



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsovetenskap

RAPPORT
TILL SYDVATTEN 2016-12-22

Undersökning av toxisk aktivitet i vattenprover före och efter UV-behandling

Agneta Oskarsson, Frida Niss och Rikard Tröger

Rapporten redovisar resultaten av ett uppdrag från Sydvatten.

Insamling och extraktion av vattenprover har gjorts av Rikard Tröger, doktorand vid Institutionen för vatten och miljö, sektionen för organisk miljökemi och ekotoxikologi, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.

De cellbaserade toxicitetstesterna, inklusive databearbetning, har gjorts av Frida Niss, forskningsassistent vid Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.

Sammanställning av rapporten har gjorts av Agneta Oskarsson, professor i livsmedelstoxikologi vid Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala, agneta.oskarsson@slu.se.

Undersökning av toxisk aktivitet i vattenprover före och efter UV-behandling

I vattenrening ingår ofta oxidativa processer, såsom UV-behandling, för att ta bort patogena bakterier och parasiter och vissa organiska föroreningar. Det har dock visat sig att denna behandling också kan ge upphov till toxiska reaktionsprodukter av okänd sammansättning och med risk för toxiska effekter (cocktaileffekt).

Med hjälp av cellbaserade bioassays kan man mäta den sammanlagda toxiska effekten i den komplexa blandningen som vattenprovet utgör. Toxisk potential före och efter behandling av vattnet kan jämföras, för att bedöma hur reningsprocessen påverkat vattenkvaliteten. Med bioassays kan man mäta olika typer av toxisk aktivitet, t ex allmän celltoxicitet, oxidativ stress, metabolisk aktivitet, hormonaktivitet, DNA-skada och immunotoxicitet. Under senare år har en rad artiklar publicerats, där cellbaserade testmetoder använts för att studera toxisk aktivitet i vattenprover, till exempel i ytvatten och från olika steg i avloppsrening [1-12].

Syfte

Att undersöka toxisk aktivitet med hjälp av cellbaserade bioassays i vattenprover från Sydsvatten före och efter UV-behandling.

Provinsamling och extraktion

Vattenprover togs av Sydsvattens personal på Vombverket (bmp, 2016-08-30). Prov före UV aggregatet var luftat avhärdat och snabbfiltrerat vatten från inkommande ledning till UV piloten och prov efter UV togs på utgående ledning från UV piloten. Provkärlen var 12 liters metallkärl som först hade rengjorts med etanol samt Milli-Q vatten av SLUs personal. Vattenvolym använd för extraktion var 5 L per prov. Totalt togs tre prov före UV-behandling och tre prov efter UV-behandling. Proverna skickades från Vombverket till SLU via DB SCHENKER direkt efter provtagningen. Proven förvarades vid 4°C tills extraktion var genomförd.

Extraktionen gjordes med hjälp av en automatiserad extraktionsapparat (SPE-DEX 4790® Automated Extraction System, Horizon Technology, New Hampshire, U.S.), där proverna först filtrerades (1µm GF/F) och sedan extraherades med hjälp av fastfas-diskar (Atlantic HLB – M, 47 mm).

Före applikationen tvättades diskarna i 5 steg med Milli-Q vatten samt metanol. Efter provapplikationen tvättades filter samt diskar med 2*25 ml vatten/metanol (95/5). Elueringen från fastfasdiskarna skedde med 3*25 ml metanol. Därefter indunstades proverna genom 2 indunstningssteg med ett försiktigt flöde av kvävgas. Det slutliga lösningsmedlet för extrakten var etanol/vatten (1ml) och proverna var alltså koncentrerade 5000 gånger. Milli-Q vatten extraherades och koncentrerades enligt samma procedur och användes som blank i toxicitetstesterna.

Cellbaserade bioassays

Två effektparametrar studerades i de koncentrerade vattenproverna, nämligen oxidativ stress (Nrf2-aktivitet) och aktiviteten av arylhydrokarbon-receptorn (AhR). Nrf2 är en viktig faktor i cellernas försvar mot oxidativ stress och ökad aktivitet av Nrf2 är ett tecken på oxidativ stress. Aktivitet av AhR visar förmågan att inducera cytokrom P450-enzym, som kan metabolisera vissa miljöföroreningar och andra kemikalier till reaktiva produkter. Dessa båda mekanismer kan ligga bakom olika typer av toxiska effekter i organismer, inklusive människa. Effekterna studerades i humana levercancer-celler, HepG2, med hjälp av reporter-gen-tester.

Cellodling

HepG2-celler odlades i DMEM-medium med 4,5 g/L glukos och 1 % L-Glutamin, 1 % Antibiotikum-Antimykotikum (Streptomycin, Penicillin and Amphotericin B), och 10 % fetalt kalvserum, i en cellinkubator med 5 % CO₂ vid en temperatur av 37 °C.

Reportergen-test

Experimenten utfördes i transparenta 96-hålsplattor med 20 000 celler i varje brunn och med 100 µl odlingsmedium per brunn. Cellerna fick växa i 48 tim, varpå de transfekterades med 30 ng Renilla/brunn, som en kontrollplasmid, samt 90 ng/brunn av endera av två pGL4 baserade luciferas-reporter-plasmider. Den ena plasmiden innehåller responselementet för AhR, som vid aktivering uppreglerar genuttrycket för luciferas, vilket omvandlar reagenset luciferin till mätbart ljus. Ljussignalens styrka står i direkt proportion till aktiveringen av AhR. Den andra plasmiden innehåller responselementet för Nrf2, som på motsvarande sätt reglerar genuttrycket av luciferas. Plasmiderna överfördes till cellerna (transfekterades) med hjälp av 0,3 µl Lipofectamine® 2000 Reagent per brunn utspätt i 10 µl Opti-MEM® (1x) med reducerat serum samt 90 µl odlingsmedium. Efter 24 tim byttes medium till exponeringsmedium innehållande 1 % koncentrerat Sydsvatten eller Milli-Q vatten (blank) eller 1 % etanol (kontroller). Koncentrationen av etanol var 1 % i samtliga prover. Den slutliga koncentrationsfaktorn för vattenproverna i testerna var 50 gånger. Som positiv kontroll på AhR-aktivitet användes TCDD och på Nrf2-aktivitet sulforafan.

Efter ytterligare 24 tim togs mediet bort och 25 µl passiv lysis-buffert tillsattes till varje brunn. Plattorna skakades i rumstemperatur under 30 minuter, varefter 20 µl av lysatet från varje brunn överfördes till vita plattor. Dual-Luciferase® Reporter 1000 Assay System (Promega) utfördes på lysatet enligt tillverkarens instruktioner och plattorna mättes för luminescens på en Wallac Victor² 1420 plattläsare. Till varje brunn tillsattes 45 µl Luciferase Assay Reagent II, varpå luminescensen mättes. Efter första mätningen tillsattes 45 µl Stop & Glo Reagent i varje brunn, och luminescensen från Renilla-plasmiden mättes som ett mått på hur effektivt cellerna transfekterats.

Cellviabilitet

20 000 celler/brunn såddes ut i transparenta 96-hålsplattor med 100 µl odlingsmedium. Mediet byttes efter 48 tim inkubation i en cellinkubator med 5 % CO₂ vid en temperatur av 37

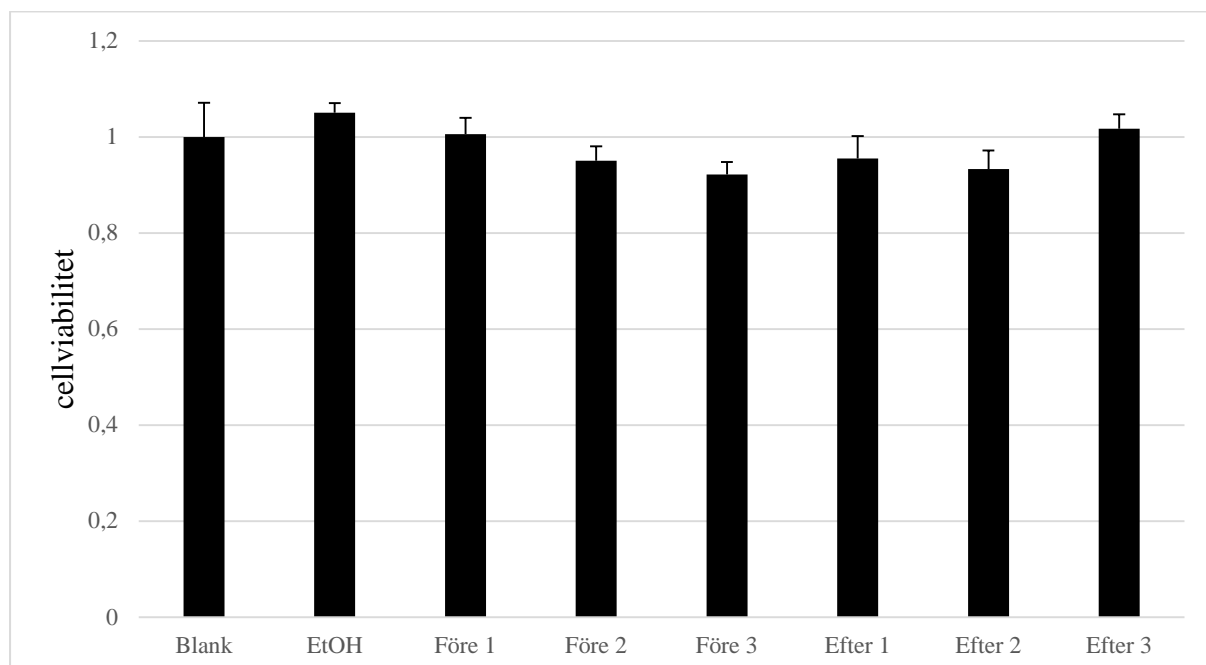
°C och efter ytterligare 24 tim byttes mediet igen till exponeringsmedium innehållande 1 % sydvatten-prover eller 1 % etanol (kontroller). Efter 24 tim tillsattes 20 µl Celltiter 96® AQ_{ueous} One Solution Reagent (MTS assay) till varje brunn, varpå plattorna inkuberades i 37 °C under 20 minuter. Absorbansen i brunnarna mättes i en Wallac Victor² 1420 plattläsare vid 490 nm.

Behandling av data

I de båda reporter-gen-testerna mättes luminescensen från Nrf2 respektive AhR-plasmidens aktivitet genom ämnet *Firefly*-luciferas. Dessutom mättes Renilla-plasmidens aktivitet genom *Renilla*-luciferas, som ett mått på andelen celler i varje brunn som transfekterats. Resultaten uttrycks som kvoten mellan luminescensen från *Firefly*-luciferas och luminescensen från *Renilla*-luciferas i varje brunn, vilket producerade en kvot som vidare presenterades som aktiviteten av AhR eller Nrf2. I både reporter-gen-testerna och cellviabilitets-testet presenteras resultaten i relation till blankprovet, som normaliserats till 1. Kontrollprovet med 1% etanol redovisas också i resultaten och kan jämföras med blankprovet för att bedöma eventuell påverkan av extraktions- och koncentreringsmetoden på toxiciteten. Statistisk signifikans i aktivitet före och efter UV-behandling analyserades med Student's t-test.

Resultat

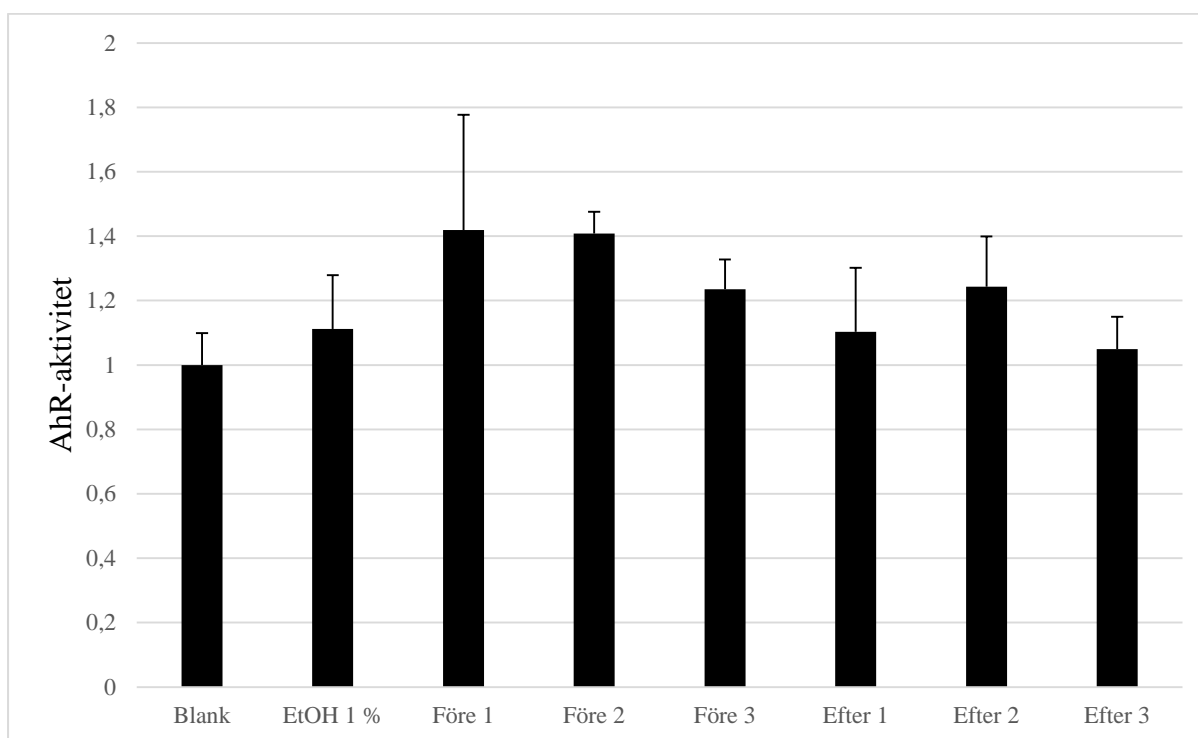
Cellviabiliteten var i alla prover mer än 80% av blank eller etanol-kontrollen, vilket är gränsen för vad som bedöms vara en toxisk effekt (Figur 1). De koncentrerade vattenproverna bedömdes därmed inte orsaka någon specifik toxicitet i de humana levercellerna, som också har använts i reporter-gen-testerna.



Figur 1. Viabilitet i HepG2-celler behandlade med 50x koncentrerade vattenprover: tre prover tagna före och tre prover tagna efter UV-behandling (medelvärde + standardavvikelse; n=6 för blank och etanol och n=3 för vardera vattenproverna). Blankprovet utgörs av koncentrerat Milli-Q-vatten.

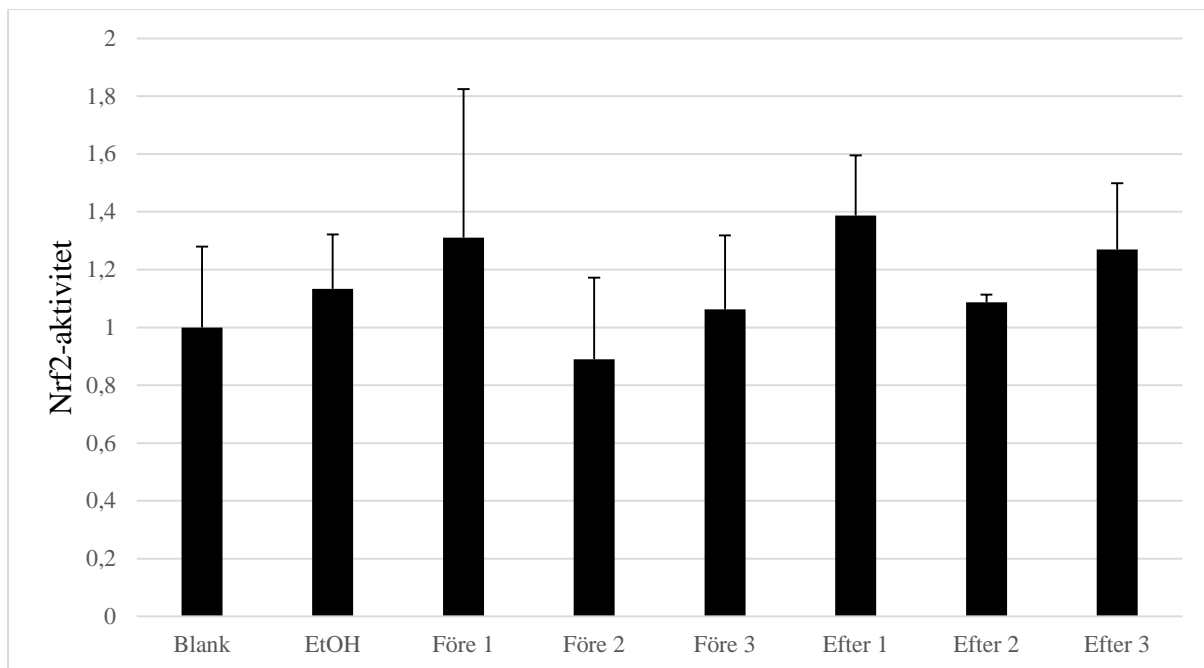
Figur 2 visar att AhR-aktiviteten var något förhöjd i de tre proverna tagna före UV-behandling ($p < 0.05$). En tendens till minskning av AhR-aktiviteten sågs efter UV-behandling. Minskningen var inte statistiskt signifikant ($p = 0.056$) då medelvärdena av de tre proverna före och efter UV-behandling jämfördes.

Ingen skillnad i AhR-aktivitet sågs mellan blank och etanol-kontroll, vilket visar att extraktion och koncentring av vattenproverna inte påverkar AhR-aktiviteten, dvs inte ger falska positiva resultat.



Figur 2. AhR-aktivitet i HepG2-celler behandlade med 50x koncentrerade vattenprover: tre prover tagna före och tre prover tagna efter UV-behandling (medelvärde + standardavvikelse; $n=6$ för etanol och $n=3$ för blank och vardera vattenproverna). Blankprovet utgörs av koncentrerat Milli-Q-vatten.

Nrf2-aktiviteten före och efter UV-behandling visas i figur 3. Ingen förändrad aktivitet sågs i vattenprover jämfört med blankprov, eller mellan prover före och efter UV-behandling. Det var dock stora variationer mellan de tre proverna tagna före respektive efter UV-behandlingen och även mellan de tre tekniska replikaten. Den positiva kontrollen sulforafan gav en tydligt ökad Nrf2-aktivitet (upp till 5 gånger blankprovet), vilket visar att testet fungerar.



Figur 3. Nrf2-aktivitet i HepG2-celler behandlade med 50x koncentrerade vattenprover: tre prover tagna före och tre prover tagna efter UV-behandling (medelvärde + standardavvikelse; n=6 för blank och etanol och n=3 för vardera vattenproverna). Blankprovet utgörs av koncentrerat Milli-Q-vatten.

Diskussion och slutsatser

Bakgrunden till studien var rapporter om att UV-behandling av vatten kan innebära ökad toxisk aktivitet. I ett arbete från Arizona, USA användes bioassays för att utvärdera vattenkvalitet och resultat av vattenrening [4]. Resultaten visade bland annat att ozonbehandling minskade oxidativ stress-aktivitet, UV-behandling minskade glukokortikoidaktivitet (en hormonaktivitet) och infiltration minskade aktiviteten i stort sett i alla bioassays. Däremot fann man en ökad aktivitet av AhR-aktivitet och mutagenicitet efter UV-behandling av vattenprover från avloppsreningsverk [4]. I andra arbeten har man inte sett någon ökad toxisk aktivitet i vattenprover efter kombinerad behandling med väteperoxid och UV [2, 9].

Resultaten från vår studie visade att UV-behandlingen inte ökade AhR- eller Nrf2-aktiviteten i de koncentrerade vattenproverna. Huruvida UV-behandling ger upphov till toxiska reaktionsprodukter beror sannolikt på det ingående vattnets kvalitet, vilket kan förklara skillnader i resultat från olika studier. Generella slutsatser om effekter av UV-behandling på vattenkvaliteten kan därför inte dras och studier bör göras separat från fall till fall.

En liten, men statistiskt signifikant, förhöjd AhR-aktiviteten sågs i vattenproverna före UV-behandling, jämfört med Milli-Q-vatten, som var koncentrerat på samma sätt. Det kan noteras att vattenprovet var koncentrerat 50 gånger och att AhR-aktiviteten ändå endast var något förhöjd. I avloppsvatten från reningsverk i Schweiz har förhöjd aktivitet av AhR delvis kunnat förklaras med förorening av pesticiderna propikonazol och terbutylazin [11] och i

vatten från Donau var den huvudsakliga källan till förhöjd AhR-aktivitet daidzein, en naturlig isoflavonoid i soja [5]. För att vidare utreda AhR-aktiviteten i råvattnet vid Vombverket skulle behövas ytterligare provtagning (även vid eventuella utsläppskällor) och analyser av toxisk aktivitet och kemisk sammansättning.

Sammanfattningsvis visades ingen ökad toxisk aktivitet, mätt i cellbaserade assays som oxidativ stress (Nrf2) eller metaboliserande aktivitet (AhR), efter UV-behandling av vatten.

Referenser

- [1] J.Y.M. Tang, S. McCarty, E. Glenn, P.A. Neale, M.S.J. Warne, B.I. Escher, Mixture effects of organic micropollutants present in water: Towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity, *Water Research*, 47 (2013) 3300-3314.
- [2] J.Y.M. Tang, F. Buseti, J.W.A. Charrois, B.I. Escher, Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water?, *Water Research*, 60 (2014) 289-299.
- [3] F.D.L. Leusch, S.J. Khan, S. Laingam, E. Prochazka, S. Froschio, T. Trinh, H.F. Chapman, A. Humpage, Assessment of the application of bioanalytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled water, *Water Research*, 49 (2014) 300-315.
- [4] A. Jia, B.I. Escher, F.D.L. Leusch, J.Y.M. Tang, E. Prochazka, B.F. Dong, E.M. Snyder, S.A. Snyder, In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water, *Water Research*, 80 (2015) 1-11.
- [5] P.A. Neale, S. Ait-Aissa, W. Brack, N. Creusot, M.S. Denison, B. Deutschmann, K. Hilscherova, H. Hollert, M. Krauss, J. Novak, T. Schulze, T.B. Seiler, H. Serra, Y. Shao, B.I. Escher, Linking in Vitro Effects and Detected Organic Micropollutants in Surface Water Using Mixture-Toxicity Modeling, *Environ Sci Technol*, 49 (2015) 14614-14624.
- [6] A.C. Mehinto, A. Jia, S.A. Snyder, B.S. Jayasinghe, N.D. Denslow, J. Crago, D. Schlenk, C. Menzie, S.D. Westerheide, F.D. Leusch, K.A. Maruya, Interlaboratory comparison of in vitro bioassays for screening of endocrine active chemicals in recycled water, *Water Res*, 83 (2015) 303-309.
- [7] W. Busch, S. Schmidt, R. Kuhne, T. Schulze, M. Krauss, R. Altenburger, Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring, *Environ Toxicol Chem*, 35 (2016) 1887-1899.
- [8] B.I. Escher, M. Dutt, E. Maylin, J.Y. Tang, S. Toze, C.R. Wolf, M. Lang, Water quality assessment using the AREc32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway, *J Environ Monit*, 14 (2012) 2877-2885.
- [9] B.I. Escher, M. Allinson, R. Altenburger, P.A. Bain, P. Balaguer, W. Busch, J. Crago, N.D. Denslow, E. Dopp, K. Hilscherova, A.R. Humpage, A. Kumar, M. Grimaldi, B.S. Jayasinghe, B. Jarosova, A. Jia, S. Makarov, K.A. Maruya, A. Medvedev, A.C. Mehinto, J.E. Mendez, A. Poulsen, E. Prochazka, J. Richard, A. Schifferli, D. Schlenk, S. Scholz, F. Shiraish, S. Snyder, G.Y. Su, J.Y.M. Tang, B. van der Burg, S.C. van der Linden, I. Werner, S.D. Westerheide, C.K.C. Wong, M. Yang, B.H.Y. Yeung, X.W. Zhang, F.D.L. Leusch, Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with In Vitro Bioassays, *Environ Sci Technol*, 48 (2014) 1940-1956.

[10] W. Brand, C.M. de Jongh, S.C. van der Linden, W. Mennes, L.M. Puijker, C.J. van Leeuwen, A.P. van Wezel, M. Schriks, M.B. Heringa, Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays, *Environ Int*, 55 (2013) 109-118.

[11] P.A. Neale, N.A. Munz, U.-A.y.U.S. Asmall yi, R. Altenburger, F. Brion, W. Busch, B.I. Escher, K. Hilscherova, C. Kienle, J. Novak, T.B. Seiler, Y. Shao, C. Stamm, J. Hollender, Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams, *Sci Total Environ*, 576 (2016) 785-795.

[12] M. Konig, B.I. Escher, P.A. Neale, M. Krauss, K. Hilscherova, J. Novak, I. Teodorovic, T. Schulze, S. Seidensticker, M.A. Kamal Hashmi, J. Ahlheim, W. Brack, Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis, *Environ Pollut*, 220 (2017) 1220-1230.