

Słowa kluczowe: OWO, NH₃⁺, AOX, kwasy chlorooctowe, test Salmonella (Amesa)

Teodora M. TRACZEWSKA*, Agnieszka TRUSZ-ZDYBEK*,
Katarzyna PIEKARSKA*, Andrzej BIŁYK*, Jolanta CZARNIECKA[†]

WPLYW WSTEPNEGO UTLENIANIA DWUTLENKIEM CHLORU NA MUTAGENNOŚĆ WODY MODELOWEJ

Badania prowadzono na 9 wariantach wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wstępnym utlenieniu dwutlenkiem chloru. Do testu *Salmonella* przeprowadzanego na szczepie testowym TA100 wprowadzono acetonowe ekstrakty wód modelowych o różnej zawartości OWO i amoniaku. Wraz ze wzrostem stężenia tych parametrów wzrastało w wodzie stężenie chloropochodnych takich jak: AOX i kwasy chlorooctowe oraz mutagenne działanie organicznych zanieczyszczeń wody w testach przeprowadzanych bez aktywacji metabolicznej. Jedynie woda o zawartości OWO na poziomie 2,0 gC/dm³ niezależnie od stężenia amoniaku (0,1; 0,5; 1,0 gNH₃/dm³), zarówno w testach z aktywacją metaboliczną jak i bez niej, nie wykazywała właściwości mutagennych.

1. WSTĘP

W wodach powierzchniowych i infiltracyjnych, które są w coraz większej ilości ujmowane na cele wodociągowe, zamiast wód podziemnych, systematycznie wzrasta zawartość zanieczyszczeń chemicznych i bakteriologicznych. Niedostateczne usuwanie tych, zdecydowanie niekorzystne dla zdrowia konsumentów, zanieczyszczeń w trakcie procesów oczyszczania wody wymusza stosowanie dużych dawek dezynfektantów, gdyż nadrzędnym celem procesu uzdatniania jest otrzymanie wody wolnej od zanieczyszczeń mikrobiologicznych [1,2].

Dezynfekcja wody, zawierającej naturalne i antropogeniczne związki organiczne, utleniaczami chemicznymi, generuje powstawanie licznych, nie do końca poznanych ubocznych produktów, które cechuje aktywność biologiczna, w tym rakotwórcza. Największa ich ilość powstaje w wyniku dezynfekcji chlorem [3,4]. Dlatego też tak intensywnie wprowadzane są inne metody dezynfekcji, jak chociażby wstępne zastosowanie dwutlenku chloru przed właściwym chlorowaniem.

* Politechnika Wroclawska, Wydział Inżynierii Środowiska, Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, teodora.traczewska@pwr.wroc.pl

2. METODYKA BADAŃ

Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych na 9 wariantach wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wstępnym utlenieniu dwutlenkiem chloru w dawce $0,4 \text{ mgClO}_2/\text{dm}^3$, zgodnie z krzywą zapotrzebowania wody na chlor.

Woda modelowa preparowana była z wody wodociągowej doczyszczonej na węglu aktywnym i z wody bogatej w naturalne, rozpuszczone związki humusowe, pochodzącej z Wielkiego Torfowiska Batorowego w takich proporcjach, aby zawartość OWO wynosiła: 2,0; 4,0; 6,0 mgC/dm^3 . Do wód o ustalonym OWO dodawano roztwór chlorku amonowego, tak aby stężenie amoniaku wynosiło: 0,1; 0,5; 1,0 $\text{mgNH}_3/\text{dm}^3$. Woda wodociągowa zastosowana w badaniach to woda powierzchniowa pobierana z rzeki Oławy i oczyszczana w Zakładzie Uzdatniania Wody „Mokry Dwór” we Wrocławiu w procesach koagulacji i filtracji na złożach piaskowych a następnie dezynfekowana.

W oparciu o wyniki wcześniejszych badań przeprowadzonych w ramach grantu Nr 7T09D 02721 [5], zateżanie próbek wody prowadzono w układzie szeregowym przy użyciu żywic Amberlite XAD, o różnej zdolności adsorpcyjnej i wyznaczonej doświadczalnie kolejności: XAD 16, 7 i 2. Przez zestaw kolumn filtrowano próbkę wody o objętość 10 dm^3 a zaadsorbowane na żywicach związki organiczne ekstrahowano acetonem. Następnie uzyskane ekstrakty poddawano badaniom bioindykacyjnym.

Ocenę mutagennego działania frakcji organicznej ekstrahowanej z wody modelowej przeprowadzono za pomocą testu Ames [6] na szczepie testowym *Salmonella typhimurium* TA100. Szczep ten wykrywa obecność mutagenów typu podstawienia pary zasad. Badania prowadzono bez udziału oraz celu metabolicznej aktywacji promutagenów przy zastosowaniu frakcji mikrosomalne S9 pochodzącej z wątroby szczura aktywowanej Aroclorem 1254. Do testu *Salmonella* wprowadzano związki znajdujące się w próbce wody zagęszczonej do współczynnika koncentracji równego: 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200, i 100, co odpowiadało objętości wody od 10 do 100 cm^3 . Każdy test był wykonywany w pięciu powtórzeniach.

W analizie wyników, uzyskanych testem *Salmonella*, określano współczynnik mutagenności (MR). Za wynik pozytywny dla danej próby wody uznawano każdy przypadek pojawienia się co najmniej dwukrotnie wyższej od spontanicznej rewersji indukowanej tzn. gdy MR był większy bądź równy 2.

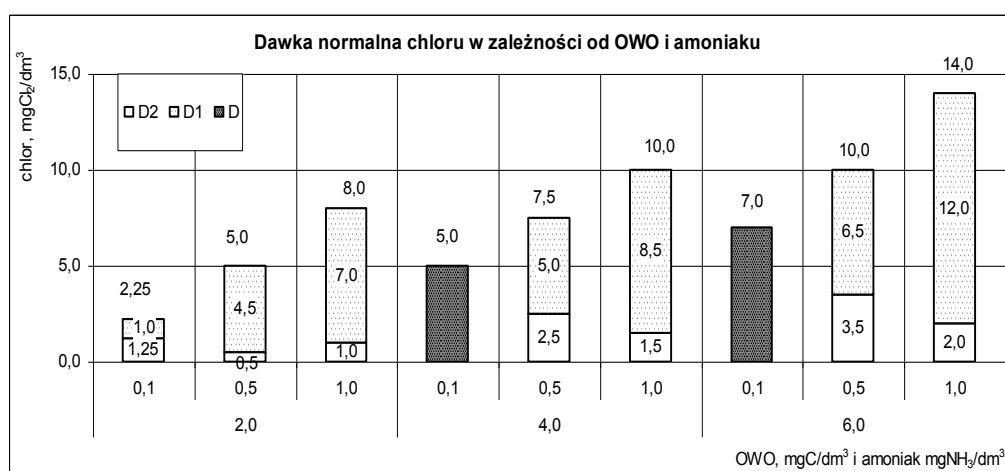
W badanych wodach modelowych po procesie ich zateżania, oznaczano zawartość związków chloroorganicznych (AOX) i kwasów chlorooctowych (HAA), w tym kwasu mono-, di- i tri- chlorooctowego. Metody analityczne obejmowały oznaczenia: ogólnego węgla organicznego (OWO) przy użyciu aparatu Shimadzu TOC 5050;

chloru metodą jodometryczną [7], chlorowanych związków organicznych jako AOX według metody Nanocolor Test 0-07, Macherey-Nagel, kwasów chlorooctowych (HAA) według procedury USEPA 522.2 z wykorzystaniem chromatografu gazowego Shimadzu 17 A.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Celem badań było ustalenie zależności pomiędzy zawartością w wodzie modelowej OWO, stężeniem amoniaku i stosowaną dawką dwutlenku chloru i chloru, a powstającymi po procesie dezynfekcji wtórnymi zanieczyszczeniami wody (AOX, kwasami chlorooctowymi: MCIAA, DCIAA, TCIAA) wraz z oceną ich aktywności biologicznej.

Dawka normalna chloru stosowana w badaniach rosła wraz ze wzrostem zawartości OWO i stężenia amoniaku od wartości 2,25 do 14,0 mgCl₂/dm³ (rys. 1). Udział D₁ w dawce normalnej wynosił od 44 do 90 % i również wzrastał wraz ze wzrostem OWO i amoniaku natomiast udział D₂ był od 10 do 56 % i nie wykazywał takiej zależności.

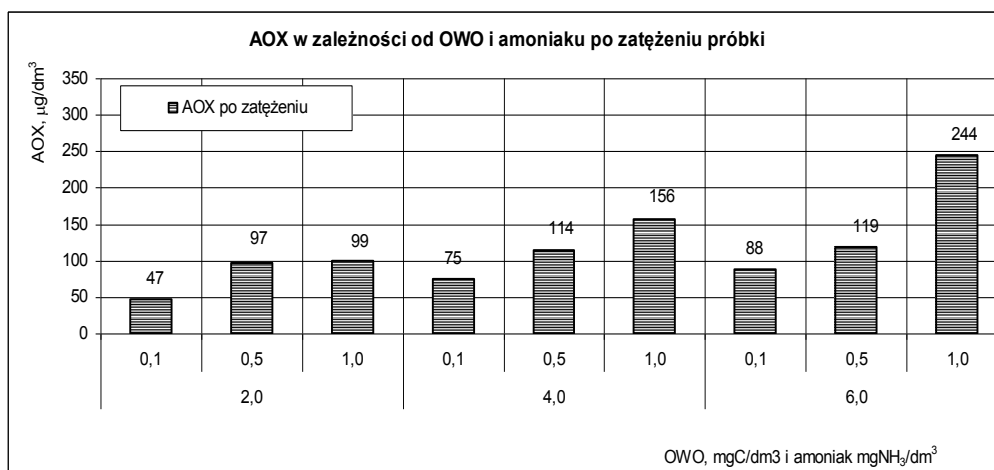


Rys. 1. Dawka normalna chloru zastosowana do chlorowania wody modelowej wstępnie utlenionej dwutlenkiem chloru

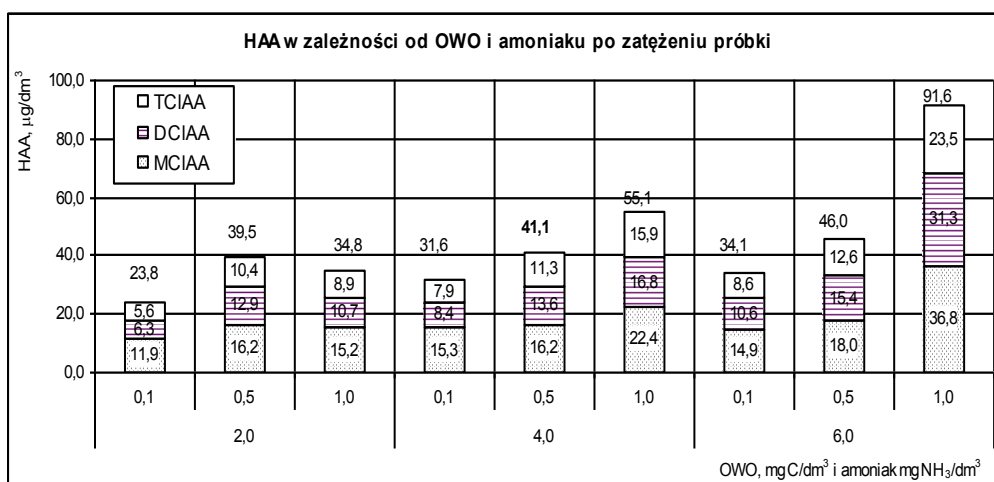
Dezynfekcja wody modelowej spowodowała wytworzenie pochodnych chlorowych związków organicznych. W wodzie modelowej po jej zateżeniu stwierdzono wzrost stężenia AOX od 47 µgCl/m³ do 244 µgCl/m³ (rys. 2).

Natomiast suma kwasów chlorooctowych w wodzie modelowej po jej zateżeniu wynosiła od 23,8 µgCl/m³ (dla najniższej zawartości OWO i stężenia amoniaku) do 91,6 µgCl/m³ (dla najwyższej zawartości OWO i stężenia amoniaku). Stężenia kwasów mono-, di- i tri-chlorooctowego w wodzie modelowej wzrastało wraz ze

wzrostem zawartości OWO i stężeniem amoniaku od wartości 5,6 $\mu\text{gCl}/\text{m}^3$ (TCIAA) do 36,8 $\mu\text{gCl}/\text{m}^3$ (MCIAA) (rys. 3). Po procesie zażęzania udział sumy kwasów chlorooctowych w absorbowalnych halogenowych związkach organicznych wynosił średnio 39 % (35–51%).



Rys. 2. Absorbowalne halogenowe związki organiczne powstałe po dezynfekcji wody modelowej chlorem i wstępnym utlenieniu dwutlenkiem chloru



Rys. 3. Suma kwasów chlorooctowych (mono-, di-, tri-chlorooctowych) powstałych po dezynfekcji wody modelowej chlorem i wstępnym utlenieniu dwutlenkiem chloru

Przebadanie testem *Salmonella* dziewięciu rodzajów ekstraktów wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wstępnym utlenieniu dwutlenkiem chloru pozwoliło stwierdzić, przy jakich parametrach OWO i amoniaku, można spodziewać się obecności w wodzie do picia zanieczyszczeń o potencjalnych właściwościach mutagennych.

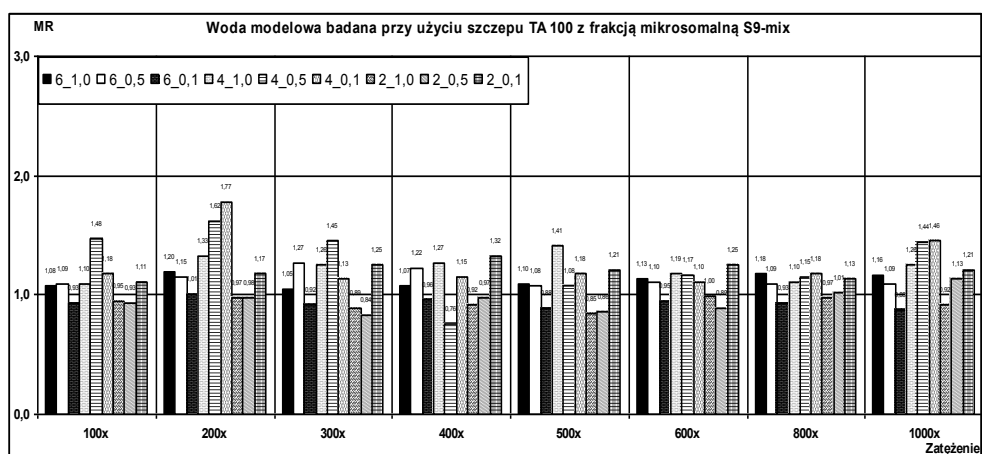
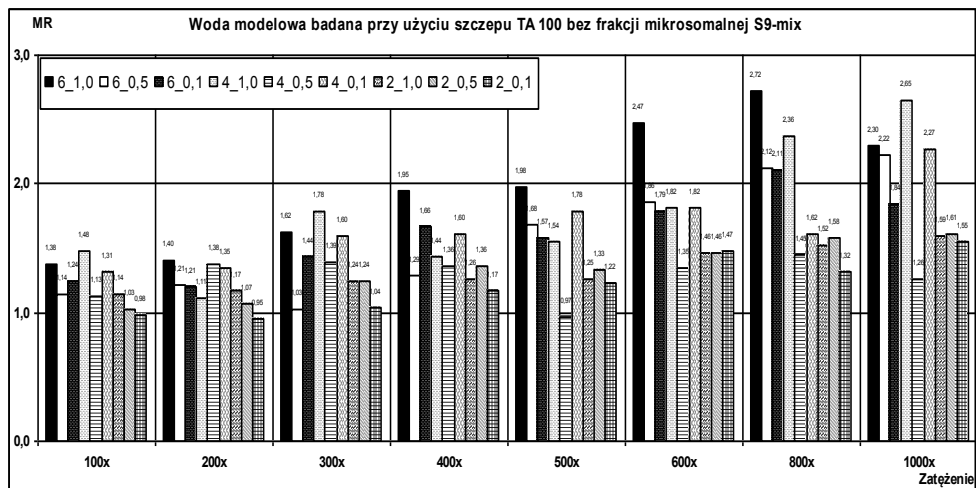
W testach prowadzonych z aktywacją metaboliczną jak i bez niej z ekstraktami wody modelowej o zawartości węgla organicznego na poziomie $2,0 \text{ mg/dm}^3$ w przypadku trzech stężeń amoniaku: 0,1; 0,5 i $1,0 \text{ mgNH}_3/\text{dm}^3$ nie uzyskano wartości współczynnika mutagenności powyżej 2,0 (rys. 4b). Wyniki MR na poziomie jedności, uzyskane w tych testach, świadczą o tym, iż przy takich parametrach wody nie powstają produkty pośrednie dezynfekcji zdolne do ingerencji w materiał genetyczny komórek bakteryjnych.

W przypadku wody modelowej zawierającej ogólny węgiel organiczny na poziomie od $4,0$ do $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ niezależnie od stężenia amoniaku, wahającego się od 0,1 do $1,0 \text{ mgNH}_3/\text{dm}^3$, badane ekstrakty wykazywały potencjalne właściwości mutagenne w testach przeprowadzanych bez aktywacji metabolicznej (rys. 4a).

Wartość współczynnika mutagenności zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości ogólnego węgla organicznego i stężeniem amoniaku. Jedyne wyniki uzyskane dla wody modelowej dla OWO = $4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i amoniaku $0,5 \text{ mgNH}_3/\text{dm}^3$ nieznacznie odbiegają od ogólnej tendencji zaobserwowanej w toku badań.

Dla ekstraktu chlorowanej wody modelowej o zawartości OWO na poziomie $4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężeniu amoniaku $0,1 \text{ mgNH}_3/\text{dm}^3$ wartość MR była większa od 2 dla współczynnika koncentracji 1000. Przy tym samym stężeniu związków organicznych i stężeniu amoniaku $1,0 \text{ mgNH}_3/\text{dm}^3$ zaobserwowano wyniki dodatnie testu Ames w dwóch najwyższych zatężeniach wody 800x i 1000x.

W wariacie wody modelowej wstępnie utlenianej i dezynfekowanej chlorem o zawartości ogólnego węgla organicznego równego $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężeniu amoniaku na poziomie $0,1 \text{ mgNH}_3/\text{dm}^3$ dodatnie wyniki testu Ames uzyskano tylko w przypadku zatężenia 800x. W badaniach ekstraktów wody zawierającej największą ilość OWO równą $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i przy stężeniu amoniaku na poziomie $0,5 \text{ mgNH}_3/\text{dm}^3$ mikrozanieczyszczenia wody dla zatężeń 800x i 1000x wywoływały efekt mutagenny w badaniach przeprowadzanych bez frakcji S9. Dla zawartości OWO na poziomie $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężenia amoniaku $1,0 \text{ mgNH}_3/\text{dm}^3$, uzyskano wyniki dodatnie testu dla współczynnika koncentracji wody w granicach od 400x do 1000x.



Rys. 4a,b. Współczynnik mutagenności MR mikrozanieczyszczeń wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla ogólnego węgla organicznego – OWO równego 6,0; 4,0; 2,0 mgC/dm³ i trzech różnych stężeń amoniaku, odpowiednio: 0,1; 0,5; 1,0 mgNH₃/dm³

Ekstrakty wód modelowych zawierających OWO na poziomie 4,0 i 6,0 mgC/dm³ nie wykazywały działania mutagennego w testach przeprowadzanych z aktywacją metaboliczną. Prawdopodobnie enzymy mikrosomalne frakcji S9-mix powodowały przekształcenia w strukturze związków, przez co nie wykazywały one charakteru mutagennego.

4. PODSUMOWANIE

Ze względu na to, iż procesom uzdatniania poddawane są głównie wody powierzchniowe, chlorowanie ich prowadzi do powstawania ubocznych produktów dezynfekcji o potencjalnych właściwościach mutagennych i kancerogennych, mimo że zastosowano wstępne utlenienie wody modelowej dwutlenkiem chloru.

Przeprowadzone badania wykazały, iż dawki normalne chloru rosły wraz ze wzrostem zawartości OWO i stężeniem amoniaku. Rosnąca wraz ze wzrostem stężenia OWO i amoniaku dawka normalna chloru powodowała z kolei przyrost stężenia AOX. Stężenie poszczególnych kwasów chlorooctowych (mono-, di- i tri-chlorooctowego) również wzrastało wraz ze wzrostem zawartości OWO i stężeniem amoniaku.

Badania wykonane testem *Salmonella* z wykorzystaniem szczepu testowego TA100 i prowadzonego zarówno w obecności frakcji mikrosomalnej jak i bez niej, na acetonowych ekstraktach wody modelowej dezynfekowanej chlorem o różnej zawartości OWO i amoniaku, pozwoliły na ocenę potencjalnych właściwości mutagennych mikrozanieczyszczeń wody zarówno o charakterze mutagenów bezpośrednich jak i pośrednich typu podstawienia pary zasad. Wartość współczynnika mutagenności (MR), dla badanych ekstraktów wód, zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości ogólnego węgla organicznego i stężenia amoniaku. Dla wody modelowej o zawartości OWO na poziomie 4,0 i 6,0 mgC/dm³ dodatnie wyniki testów uzyskano jedynie w badaniach przeprowadzanych bez aktywacji metabolicznej (obecność mutagenów bezpośrednich). Największe wartości MR zaobserwowano dla wody zawierającej najwyższe stężenia badanych parametrów (OWO = 6,0 mgC/dm³, amoniak = 1,0 mg NH₃/dm³). Testy *Salmonella* przeprowadzone z aktywacją metaboliczną na tych ekstraktach dały negatywne rezultaty, co świadczy o niewystępowaniu w badanych wodach związków o charakterze promutagenów.

Z kolei woda modelowa o zawartości węgla organicznego na poziomie 2,0 gC/m³, niezależnie od stężenia amoniaku, nie wykazywała potencjalnych właściwości mutagennych.

LITERATURA

- [1] T.M. Traczewska, *Biomonitoring mutagenności mikrozanieczyszczeń do picia*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2002.
- [2] P.A. Murphy, G.F. Craun: *A review of recent epidemiologic studies reporting associations between drinking water disinfection and cancer. Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*, 6/29, Lewis Publishers, Chelsea, 1990.
- [3] IARC, *Monograph of the evaluation of carcinogenic risk to humans Chlorinated drinking water; chlorination by-products; some other halogenated compounds, Cobalt and Cobalt Compounds*, 1991, volume 52.
- [4] Guidelines for Drinking-water Quality. Vol. 1 : 3rd ed, World Health Organization, Geneva, 2004.

- [5] T.M. Traczewska, A. Biłyk, J. Czarniecka, K. Piekarska, Trusz A., *Ocena potencjalnej mutagenności wody pitnej metodą biotestu*, Raport serii SPR, Politechnika Wroclawska, Wrocław, 2004.
- [6] D.M. Maron, B.N. Ames, *Mut. Res.* 1983, 113, 173.
- [7] W. Hermanowicz, J. Dojlido, W. Dożańska, B. Koziorowski, J. Zerbe, *Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków*, Arkady, Warszawa, 1999.

THE INFLUENCE OF PRELIMINARY OXIDATION THE CHLORINE DIOXIDE ON MUTAGENICITY MODEL WATER

Chlorine-disinfected model water after preliminary oxidation the chlorine dioxide in 9 variants was used in investigations. Acetone extracts from model water samples of different TOC and ammonium content were applied in the *Salmonella* assay in TA100 test strain. The higher concentration of those parameters, the higher concentration of such chlorine derivatives as AOX and chlor(o)acetic acids in water, and the stronger mutagenic activity of organic water pollutants observed in tests conducted without metabolic activation. Only water that contained less TOC than 2.0 g/dm^3 , irrespective of the ammonia concentration ($0.1; 0.5; 1.0 \text{ g NH}_3/\text{dm}^3$), did not show mutagenic effects in tests conducted either with or without metabolic activation