska föroreningar i vatten. Tillsammans har de startat BioCell Analytica. Elin Lavonen är fil.dr. i miljöanalys och har sedan sin doktorsexamen arbetat bland annat på Norrvatten och Veolia Water Technologies. Sedan 2021 arbetar hon som vattenspecialist på BioCell Analytica. Mattias Sörengård är civilingenjör i miljö- och vattenteknik och tekn.dr. i miljöanalys. Han är sedan december 2022 anställd som miljöspecialist på BioCell Analytica.

Lästips

- Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment, bok av Beate Escher, Peta Neale och Frederic Leusch. IWA Publishing, 2021. Finns tillgänglig online: <https://iwaponline.com/ebooks/book/832/Bioanalytical-Tools-in-Water-Quality-Assessment>
- Technical Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment under the Water Framework Directive. Report to the Common Implementation Strategy (CIS) Working Group Chemicals on the Outcome of the work performed in the subgroup on Effect-Based Methods (EBM) Mandate 2016-2018. October 2021. https://www.normandata.eu/sites/default/files/files/Highlights/211013_EBM%20report_FINAL_WG_Chem_Oct_2021%20%281%29.pdf
- Finlayson, K.A med flera. Review of ecologically relevant in vitro bioassays to supplement current in vivo tests for whole effluent toxicity testing – Part 1: Apical endpoints. *Sci. Total Environ.* 851, 157817, 2022a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157817>
- Finlayson, K.A med flera. Review of ecologically relevant in vitro bioassays to supplement current in vivo tests for whole effluent toxicity testing – Part 2: Non-apical endpoints. *Sci. Total Environ.* 851, 158094, 2022b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158094>

Referenser

- Been, F., Pronk, T., Louisse, J., et al. 2021. Development of a framework to derive effect-based trigger values to interpret CALUX data for drinking water quality. *Water Res.* 193, 116859.
- 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.
- Brion, F., De Gussem, V., Buchinger, S. et al., 2019. Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel in vivo zebrafish embryonic (EASZY) assay: Comparison with in vitro cell-based assays and determination of effect-based trigger values. *Environ. Int.* 130, 104896.
- Carvalho, R.N., Niegowska, M., Gomez Cortes, L. et al. 2019. Testing comparability of existing and innovative bioassays for water quality assessment. A European-wide exercise. EUR 29505 EN, Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2019, ISBN 978-92-79-98270-5.
- CIS, 2021. Technical Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment under the Water Framework Directive. Report to the Common Implementation Strategy (CIS) Working Group Chemicals on the Outcome of the work performed in the subgroup on Effect-Based Methods (EBM) Mandate 2016-2018. October 2021.
- COM 2022. Proposal for a directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against standards and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy. COM (2022)540 final.
- EPA Adverse Outcome Pathway (AOP) Research Brief, January 2017. https://www.epa.gov/sites/default/files/2017-03/documents/aop_research_brief_03_2017.pdf
- Escher, B.I., van Daele, C., Dutt, 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.
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., et al., 2014. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. *Environ. Sci. Technol.*, 48, 1940-1956.
- Escher, B.I., Neale, P.A. and Leusch, F.D.L., 2015. Effect-based trigger values for in vitro bioassays: Reading across from existing water quality guideline values. *Water Res.* 81, 137-148.
- Escher, B.I., Ait-Aissa, S., Behnisch, P.A., et al. 2018. Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. *Sci.Total Environ.* 628-629, 748-765.
- Escher, B.I., Neale, P.A. and Leusch, F.D.L. Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment. IWA Publishing, 2021.

- Escher, B.I. and Neale, P.A., 2021. Effect-based trigger values for mixtures of chemicals in surface water detected with in vitro bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 40, 487-499.
- EU 2013/39. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and 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.
- Faktapromemoria om EU-förslag 2022/23:FPM19:COM(2022)540 final. https://www.riksdagen.se/sv/dokument-lagar/dokument/fakta-pm-om-eu-forslag/forslag-till-direktiv-om-andring-av-ramdirektivet_HA06FPM19
- Feretti, D., Acito, M., Dettori, M., et al. 2020. Genotoxicity of source, treated, and distributed water from four drinking water treatment plants supplied by surface water in Sardinia, Italy. *Environ. Res.* 185, 109385.
- Finckh, A., Buchinger, S., Escher, B.I., et al. 2022. Endocrine disrupting chemicals entering European rivers: Occurrence and adverse mixture effects in treated wastewater. *Environ. Int.* 170, 107608.
- Finlayson, K.A., Leusch, F.D.L. and van de Merwe, J.P. 2022a. Review of ecologically relevant in vitro bioassays to supplement current in vivo tests for whole effluent toxicity testing – Part 1: Apical endpoints. *Sci. Total Environ.* 851, 157817.
- Finlayson, K.A., van de Merwe, J.P., and Leusch, F.D.L. 2022b. Review of ecologically relevant in vitro bioassays to supplement current in vivo tests for whole effluent toxicity testing – Part 2: Non-apical endpoints. *Sci. Total Environ.* 851, 158094.
- Harraka, G.T., Magnuson, J.T., Du, B., et al. 2021. Evaluating the estrogenicity of an effluent-dominated river in California, USA: Comparisons of in vitro and in vivo bioassays. *Sci. Tot. Environ.* 758, 143965.
- Holm, G och Önnby, L. Effektbaserade analyser för att utvärdera reningseffektivitet och miljörisker i avloppsvatten. Lärdomar från sex avloppsreningsverk med konventionell respektive avancerad rening. Sweco, 2022-11-07.
- HVMFS 2019:25. Havs- och vattenmyndighetens föreskrifter om klassificering och miljökvalitetsnormer avseende ytvatten.
- ISO 21115, 2019. Water quality – Determination of acute toxicity of water samples to a fish gill cell line (RTgill-W1).
- ISO 23196, 2022. Water quality – Calculation of biological equivalence (BEQ) concentrations.
- Jia, Y., Schmid, C., Shuliatevich, A. et al. 2019. Toxicological and ecotoxicological evaluation of the water quality in a large and eutrophic freshwater lake of China. *Sci. Total Environ.* 667, 809-820.
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Carere, M., et al. 2015. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106, 107-115.
- Könemann, S., Kase, R., Simon, E. et al. 2018. Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive. *Trends in Anal. Chem.*, 102, 225-235.
- Lundkvist, J., Andersson, A., Johannisson, A., et al., 2019. Innovative drinking water treatment techniques reduce the disinfection-induced oxidative stress and genotoxic activity. *Water Res.*, 155, 182-192.
- Muschket, M., Brack, W., Inostroza, P.A., et al. 2021. Sources and fate of the antiandrogenic fluorescent dye 4-methyl-7-diethylaminocoumarin in small river systems. *Environ. Toxicol.* 40, 3078-3091.
- Neale, P.A., Munz, N.A., Ait-Aissa, S., et al. 2017a. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Sci. Total Environ.* 576, 785-795.
- Neale, P.A., Altenburger, R., Ait-Aissa, S. et al. 2017b. Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. *Water Res.*, 123, 734-750.
- Neale, P.A., Braun, G., Brack, W., et al. 2020. Assessing the mixture effects in in vitro bioassays of chemicals occurring in small agricultural streams during rain events. *Environ. Sci. Technol.*, 54, 8280-8290.
- Neale, P.A., Escher, B.I., de Baat, M.L. et al. 2023. Effect-based trigger values are essential for the uptake of effects-based methods in water safety planning. *Environ. Toxicol. Chem.* 00, 1-13.
- Nivala, J., Neale, P.A., Haasis, T. et al. 2018. Application of cell-based bioassays to evaluate treatment efficacy of conventional and intensified treatment wetlands. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 4, 206-217.
- OECD Test guideline No. 249 Fish cell line acute toxicity: The RTgill-W1 cell line assay, 2021.
- 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.
- Rosenmai, A.K., Lundqvist, J., le Godec, T. et al. 2018. In vitro bioanalysis of drinking water from source to tap. *Water Res.*, 139, 272-280.

- Schuijt, L.M., Peng, F.-J., van den Berg, S.J.P. et al. 2021. (Eco)toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: Fact, challenges, and future. *Sci. Total Environ.* 795, 148776.
- Simon, E., Duffek, A., Stahl, C., et al. 2022. Biological effect and chemical monitoring of Watch List substances in European surface waters; Steroidal estrogens and diclofenac – Effect-based methods for monitoring frameworks. *Environ. Int.* 159, 107033.
- SNV, Rapport 7091, januari 2023. Förslag till regeringen. Underlag till den fördjupade utvärderingen av Sveriges miljömål 2023. Naturvårdsverket.
- Tang, J.Y.M., Buseti, F., Charrois, J.W.A., et al., 2014. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water? *Water Res.*, 60, 289–299.
- Tousova, Z., Oswald, P., Slobodnik, J., et al., 2017. European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Sci. Total Environ.* 601-602, 1849–1868.
- White Paper 2021. Kemiska föroreningar i avloppsvatten – nya innovativa analysmetoder. *BioCell Analytica*, oktober, 2021.
- White Paper 2022. Kemiska föroreningar i dricksvatten – nya innovativa analysmetoder. *BioCell Analytica*, mars, 2022.
- Yu, M., Lavonen, E., Oskarsson, A., et al. 2021. Removal of oxidative stress and genotoxic activities during drinking water production by ozonation and granular activated carbon filtration. *Environ. Sci. Eur.*, 33, 124.
- Zhou, S., Schulze, T., Brack, W. et al., 2022. Spatial and temporal variations in anti-androgenic activity and environmental risk in a small river. *Sci. Total Environ.* 853, 158622.



biocellanalytica.se
kontakt@biocellanalytica.se