

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA
WYDZIAŁ INŻYNIERII ŚRODOWISKA

ROZPRAWA DOKTORSKA

**ZASTOSOWANIE PRÓBNIKÓW
PASYWNYCH W DŁUGOTERMINOWYM
MONITORINGU WODY
NA RÓŻNYCH ETAPACH UZDATNIANIA**

Marta Pogorzalec

PROMOTOR:

Dr hab. inż. Katarzyna Piekarska, Prof. Uczelni

Wrocław, 2021 r.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	4
WYKAZ SKRÓTÓW	5
WSTĘP	6
1. MIKROZANIECZYSZCZENIA W ŚRODOWISKU WODNYM	8
1.1. ŹRÓDŁA MIKROZANIECZYSZCZEŃ W WODZIE	8
1.2. RODZAJE MIKROZANIECZYSZCZEŃ	10
1.2.1. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.....	10
1.2.2. Pesticydy	13
1.2.3. Chlorowane związki organiczne.....	16
1.2.4. Uboczne produkty dezynfekcji wody	18
1.3. USUWANIE MIKROZANIECZYSZCZEŃ Z WODY.....	19
1.3.1. Usuwanie WWA.....	21
1.3.2. Usuwanie pestycydów	22
1.3.3. Usuwanie chlorowanych związków organicznych.....	23
2. METODY OCENY TOKSYCZNOŚCI I GENOTOKSYCZNOŚCI.....	25
2.1. OCENA TOKSYCZNOŚCI	26
2.1.1. Microtox	27
2.2. OCENA GENOTOKSYCZNOŚCI.....	29
2.2.1. Mutatox.....	31
2.2.2. Test <i>Vibrio harveyi</i>	31
2.2.3. SOS-Chromotest.....	32
2.2.1. UMU-Chromotest.....	32
3. METODY POBIERANIA PRÓBEK.....	34
3.1. DYNAMICZNE METODY POBIERANIA PRÓBEK	34
3.2. PASYWNE METODY POBIERANIA PRÓBEK.....	35
3.2.1. Urządzenia z membrana półprzepuszczalną	37
4. TEZA ROZPRAWY	41
5. CELE I ZAKRES BADAŃ	42
6. MATERIAŁY I METODY	43
6.1. POBIERANIE PRÓBEK.....	43
6.2. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZ.....	48

6.3.	ANALIZY CHEMICZNE	48
6.3.1.	Analiza ilościowa wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych.....	48
6.3.2.	Analiza ilościowa pestycydów chloroorganicznych i lotnych związków organicznych	51
6.4.	ANALIZY BIOLOGICZNE.....	54
6.4.1.	Analiza toksyczności testem Microtox™	54
6.4.2.	Analiza genotoksyczności testem SOS-Chromotest.....	56
6.4.3.	Analiza genotoksyczności testem UMU-Chromotest.....	58
7.	WYNIKI I DYSKUSJA	61
7.1.	WIELOPIERŚCIENIOWE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE.....	61
7.2.	PESTYCYDY CHLOROORGANICZNE	70
7.3.	LOTNE ZWIĄZKI ORGANICZNE.....	78
7.4.	ANALIZA TOKSYCZNOŚCI: MICROTOX	79
7.5.	ANALIZA GENOTOKSYCZNOŚCI: SOS-CHROMOTEST.....	84
7.6.	ANALIZA GENOTOKSYCZNOŚCI: UMU-CHROMOTEST.....	88
7.7.	ZMIENNOŚĆ SEZONOWA.....	92
7.8.	ANALIZA STATYSTYCZNA.....	93
8.	WNIOSKI.....	98
9.	PODSUMOWANIE.....	99
10.	LITERATURA	100
	WYKAZ RYSUNKÓW.....	109
	WYKAZ TABEL	110
	ZAŁĄCZNIK	111

STRESZCZENIE

W rozprawie podjęto zagadnienia związane z monitoringiem mikrozanieczyszczeń organicznych obecnych w wodzie przeznaczonej do spożycia. Dokonano oceny przydatności urządzeń z membraną półprzepuszczalną (SPMD), będących przykładem próbników pasywnych, do poboru próbek wody wodociągowej pochodzących z różnych etapów uzdatniania do analiz toksyczności i genotoksyczności zawartych w nich mikrozanieczyszczeń organicznych. W tym celu SPMD zostały zamontowane w Zakładzie Uzdatniania Wody „Mokry Dwór” pod Wrocławiem. Próbki pobierano przez okres jednego roku, w cyklach miesięcznych, w czterech punktach: wejście wody surowej, strumień wody bezpośrednio przed ozonowaniem, zbiornik wody czystej oraz u odbiorcy uzdatnionej wody. Po upływie każdego miesiąca SPMD były wymieniane na nowe. Po oczyszczeniu membran w laboratorium związki w nich zatrzymane były ekstrahowane heksanem, po czym odparowywane i poddawane dalszym analizom. Przy pomocy HPLC określono występowanie i stężenie wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, a dzięki GC lotnych związków organicznych oraz pestycydów chloroorganicznych. Wraz z postępem procesu uzdatniania stężenie analizowanych mikrozanieczyszczeń znacząco malało. Stwierdzono zdecydowanie wyższe stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w okresie jesienno-zimowym w stosunku do wiosenno-letniego, z kolei najwyższe stężenie pestycydów chloroorganicznych zaobserwowano latem. Równolegle wykonano analizę toksyczności mikrozanieczyszczeń obecnych w próbkach za pomocą testu Microtox oraz analizę genotoksyczności za pomocą testów SOS-Chromotest oraz UMU-Chromotest. Dla większości próbek zarówno poziom toksyczności jak i genotoksyczności malał wraz z postępem procesu uzdatniania wody lub pozostawał niezmienny. Pomędzy sumą stężeń wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych a genotoksycznością próbek oraz pomiędzy sumą stężeń pestycydów chloroorganicznych a toksycznością wody wykazano dodatnie korelacje. Prezentowane wyniki badań wskazują, że urządzenia z membraną półprzepuszczalną mogą być efektywnym narzędziem do zateżania *in-situ* próbek wody przeznaczonej do spożycia, w której mikrozanieczyszczenia występują w bardzo niskich stężeniach. Przygotowane w ten sposób próbki posłużyły do skutecznej oceny jakości biologicznej próbek wody przy ich bardzo małej objętości wybranymi testami bioindykacyjnymi (Microtox, SOS-Chromotest, UMU-Chromotest).

WYKAZ SKRÓTÓW

2-AA – 2-aminoantracen

4-NQO – 1-tlenek 4-nitrochinoliny

ChZO – chlorowane związki organiczne

C_{twa} – (*ang. time-weighted average concentration*) średnia ważona w czasie wartość stężenia

DMSO – dimetylosulfotlenek

EC_{50} – (*ang. effective concentration*) stężenie skutecznie wywołujące określoną reakcję u 50% badanej populacji

FMN – mononukleotyd flawinowy

FMNH₂ – zredukowany mononukleotyd flawinowy

GC-MS – (*ang. gas chromatography–mass spectrometry*) chromatografia gazowa ze spektrometrią mas

Hex – heksan

HPLC – (*ang. high-performance liquid chromatography*) wysokosprawna chromatografia cieczowa

IARC – (*ang. International Agency for Research on Cancer*) Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem

IF – (*ang. induction factor*) współczynnik indukcji

K_{ow} – współczynnik podziału oktanol-woda

K_{tw} – współczynnik podziału trioleina-woda

LD_{50} – (*ang. lethal dose*) dawka śmiertelna wywołująca śmierć 50% badanej populacji

LZO – lotne związki organiczne

MIF – (*ang. maximum induction factor*) maksymalny współczynnik indukcji

MX – 3-chloro-4-(dichlorometylo)-5-hydroksy-2(5h)-furanon

ONPG – orto-nitrofenylo- β -galaktozyd

PCB – polichlorowane bifenyle

PCDDs – polichlorowane dibenzo-p-dioksyny

PCDFs – polichlorowane dibenzofurany

PCO – pestycydy chloroorganiczne

POCIS – (*ang. polar organic chemicals integrative Sampler*) zintegrowany próbnik polarnych związków organicznych

PRC – (*ang. performance reference compounds*) wydajnościowe związki odniesienia

SPMD – (*ang. semipermeable membrane devices*) urządzenie z membrana półprzepuszczalną

TCDD – 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioksyna

THM – trihalometany

TU – (*ang. toxic unit*) jednostka toksyczna

TZO – trwale zanieczyszczenia organiczne

UPD – uboczne produkty dezynfekcji

WHO – (*ang. World Health Organization*) Światowa Organizacja Zdrowia

WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

ZUW – zakład uzdatniania wody

WSTĘP

Woda przeznaczona na cele konsumpcyjne nie tylko musi być pozbawiona szkodliwych substancji, ale też powinna zawierać składniki korzystne dla zdrowia. Dlatego wymagania w stosunku do jej jakości niezmiennie rosną (Gromiec i in., 2014; WHO, 2011). Na jakość zdrowotną wody wodociągowej wpływa zarówno jej czystość mikrobiologiczna, jak i rodzaj oraz ilość obecnych w niej związków chemicznych. Wśród chorób wywoływanych spożyciem zanieczyszczonej wody dominują te powodowane przez patogenne drobnoustroje, jednak ostatnimi czasy obserwuje się rosnącą ilość chorób występujących na skutek działania chemicznych mikrozanieczyszczeń antropogenicznych, pochodzących głównie z przemysłu i rolnictwa (Gromiec i in., 2014). Ze względu na toksyczny i mutageny potencjał związki te mogą stanowić zagrożenie dla konsumentów. Jednakże wpływ mikrozanieczyszczeń na zdrowie człowieka jest trudny do jednoznacznej interpretacji, ponieważ choroby które wywołują, często ujawniają się dopiero po wielu latach narażenia (Cantor, 1997; Cantor, 2008, Sciacca i in., 2009).

W celu zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego konieczne jest przeprowadzanie procesów uzdatniania wody przeznaczonej na cele spożywcze (Kowal i in., 2007). Niestety, nie wszystkie szkodliwe związki chemiczne udaje się podczas nich usunąć. Co więcej, podczas procesu dezynfekcji wody powstają produkty uboczne o potencjale toksycznym lub genotoksycznym (Alloula, 2014; Fan i in., 2014; Farré i in., 2013, Guzella i in., 2004; Guzella i in. 2006; Jin i in., 2016; Nawrocki, 2005; Richardson, 2003, Rincón-Bedoya i in., 2013). W związku z tym, proces dezynfekcji wody przeznaczonej do spożycia powinien być dokładnie kontrolowany. Stale ulepszane metody oczyszczania wody poprzez modyfikowanie procesów i usprawnianie układów technologicznych niestety nie zapewniają całkowitego utrzymania stabilności chemicznej i biologicznej wody wprowadzanej do sieci wodociągowej (Kowal i in., 2007). Powoduje to, że jakość wody u odbiorcy jest często gorsza niż jakość wody wprowadzanej do sieci wodociągowej, gdyż może ona ulec wtórnemu zanieczyszczeniu w systemie dystrybucji (Rosenmai i in., 2018).

Dużym wyzwaniem jest fakt, że choć już nawet niewielka ilość mikrozanieczyszczeń powoduje poważne konsekwencje, to ich detekcja przy niskich stężeniach jest niezwykle trudna. Konieczne jest więc dopasowanie techniki pozwalającej na zateżnienie obecnych w próbkach środowiskowych mikrozanieczyszczeń, tak aby były wykrywalne podczas analiz chemicznych i biologicznych. Obecny "wąskim gardłem" przy wykonywaniu testów

biologicznych są właśnie problemy z zaniezieniem związków, które mają być poddane analizom. Wszystkie czynności związane z etapem przygotowania próbki w istotny sposób mogą wpłynąć na końcowy wynik analizy, dlatego dobór właściwej metody poboru jest niezwykle ważny. Klasyczne metody wymagają transportu dużych ilości wody z miejsca poboru do laboratorium, co stwarza problemy logistyczne. Powoduje to, iż w ostatnich latach zwiększyła się popularność próbników pasywnych, w tym urządzeń zawierających membranę półprzepuszczalną (*ang. Semipermeable Membrane Devices- SPMDs*), które umożliwiają koncentrację mikrozanieczyszczeń już w miejscu poboru próbek (Alvarez, 2013; Chepchir i in., 2017; Cranor i in., 2005; Ellis i in., 2008, Esteve-Turrillas i in., 2008; Kim i in., 2014, Lu i in., 2002, Marrucci i in., 2013; Miège i in., 2015; Vrana i in., 2005).

Wykrycie oraz identyfikacja substancji obecnych w wodzie wodociągowej w oparciu o analizę chemiczną jest kosztowna i wymaga zastosowania nowoczesnych technik analitycznych. Ponadto, sama analiza chemiczna nie powinna być podstawą do prognozowania biologicznych skutków, jakie mikrozanieczyszczenia mogą wywoływać u organizmów żywych. Stąd też istnieje konieczność zastosowania w kontroli jakości środowiska wodnego, obok metod analitycznych, badań bioindykacyjnych. W badaniach tych kluczową pozycję zajmują bakteryjne testy krótkoterminowe *in vitro* (Alexopoulos i in., 1999; Halmi i in., 2014; Han i in., 2016; Ke i in., 2007; Kusamran i in., 2003; Lah i in., 2005; Macova i in., 2011; Traczewska, 2002; Žegura i in., 2009).

Powstało wiele prac na temat możliwości zastosowania urządzeń z membraną półprzepuszczalną w środowisku wodnym (Moring, 1997; Paulik i in., 2016; Vrana i in., 2005; Vrana i in., 2002; Wang i in., 2016; Wang i in., 2014; Zimmerman i in., 2000), natomiast brakuje literatury opisującej zastosowanie SPMD w przypadku monitoringu wody przeznaczonej do spożycia oraz możliwości ich zastosowania w zakładach uzdatniania wody. Co więcej, istnieje tylko kilka prac opisujących zmiany stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz pestycydów chloroorganicznych na różnych etapach uzdatniania wody (Gilli i in., 2005; Nowacka i in., 2013; Nowacka i in., 2014; Nowacka i in., 2015a; Nowacka i in., 2015b; Kong i in., 2016; Rad i in., 2017; Valičková i in., 2013;). W związku z powyższym postanowiono w tym kierunku przeprowadzić badania, które opisano w niniejszej rozprawie.

1. MIKROZANIECZYSZCZENIA W ŚRODOWISKU WODNYM

Postępująca industrializacja wpływa na coraz większą degradację środowiska, w tym środowiska wodnego, do którego przedostaje się coraz więcej mikrozanieczyszczeń. Migracja w środowisku oraz długa żywotność powodują, że obecność mikrozanieczyszczeń stwierdza się także na obszarach niezagospodarowanych przez człowieka. Wody powierzchniowe charakteryzują się zdecydowanie większym poziomem zanieczyszczeń w stosunku do podziemnych, jednak niepokojące jest, że problem coraz szerzej dotyka również tych drugich. Obecność mikrozanieczyszczeń zakłóca równowagę biologiczną i hamuje procesy samooczyszczania wód (Świdarska-Bróz, 1993).

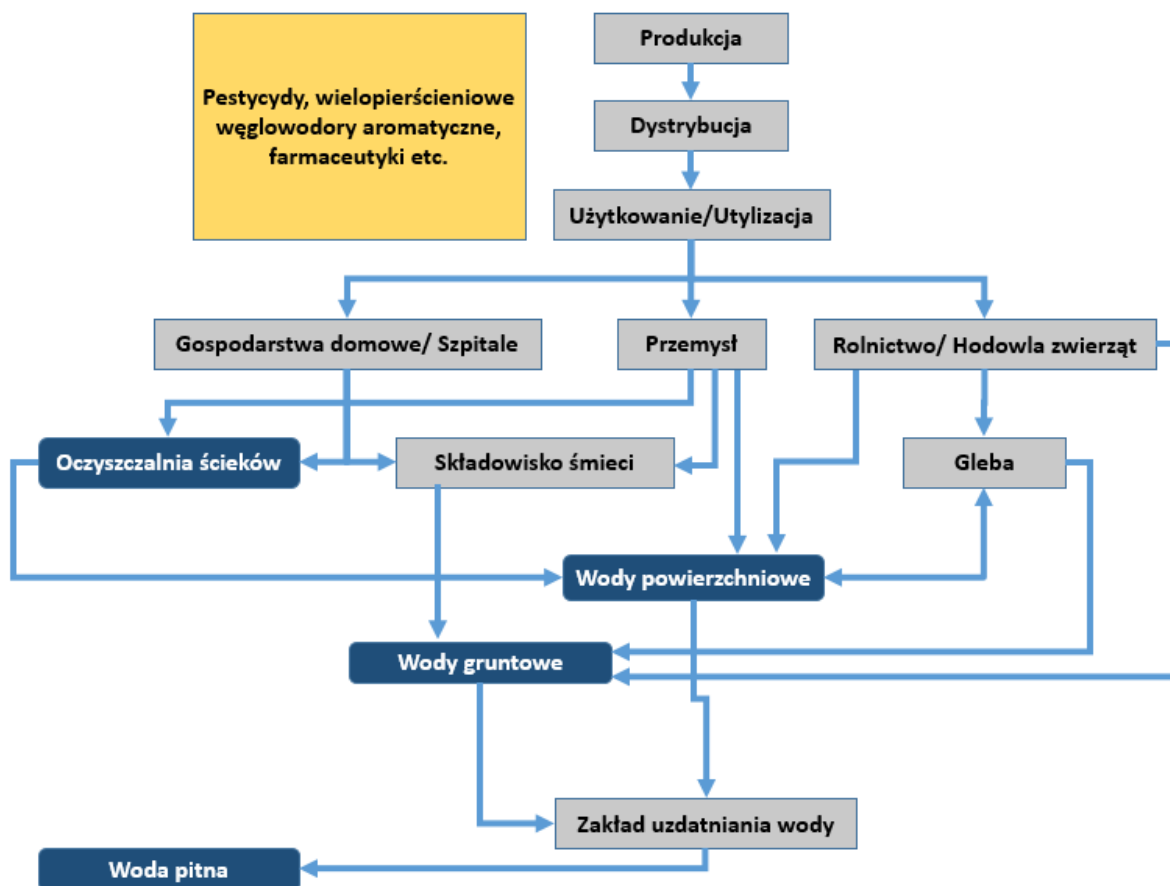
Mikrozanieczyszczenia mogą występować w środowisku wodnym w ilościach od śladowych do znaczących. Jednakże, nawet w niskich stężeniach nie należy ich lekceważyć, ponieważ zdecydowana większość z nich może być bezpośrednio lub pośrednio szkodliwa dla organizmów żywych, a poprzez bioakumulację w tkance tłuszczowej po długotrwałej ekspozycji osiągać niebezpieczne stężenia (Achour i in., 2017; Amdany i in., 2014; Guan i in., 2017).

1.1. ŹRÓDŁA MIKROZANIECZYSZCZEŃ W WODZIE

Do głównych źródeł mikrozanieczyszczeń w wodach naturalnych należą: opady atmosferyczne ciekłe i stałe, ścieki oraz spływy obszarowe. Wody powierzchniowe w porównaniu do wód podziemnych są bardziej bezpośrednio i w zdecydowanie większym stopniu narażone na skutki migracji mikrozanieczyszczeń. Naturalną barierę przed wnikaniem mikrozanieczyszczeń do wód podziemnych stanowią gleba i warstwa wodonośna, a także przebiegające w nich procesy samooczyszczania. Za te procesy należy uznać filtrację, sorpcję, wymianę jonową, strącanie i współstrącanie, a także naturalny rozpad i zjawiska biochemicznego rozkładu. Wszystkie te procesy przyczyniają się do zmniejszenia stężenia tych związków, a także opóźnienia szybkości migracji, co dotyczy przede wszystkim mikrozanieczyszczeń, które ulegają sorpcji. Jednakże w przypadku wysokiego poziomu zanieczyszczeń gleby i warstwy wodonośnej, skutki migracji będą obserwowane po znacznie krótszym czasie.

Mikrozanieczyszczenia przedostają się do wód powierzchniowych wraz z opadami atmosferycznymi, opadami stałymi, ściekami oraz ze spływami obszarowymi z powierzchni zlewni. Stężenia mikrozanieczyszczeń są funkcją wielkości i zanieczyszczenia opadów

atmosferycznych, poziomu uprzemysłowienia i zaludnienia zlewni, ładunku zanieczyszczeń wymytych i spłukiwanych ze zlewni oraz wprowadzonych do wód ze ściekami. Do wód powierzchniowych mikrozanieczyszczenia trafiają głównie w postaci rozpuszczonej (tak jak w przypadku wód podziemnych) oraz w postaci asocjatów z ciałami stałymi spłukanymi ze zlewni. Źródła i drogi przemieszczania się mikrozanieczyszczeń w środowisku wodnym przedstawiono na Rysunku 1.



Rys. 1. Źródła i drogi przemieszczania się mikrozanieczyszczeń w środowisku wodnym (Pathak i in., 2020)

Stężenia mikrozanieczyszczeń w wodach powierzchniowych oraz podziemnych są wprost proporcjonalne do poziomu zanieczyszczeń obszaru, na którym się znajdują. Należy jednak mieć na uwadze, że ze względu na dużą trwałość w środowisku, mikrozanieczyszczenia mogą migrować na znaczne odległości, w związku z czym, ich obecność stwierdza się również na terenach niezagospodarowanych przez człowieka (Świdarska-Bróż, 1993).

1.2. RODZAJE MIKROZANIECZYSZCZEŃ

Główny podział mikrozanieczyszczeń obecnych w wodzie wyróżnia dwie grupy: organiczne i nieorganiczne. W wodach powierzchniowych ujmowanych na cele komunalne zidentyfikowano ponad dwa tysiące związków organicznych, do których zalicza się naturalne związki organiczne (stanowiące pozostałości przemian chemicznych i biologicznych związków obecnych w biomase organizmów wodnych i ich metabolitów) a także związki organiczne pochodzenia antropogenicznego, w tym substancje szczególnie uciążliwe dla środowiska, odporne na biodegradację, takie jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), pestycydy chloroorganiczne (PCO), polichlorowane bifenyle (PCB), dibenzofurany (PCDFs) i dibenzo-p-dioksyne (PCDDs) (Fawell i in. 2007; Świdarska-Bróż 1993).

Do grupy mikrozanieczyszczeń nieorganicznych, występujących w środowisku wodnym, zalicza się przede wszystkim metale ciężkie oraz przedostające się z powietrza radionuklidy, występujące w popiołach lotnych emitowanych z elektrowni spalających węgiel brunatny.

W przypadku wód poddawanych uzdatnianiu, stosuje się dodatkowo podział na mikrozanieczyszczenia pierwotne (obecne w wodzie przed procesami uzdatniania, których nie udało się usunąć) oraz wtórne (powstające jako produkty metabolizmu związków pierwotnych lub uboczne produkty dezynfekcji). Grupa mikrozanieczyszczeń wtórnych obejmuje wiele związków chloro- i bromoorganicznych, w tym trihalometany, stanowiące szczególne zagrożenie.

1.2.1. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) to grupa niebezpiecznych związków organicznych, które charakteryzują się tendencją do bioakumulacji i długim okresem półtrwania w środowisku. Składają się z dwóch lub więcej skondensowanych pierścieni aromatycznych bez podstawników, związanych w układzie liniowym, skupionym lub kątowym. Większość z nich występuje w postaci bezbarwnych, białych lub jasnożółtych ciał stałych (Rengarajan i in., 2015). Za trzy główne rodzaje źródeł WWA w środowisku uznaje się: pirogeniczne, petrogeniczne i biologiczne. Pirogeniczne WWA powstają w wyniku niepełnego spalania materiałów organicznych (np. węgla, drewna, oleju) w wysokiej temperaturze i w warunkach pirolitycznych. Petrogeniczne WWA tworzą się w wyniku przetwórstwa ropy naftowej. Za WWA pochodzenia biologicznego uznaje się te, powstałe w wyniku syntezy przez

niektóre bakterie i rośliny lub powstałe podczas rozkładu materii organicznej (Abdel-Shafy i in., 2016).

WWA są w większości emitowane przez przemysł petrochemiczny, ciepłownie, przetwórstwo węgla, ogrzewanie domów węglem i olejami opałowymi, a także ruch drogowy (Uher i in., 2016). Szacuje się, że w Polsce ponad 80% obecnych w powietrzu WWA pochodzi ze spalania paliw kopalnych, ale istotną rolę w procesie ich powstawania odgrywają także transport oraz przemysł energetyczny i produkcyjny, ze szczególnym uwzględnieniem produkcji asfaltu.

Człowiek nigdy celowo nie syntetyzował wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Pojawiają się one w środowisku jako niepożądane produkty uboczne działalności antropogenicznej. Istnieją jednak również celowe zastosowania WWA, chociażby jako związki pośredniczące w produkcji farmaceutyków, produktów fotograficznych lub rolniczych, materiałów smarujących i tworzyw termoutwardzalnych (Abdel-Shafy i in., 2016).

Oprócz wspomnianych, istnieją także naturalne źródła WWA, do których należą pożary lasów, wulkany, erozja skał osadowych zawierających węglowodory ropopochodne, wydobywanie gazu ziemnego, procesy rozpadu oraz procesy metaboliczne niektórych mikroorganizmów glebowych i alg morskich. Jednakże poziom WWA powstających w procesach naturalnych jest wielokrotnie niższy niż zanieczyszczeń generowanych w wyniku działalności człowieka (Abdel-Shafy i in., 2016; Sadowska i in., 2000). Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne wytwarzane są również podczas spalania drzew, szczególnie iglastych, palenia tytoniu, a także w trakcie obróbki termicznej żywności, np. podczas wędzenia, grillowania i smażenia. Do żywności mogą przedostawać się również przez wodę, glebę i powietrze. Oznacza to, że WWA trafiają do organizmu nie tylko drogą oddechową. W Polsce średnia dzienna dawka WWA pobierana wraz z żywnością wynosi 3078 ng, podczas gdy dla krajów UE to 1729 ng (Rusin i in. 2014). Pewne grupy zawodowe są szczególnie narażone na WWA z racji wykonywanej pracy, np. hutnicy aluminium, pracownicy rafinerii ropy naftowej, robotnicy pracujący przy piecach koksowniczych, w odlewniach stali oraz pracownicy zajezdni autobusowych.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, ze względu na niską rozpuszczalność i wysokie powinowactwo do cząstek stałych, rzadko występują w wodzie w wysokich stężeniach, natomiast mogą przedostać się do środowiska wodnego przez ścieki komunalne i przemysłowe, wycieki oleju lub opady atmosferyczne (mokre oraz suche osadzanie się cząstek

i oparów). Ponadto mogą być wyflukiwane przez wody deszczowe z nawierzchni dróg i zanieczyszczonej spalinami atmosfery (Sadowska i in., 2000). Głównym źródłem zanieczyszczenia WWA w wodzie wodociągowej są rury wykonane ze smoły węglowej lub powłoki bitumiczne w komunalnych systemach doprowadzania wody, używane do ochrony rur przed korozją (Sciacca i in., 2009).

Obecne w środowisku wodnym WWA ulegają naturalnym procesom degradacji w wyniku utleniania chemicznego, fotooksydacji, rozkładu z udziałem bakterii i grzybów oraz transformacji biologicznej dokonywanej przez bakterie, grzyby i zwierzęta. Stopień degradacji zależy od rodzaju mikrozanieczyszczeń, obecności utleniaczy oraz warunków świetlnych.

Niektóre wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne uznane są za czynniki mutagenne lub teratogenne, w związku z czym stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia organizmów żywych, w tym ludzi (Abdel-Shafy i in., 2016; Igwe i in., 2015; Rengarajan i in., 2015; Sadowska i in., 2000; Srogi 2007; Sun i in., 2017). WWA są jednym z najsilniejszych czynników rakotwórczych w środowisku. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC- *ang. International Agency for Research on Cancer*) klasyfikuje poszczególne WWA jako:

- rakotwórcze dla człowieka (grupa 1),
- prawdopodobnie rakotwórcze dla człowieka (grupa 2A),
- możliwie rakotwórcze dla człowieka (grupa 2B),
- niezaklasyfikowane jako rakotwórcze dla człowieka (IARC, 2010).

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) za najgroźniejsze uznała sześć następujących WWA: benzo(a) piren (BaP), benzo(k)fluoranten (BkF), benzo(b)fluoranten (BbF), fluoranten (Fl), indeno(1,2,3-c,d)piern (IP) oraz benzo(g,h,i)perylene (BghiP). Warto zauważyć, że związki te mogą nabywać właściwości rakotwórczych dopiero w wyniku aktywacji metabolicznej w żywych organizmach. Obserwuje się nowotwory skóry, wątroby, płuc, nerek będące efektem ekspozycji na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (Franco i in., 2003). Najbardziej znanym spośród WWA jest benzo(a)piren. Związek ten może przedostać się do organizmu zarówno przez układ oddechowy podczas palenia lub wdychania zanieczyszczonego powietrza atmosferycznego, jak i przez przewód pokarmowy z jedzeniem i wodą (Rengarajan i in., 2015).

W wodzie wodociągowej najczęściej występującym wielopierścieniowym węglowodorem aromatycznym jest fluoranten (WHO, 2011). Zgodnie z zaleceniami Światowej

Organizacji Zdrowia stężenie sześciu najgroźniejszych WWA w wodach powierzchniowych nie powinno przekraczać 200 ng/L, a benzo(a)pirenu 10 ng/L. W słabo zanieczyszczonych wodach powierzchniowych suma ich stężeń powinna mieścić się w przedziale 50-250 ng/L, natomiast w silnie zanieczyszczonych wodach powierzchniowych osiąga wartości 1000 ng/L. Suma stężeń WWA w niezanieczyszczonych wodach gruntowych zwykle mieści się w zakresie 0–5 ng/L, natomiast w zanieczyszczonych mogą przekraczać 10 µg/L. Typowy zakres sumy stężeń WWA w wodzie przeznaczonej do spożycia wynosi około od 1 do 11 ng/L (WHO, 2011).

1.2.2. Pestycydy

Pestycydy to grupa związków chemicznych używanych do niszczenia owadów (insektycydy), chwastów (herbicydy), grzybów (fungicydy), bakterii (bakteriocydy) oraz gryzoni (rodentocydy). Większość pestycydów ma zdolność niszczenia szerokiej gamy organizmów, ale niektóre są opracowywane przeciwko określonym szkodnikom lub patogenom. Działanie tych związków polega na zakłócaniu fizjologicznej aktywności organizmu docelowego, prowadząc do dysfunkcji i obniżonej witalności.

Właściwości pestycydów, takie jak wysoka lipofilowość, bioakumulacja, długi okres półtrwania i potencjał transportu na dalekie odległości, zwiększają ryzyko zanieczyszczenia powietrza, wody i gleby, nawet po wielu latach od zastosowania. Badanie przeprowadzone przez Pimentel'a wykazało, że tylko niewielki procent (0,3%) stosowanych pestycydów trafia do szkodnika docelowego, podczas gdy 99,7% trafia do środowiska (Pimentel, 1995). Według badania Światowej Organizacji Zdrowia 80% wszystkich pestycydów jest wykorzystywanych przez kraje rozwijające się (Veil, 1990).

Nadużywanie lub niewłaściwe stosowanie pestycydów wpływa niekorzystnie na stan środowiska. Pestycydy mają negatywny wpływ na wiele gatunków wodnych i lądowych, zwłaszcza poprzez dużą zdolność do akumulacji w tkance tłuszczowej. Mieszkańcy ekosystemów wodnych, takie jak mikroorganizmy, bezkręgowce, rośliny i ryby są szczególnie narażone na działanie pestycydów (Castillo i in., 2006; De Lorenzo i in., 2001; Frankart et al., 2003; Grande i in., 1994; Liess i in., 2005).

Organochloryny to grupa związków chlorowanych szeroko stosowanych jako pestycydy, które należą do klasy szczególnie uciążliwych zanieczyszczeń organicznych o wysokiej trwałości w środowisku. Insektycydy bazujące na organochlorynach były

z powodzeniem stosowane w zwalczaniu malarii i tyfusu, ale zostały zakazane w większości krajów rozwiniętych (Aktar i in., 2009). Statystyki przeglądowe dotyczące wykorzystywanie różnych pestycydów pokazują, że 40% wszystkich stosowanych pestycydów należy do klasy chemikaliów chloroorganicznych (Gupta, 2004). Ze względu na niski koszt i potrzebę zwalczania różnych szkodników, insektycydy chloroorganiczne, takie jak dichlorodifenylotrichloroetan (DDT), heksachlorocykloheksan (HCH), aldryna i dieldryna należą do najczęściej stosowanych pestycydów w rozwijających się krajach Azji (Gupta, 2004; Lallas, 2001).

Podstawowymi cechami pestycydów chloroorganicznych są wysoka trwałość, niska polarność, niska rozpuszczalność w wodzie oraz wysoka rozpuszczalność w tłuszczach i rozpuszczalnikach organicznych. Pestycydy chloroorganiczne mogą przedostać się do środowiska miejscowo, w związku z ich powszechnym stosowaniem oraz poprzez zanieczyszczone odpady wyrzucane na wysypiska i zrzuty z jednostek przemysłowych, które syntetyzują te związki chemiczne. Jedną z podstawowych cech organochloryn jest ich trwałość, definiowana jako okres półtrwania w wodzie dłuższy niż dwa miesiące lub sześć miesięcy w osadach glebowych. Pestycydy chloroorganiczne mogą przylegać do gleby i powietrza, zwiększając w ten sposób szanse na wysoką trwałość w środowisku i są identyfikowane jako czynniki chronicznego narażenia dla zwierząt i ludzi. (Jayaraj i in., 2016).

Najczęściej stosowanym pestycydem w praktyce rolniczej jest dichlorodifenylotrichloroetan (DDT), który jest uznawany za umiarkowanie niebezpieczny, charakteryzuje się wysoką stabilnością i okresem półtrwania 2–15 lat (Augustijn-Beckers i in., 1994). Stosowanie DDT jest obecnie zabronione przez wiele państw, ale niestety w wielu krajach rozwijających się zakaz ten jest łamany poprzez nielegalne jego stosowanie. Dotyczy to również endosulfanu, insektycydu, który jest wysoce niebezpieczny. Jego okres półtrwania wynosi pięćdziesiąt dni. Powszechnie wykorzystuje się go przy produkcji orzechów nerkowca (Quijano, 2002).

Pestycydy chloroorganiczne są grupą zanieczyszczeń spotykaną zarówno w wodach powierzchniowych jak i płytkich wodach gruntowych (na wsiach będących częstym źródłem wody do picia), a rzadziej głębinowych. Czas przebywania pestycydów w środowisku wodnym jest różny i zależy od ich trwałości. Stwierdzono istnienie korelacji między czasem występowania maksymalnych stężeń pestycydów w wodach powierzchniowych a okresem wzmożonych czynności agrochemicznych oraz spływu wód roztopowych, będących głównym

sposobem transportu w większości trudno rozpuszczalnych pestycydów. Ponadnormatywne ilości pestycydów muszą być usuwane z wody przeznaczonej na cele spożywcze.

Z właściwego i racjonalnego stosowania pestycydów płyną bezsprzeczne korzyści, w tym przede wszystkim zwiększenie efektywności produkcji zwierzęcej i roślinnej. Wydaje się więc, że obecnie niemożliwe jest całkowite wyeliminowanie tych środków ochronnych z produkcji rolniczej. Niestety, pozostałości pestycydów mogą stanowić istotne źródło zanieczyszczenia czynników środowiskowych, takich jak powietrze, woda i gleba.

Wśród dróg narażenia ludzi na działanie pestycydów wymienia się: wdychanie powietrza, spożycie żywności i wody oraz wchłanianie przez skórę. Główną drogą narażenia na te substancje jest żywność, ze względu na zwielokrotnienie ich ilości na każdym kolejnym poziomie łańcucha pokarmowego. Szacuje się, że ponad 90% spożycia pestycydów następuje z pożywieniem (Gourounti i in., 2008). Ponieważ związki te są dobrze rozpuszczalne w tłuszczach, najwyższy ich poziom stwierdza się w rybach, mięsie i nabiale. Inną drogą narażenia jest długotrwała i regularna absorpcja przez skórę produktów kosmetycznych zawierających związki chloroorganiczne. Ze względu na wysoką rozpuszczalność w tłuszczach i powolny rozkład, związki chloroorganiczne ulegają bioakumulacji w ludzkim organizmie i mogą być wykrywane w tkance tłuszczowej, krwi oraz mleku kobiet karmiących. Pomiar obciążenia organizmu związkami chloroorganicznymi i ich metabolitami są dobrymi wskaźnikami narażenia i pomagają w ustaleniu związku między narażeniem a skutkami zdrowotnymi.

Zaobserwowano, że u wegetarian stwierdza się znacznie niższy poziom pestycydów w porównaniu z osobami spożywającymi produkty pochodzenia zwierzęcego. Ponadto mieszkańcy krajów rozwiniętych (Ameryka Północna i Europa Zachodnia) mają ich niższy poziom niż mieszkańcy krajów rozwijających się, prawdopodobnie odzwierciedlając różnice w narażeniu (Gourounti i in., 2008). Na negatywne skutki działania pestycydów są narażeni przede wszystkim ludzie zawodowo związani z ich produkcją, magazynowaniem oraz dystrybucją, a także rolnicy. Niepokojący jest fakt, że niektóre badania wykazują powiązanie pomiędzy ekspozycją rodziców na pestycydy a występowaniem nowotworów u ich dzieci.

Rosną obawy, że związki chloroorganiczne wywierają wiele toksycznych skutków dla zdrowia populacji ludzi i dzikich zwierząt. Efekty toksyczne obserwowane u ludzi obejmują zaburzenia w układzie rozrodczym kobiet i mężczyzn, bezpłodność, powstawanie nowotworów, toksyczność rozwojową, neurotoksyczność i immunotoksyczność. Dioksyny,

a zwłaszcza TCDD, są znanymi czynnikami rakotwórczymi dla ludzi. Większość efektów, które wywołują, może wynikać ze zdolności tych związków do zmiany poziomu niektórych hormonów, enzymów, czynników wzrostu oraz neuroprzekaźników (Gourounti i in., 2008).

1.2.3. Chlorowane związki organiczne

Spośród bardzo dużej liczby chlorowanych związków organicznych (ChZO) najdokładniej zostały zbadane polichlorowane bifenyle, które występują w środowisku na skutek działalności gospodarczej człowieka. Ich obecność stwierdza się przede wszystkim w wodach powierzchniowych, jednakże coraz częściej wykrywane są również w wodach podziemnych (Świdarska-Bróz, 1993).

Polichlorowane bifenyle są syntetycznymi produktami chlorowania bifenylu. Do grupy PCB zalicza się 209 związków o różnej liczbie (1-10) i rozmieszczeniu atomów chloru w pierścieniach aromatycznych. PCB zostały po raz pierwszy zsyntetyzowane w laboratorium w 1881 r. Zaczęto je masowo produkować do użytku komercyjnego w 1929 r. Polichlorowane bifenyle są powszechnie stosowane w kondensatorach (np. lamp jarzeniowych), transformatorach, wymiennikach ciepła, jako płyny hydrauliczne, oleje smarowe, plastyfikatory farb, klejów, kitów oraz tworzyw sztucznych. Osoby związane zawodowo z wytwarzaniem produktów tego typu są więc szczególnie narażone na działanie PCB (Gourounti i in., 2008; Sadowska i in., 2000).

PCB stanowią trwale zanieczyszczenia organiczne (TZO lub POPs, z ang. *persistent organic pollutants*) ze względu na ich stabilność chemiczną, lipofilowość, a co za tym idzie zdolność do bioakumulacji w środowisku. Z tego powodu i ze względu na ich potencjalny szkodliwy wpływ na ludzi i dziką przyrodę, ich produkcja i wykorzystanie są zakazane lub surowo ograniczone w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Europie Zachodniej od późnych lat 70 (Gourounti i in., 2008).

W środowisku wodnym stwierdzono obecność około 60 związków z grupy polichlorowanych bifenyli. Ze względu na niską rozpuszczalność w wodzie i łatwość sorpcji na cząstkach stałych, ich stężenia w wodzie są zazwyczaj niskie. W wodzie najczęściej stwierdza się obecność 3- i 4-chlorodifenyli, natomiast w zawiesinach, osadzie dennym oraz organizmach wodnych najczęściej występują 5-, 6- oraz 7-chlorodifenyly. Ze względu na dużą lotność oraz podatność na degradację związki zawierające jeden lub dwa atomy chloru właściwie nie występują w środowisku wodnym (Kracik i in., 2013).

Do zanieczyszczenia środowiska wodnego przez PCB dochodzi przede wszystkim na skutek zrzutu ścieków przemysłowych. Okres półtrwania polichlorowanych bifenyli w środowisku jest długi, ponieważ tylko w niewielkim stopniu ulegają biodegradacji. Ich podatność na biodegradację maleje wraz ze wzrostem liczby atomów chloru w cząsteczce. Ponadto, ze względu na hydrofobowy charakter odkładają się w tkance tłuszczowej organizmów żywych, co prowadzi do akumulacji tych związków w łańcuchu pokarmowym. Narażenie człowieka na PCB jest spowodowane ich obecnością w powietrzu (poprzez skórę i układ oddechowy) a także w pożywieniu i wodzie do picia.

Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) zaklasyfikowała polichlorowane bifenyly jako substancje rakotwórcze, nie mniej jednak stopień ich szkodliwości jest jednak zróżnicowany w zależności od rodzaju PCB. Polichlorowane bifenyly ulegają przemianom w środowisku, w związku z czym, w zależności od panujących warunków, mogą przekształcić się w związki mniej lub bardziej toksyczne. Ekspozycja na PCB może skutkować zwiększeniem zachorowalności na nowotwory trzustki, czerniaka skóry oraz prowadzić do zaburzeń hormonalnych. Związki grupy polichlorowanych bifenyli wykazują aktywność immunosupresyjną, co oznacza obniżenie odporności organizmu, a w konsekwencji zwiększenie podatności na infekcje, szczególnie grzybicze i wirusowe (Sadowska i in., 2000).

Oprócz polichlorowanych bifenyli w wodach powierzchniowych występują również inne związki należące do chlorowanych związków organicznych (ChZO), w tym 1,4-dichlorobenzen oraz tetrachloroeten. Niektóre chlorowane związki organiczne cechują się dużą trwałością oraz wysoką rozpuszczalnością, w związku z czym mogą przenikać do wód podziemnych. Wśród nich dominują di-, tri- oraz tetrachloroeten, dichlorobenzen, alkilobenzeny oraz izomery p-nonylofenolu.

Kolejną grupą ChZO, które mogą występować zarówno w wodach powierzchniowych jak i podziemnych są trihalogenometany (trihalometany, THM-y) „pierwotne”. Ich źródłem mogą być m.in. ścieki poddawane chlorowaniu. Ich stężenia są zwykle odwrotnie proporcjonalne do natężenia przepływu wody. Najwyższe stężenia THM-ów stwierdza się zwykle w wodach rzek przepływających przez wysoko uprzemysłowane obszary (Świdarska-Bróz, 1993).

1.2.4. Uboczne produkty dezynfekcji wody

Podczas uzdatniania wody przeznaczonej na cele konsumpcyjne niezbędne jest zastosowanie dezynfekcji w celu wyeliminowania zagrożenia mikrobiologicznego. Dezynfekcja wody metodami chemicznymi polega na dawkowaniu do niej silnych utleniaczy, dlatego też podczas dezynfekcji wód zawierających związki organiczne i nieorganiczne równoległe do tego procesu przebiegają procesy przemiany związków organicznych i nieorganicznych. Niestety, stosowane środki dezynfekujące (najczęściej chlor, ditlenek chloru lub ozon) mogą reagować z obecnymi w wodzie związkami chemicznymi, co może prowadzić do powstania wielu innych niebezpiecznych substancji, określanych jako uboczne produkty dezynfekcji (UPD).

Ze względu na wysoką skuteczność i niski koszt najbardziej rozpowszechnioną metodą dezynfekcji wody jest chlorowanie za pomocą chloru gazowego. Najlepiej poznana grupa ubocznych produktów chlorowania są trihalometany (THM). Przy ich tworzeniu powstaje szereg innych związków chloroorganicznych (np. chlorofenole), co wpływa znacząco na pogorszenie właściwości organoleptycznych wody. Proces ich tworzenia trwa do momentu wyczerpania jednego ze składników reakcji: chloru lub substancji organicznej. Im gorsza jest jakość wody poddawanej dezynfekcji chlorem, tym więcej może powstawać szkodliwych trihalometanów (Nawrocki 2005; Zbieć i in., 1999).

W procesie dezynfekcji zamiast chloru gazowego coraz częściej stosuje się ditlenek chloru. Pozwala on wyeliminować tworzenie się szkodliwych trihalometanów. Wadą stosowania dwutlenku chloru jest ryzyko powstawania chloranów i chlorynów.

Alternatywą lub uzupełnieniem dezynfekcji wody z wykorzystaniem chloru i jego związków jest zastosowanie ozonu. Ozon jako czynnik dezynfekujący stosuje się wówczas, gdy zawodzi chlorowanie z powodu tworzenia chlorowych pochodnych związków organicznych lub związków nadających wodzie smak i zapach. Ozonowanie wyraźnie poprawia właściwości organoleptyczne spożywanej wody. Ozon utlenia obecne w wodzie mikrozanieczyszczenia, zarówno nieorganiczne jak i organiczne. Proces ozonowania wód jest przyczyną utleniania jednego z naturalnych ich składników, tj. bromków, w wyniku czego powstają bromiany. Na podstawie badań toksykologicznych zostały one zakwalifikowane do potencjalnych kancerogenów, czyli do związków zwiększających ryzyko zachorowania na nowotwory (Nawrocki 2005; Zbieć i in., 1999). Znaczącą wadą ozonu, jako dezynfektanta jest jego mała trwałość, w związku z czym ozonowana woda pozostaje aseptyczna jedynie przez krótki czas.

Uboczne produkty dezynfekcji wody mogą charakteryzować się właściwościami toksycznymi, mutagennymi oraz kancerogennymi (McGregor 1987; Kenneth 210; Zbec i in., 1999). Przy stosowaniu chloru cząsteczkowego lub związków chloru powstają substancje chloroorganiczne o właściwościach genotoksycznych (Koivusalo 1998). Do związków uznawanych za mutagenne zalicza się m.in.: 3-chloro-4(dichlorometylo)-5-hydroksy-2(5H)-furanon (MX), bromoetan, dibromoetan, bromochloroacetonitryl, dichloroacetonitryl, 1-bromobutan, bromochlorometan, bromodichlorometan, 1,2,-dichloroetan, bromoform. Z kolei ozon, powoduje utlenienie złożonych związków organicznych i powstawanie nowych szkodliwych substancji.

Konieczne są dalsze badania w celu określenia efektów działania ubocznych produktów dezynfekcji wody. Jednakże niezależnie od tego powinno się dążyć do zmniejszania ich stężenia w wodzie. Należy jednak mieć na uwadze, że podejmowane działania nie powinny zmniejszać skuteczności dezynfekcji wody.

1.3. USUWANIE MIKROZANIECZYSZCZEŃ Z WODY

Jednym ze sposobów przenoszenia szkodliwych mikrozanieczyszczeń do organizmu człowieka jest ich zagęszczanie w łańcuchu pokarmowym. Ponadto mówiąc o całkowitej ilości mikrozanieczyszczeń wchłanianych przez człowieka drogą pokarmową należy uwzględnić również ilości spożywane wraz z wodą. W celu zminimalizowania zagrożeń dla zdrowia człowieka, niezbędne jest, aby w maksymalnym stopniu usuwać mikrozanieczyszczenia z wody przeznaczonej do spożycia.

Mikrozanieczyszczenia występujące w wodzie uzdatnionej można podzielić na dwie grupy: pierwotne oraz wtórne. Te, które były obecne w wodzie jeszcze przed procesami uzdatniania, a których nie udało się usunąć w ich trakcie, określane są jako zanieczyszczenia pierwotne, natomiast te powstające jako produkty metabolizmu związków pierwotnych lub uboczne produkty dezynfekcji określane są mianem mikrozanieczyszczeń wtórnych. Należy podkreślić, że zarówno jedne jak i drugie nie pozostają bez wpływu na zdrowie konsumenta wody.

W źródłach wody przeznaczonej na cele komunalne, stężenia mikrozanieczyszczeń podlegają różnym wahaniom. W przypadku, gdy są one wyższe niż dopuszczalne, zachodzi konieczność usuwania ich w procesach uzdatniania. Niestety, mikrozanieczyszczenia często są mało podatne na usuwanie podczas konwencjonalnych procesów uzdatniania wody,

w związku z czym ich obecność w wodach powierzchniowych znacząco komplikuje układ technologiczny uzdatniania wody, a czasami wręcz wyklucza korzystanie z tych zasobów. Ponadto niektóre zanieczyszczenia organiczne, jak na przykład kwasy humusowe, oprócz tego, że komplikują procesy uzdatniania wody, są prekursorami toksycznych substancji powstających podczas chlorowania (Kowal i in. , 2007; Świdarska-Bróż, 1993).

Właściwości, a także stężenia mikrozanieczyszczeń powodują, że usuwanie ich z wody jest zwykle problematyczne i wymaga zastosowania złożonych układów technologicznych. Dobór poszczególnych procesów jednostkowych, a także ich kolejność w układach uzdatniania wody, zależy głównie od rodzaju usuwanych związków. W wodzie surowej większość mikrozanieczyszczeń występuje w postaci asocjatów z zawiesinami, co implikuje konieczność całkowitej eliminacji zawiesin z uzdatnianej wody. W tym celu stosuje się następujące procesy: sedymentacja, koagulacja oraz filtracja. Dużo większym wyzwaniem jest jednak usuwanie mikrozanieczyszczeń rozpuszczonych w wodzie, ponieważ tradycyjnie stosowane procesy jednostkowe mogą okazać się niewystarczające. Jedną ze skutecznych metod eliminacji zanieczyszczeń nieorganicznych jest ich strącanie lub współstrącanie, a następnie usuwanie wytrąconego osadu. Dobrym sposobem może być także koagulacja. W celu usuwania metali ciężkich oraz radionuklidów stosuje się wymianę jonową, jednakże zastosowanie tej techniki skutkuje usuwaniem jonów niezbędnych do właściwego funkcjonowania organizmu ludzkiego. Do procesów zmniejszających zawartość zarówno mikrozanieczyszczeń nieorganicznych jak i organicznych należy zaliczyć: sorpcję na węglu aktywnym, infiltrację a także procesy membranowe. Metodą, która pozwala na niszczenie domieszek organicznych, jest utlenianie chemiczne (Świdarska-Bróż, 1993).

Duża różnorodność mikrozanieczyszczeń organicznych, ich zróżnicowana trwałość i podatność na usuwanie sprawiają, że eliminacja tych związków w procesie uzdatniania wody jest szczególnie uciążliwa. Ponadto produkty pośrednie, które powstają na skutek niepełnego utleniania tych mikrozanieczyszczeń, mogą być nawet bardziej niebezpieczne niż związki wyjściowe. W układach technologicznych powinno się więc stosować przede wszystkim techniki pozwalające na usuwanie mikrozanieczyszczeń, a dopiero w ostateczności procesy ich niszczenia, w tym utlenianie chemiczne. W procesie uzdatniania wody niezwykle ważna jest także kolejność poszczególnych procesów jednostkowych, w związku z czym utlenianie chemiczne, jeśli już jest konieczne, powinno być stosowane po procesach usuwania zanieczyszczeń organicznych, natomiast przed sorpcją na węglu aktywnym. Pozwala

to na usunięcie powstałych pośrednich produktów utlenienia oraz chlorowanych związków organicznych.

Konwencjonalne układy technologiczne do uzdatniania wody często okazują się niewystarczające do osiągnięcia zadawalającego poziomu eliminacji mikrozanieczyszczeń, ponieważ związki te charakteryzują się zróżnicowaną podatnością na usuwanie. W związku z tym, standardowe procesy uzdatniania wody uzupełnia się o dodatkowe, zwykle selektywne procesy jednostkowe, ukierunkowane na konkretny typ zanieczyszczeń (Kowal i in., 2007).

1.3.1. Usuwanie WWA

Stopień usuwania wielopierścienionych węglowodorów aromatycznych w tradycyjnie stosowanych systemach uzdatniania wody jest zróżnicowany i zależy od ich rodzaju i stężenia, a także od wykorzystywanych procesów jednostkowych. Najłatwiejsze do usunięcia są te frakcje WWA, które sorbują się na zawieszinach, ponieważ są usuwane wraz z nimi.

Procesem, który pozwala na obniżenie zawartości WWA jest filtracja powolna, podczas której następuje biologiczna degradacja mikrozanieczyszczeń. Filtracja powolna jest procesem bezreagentowym, charakteryzującym się dość dużą skutecznością. Pozwala na zmniejszenie zawartości również innych mikrozanieczyszczeń. Do bezreagentowych procesów usuwania WWA należy zaliczyć również infiltrację, której efektywność zależy od stężenia tych mikrozanieczyszczeń w wodzie poddawanej infiltracji, sposobu infiltracji, a także czasu pasażu wody w gruncie oraz jego zdolności oczyszczających. Znaczną komplikacją przy usuwaniu wielopierścienionych węglowodorów aromatycznych jest zmienność ich stężeń w wodach powierzchniowych na skutek zmieniających się warunków atmosferycznych w cyklu rocznym. Rzutuje to na uzyskiwaną efektywność obniżania zawartości tych mikrozanieczyszczeń.

Skutecznymi metodami usuwania WWA są również sorpcja na węglu aktywnym oraz utlenianie ozonem lub ditlenkiem chloru. Próby usunięcia benzo(a)pirenu za pomocą chloru wykazały, że można było osiągnąć wysoką redukcję zawartości tego WWA, ale po bardzo długim czasie utleniania (Świdarska-Bróż, 1993). Ozon jest znacznie skuteczniejszym utleniaczem (Butković i in., 1983).

Ponieważ istnieją jednak przypuszczenia, że produkty utleniania wielopierścienionych węglowodorów aromatycznych mogą łatwo reagować z chlorem i być toksyczne, zaleca się, aby po utlenieniu przeprowadzać sorpcję na węglu aktywnym. Z uwagi na fakt, że WWA

w środowisku wodnym są w dużej mierze adsorbowane na naturalnych zawiesinach i biosorbentach, sorpcja na węglu aktywnym, procesy membranowe i utlenianie chemiczne powinny być poprzedzone odpowiednio przeprowadzonym: koagulacją, sedymentacją i filtracją (Kowal i in. , 2007; Świdarska-Bróz, 1993). Procesy te zapewniają usunięcie z wody znacznych ilości WWA razem z ich nośnikami.

1.3.2. Usuwanie pestycydów

Pestycydy są grupą związków, która jest dość skutecznie sorbowana przez glebę, jednakże sezonowo, wraz ze spływami powierzchniowymi, trafiają one do wód powierzchniowych, a czasem nawet przenikają do wód podziemnych. Infiltracja w stawach infiltracyjnych przyczynia się do znacznego obniżenia stężeń tych mikrozanieczyszczeń. Dzieje się to za sprawą sorpcji, która zachodzi w osadzie dennym oraz w zakolmatowanym dnie stawu infiltracyjnego. Infiltracja jest szczególnie skuteczna w przypadku usuwania dichlorodifenylotrichloroetanu (DDT). Stopień usuwania pestycydów poprzez infiltrację może być niewystarczający w przypadku, gdy ujmowana woda powierzchniowa lub gleba będą znacząco zanieczyszczone tymi związkami.

Bardzo skuteczną metodą usuwania pestycydów z wody jest sorpcja na węglu aktywnym. Efektywność sorpcji pestycydów mogą jednak zmniejszać występujące w wodzie kwasy humusowe, które działają jako konkurencyjne sorбаты, a ponadto mogą tworzyć z usuwanymi mikrozanieczyszczeniami hydrofilowe, trudnosorbowlne związki kompleksowe.

Koagulacja jest procesem, który pozwala na uzyskanie wysokiego stopnia usuwania pestycydów hydrofobowych, jednakże jest nieskuteczna w przypadku związków hydrofilowych. Skuteczność usuwania pestycydów można zwiększyć stosując bardzo duże dawki koagulantów. Koagulacja jest znacznie bardziej efektywna w przypadku pestycydów karbaminianowych i chloroorganicznych niż fosforoorganicznych (Świdarska-Bróz, 1993).

Kolejnym procesem, brany pod uwagę w przypadku konieczności usuwania pestycydów, jest utlenianie chemiczne. Dla większości pestycydów skuteczność procesu zwiększa się wraz ze wzrostem dawki utleniacza i czasu kontaktu. W wodach przeznaczonych do oczyszczania mamy zwykle do czynienia z mieszaniną pestycydów z różnych grup, w związku z czym wybór odpowiedniego utleniacza, który zapewni bezpieczny rozkład tych związków, jest skomplikowany. Kolejnym utrudnieniem jest konieczność zapewnienia odpowiednio długiego czasu kontaktu wody ze związkiem utleniającym, co w standardowych

układach technologicznych, którymi dysponują zakłady uzdatniania wody jest prawie niemożliwe. Co więcej, stosowanie dużych dawek utleniaczy skutkuje ryzykiem powstawania toksycznych produktów ubocznych. W związku z tym, proces utleniania chemicznego nie jest zalecany do usuwania pestycydów.

Usunięcie niektórych pestycydów jest możliwe przy zastosowaniu wymiany jonowej, zwykle na żywicach syntetycznych. Dużą skuteczność usuwania pestycydów można uzyskać stosując procesy membranowe. Wpływ na sprawność procesu ma przede wszystkim średnica oraz masa cząsteczkowa usuwanych pestycydów oraz rodzaj stosowanych membran.

Niezależnie od metody, która zostanie wybrana w celu eliminacji pestycydów z wody przeznaczonej do spożycia, bezsprzeczna jest konieczność włączenia do układów uzdatniania procesu sorpcji na węglu aktywnym (Kowal i in. , 2007; Świdowska-Bróz, 1993).

1.3.3. Usuwanie chlorowanych związków organicznych

Chlorowane związki organiczne, w tym bifenyle, jako „pierwotne” mikrozanieczyszczeniach występują w wodzie zwykle w niskich stężeniach, nie mniej jednak ich usuwanie w procesie uzdatniania jest bardzo kłopotliwe. W związku z tym, w układach technologicznych uzdatniania wody, która jest zanieczyszczona ChZO, niezbędne jest włącznie dodatkowych procesów. Rodzaj procesu oraz jego efektywność zależą przede wszystkim od właściwości usuwanych chlorowanych związków organicznych.

Procesem, który zapewnia dość dużą skuteczność usuwania domieszek lotnych jest intensywne napowietrzanie wody, poprzedzone utlenianiem chemicznym, co zwiększa efektywność usuwania ChZO. W tym procesie najczęściej wykorzystywanym utleniaczem jest ozon, który stosuje się w środowisku alkalicznym lub razem z nadtlenkiem wodoru, bądź promieniami UV. Często stosuje się także nadtlenek wodoru dodawany do wody poddanej działaniu promieni UV (Kowal i in., 2007).

Procesem wspierającym usuwanie z wody półlotnych i nielotnych ChZO jest infiltracja w stawach infiltracyjnych, poprzedzająca długotrwały pasaż wody w gruncie, co umożliwia sorpcję tych mikrozanieczyszczeń. W przypadku niewystarczającej skuteczności infiltracji, w celu pozbycia się nielotnych ChZO do procesu uzdatniania należy włączyć sorpcję na węglu aktywnym oraz utlenianie. Efektywność tych procesów zależy jednak od rodzaju usuwanych zanieczyszczeń oraz dawek sorbentu i utleniacza. Stopień usuwania polichlorowanych bifenyli zwiększa się również w procesach koagulacji, sedymentacji oraz filtracji przez złoża piaskowe.

Podobnie jak w przypadku pestycydów, dużą efektywność usuwania ChZO można osiągnąć w procesach membranowych. Pozwalają one na usunięcie zarówno ChZO „pierwotnych” jak i „wtórnych”. Zastosowanie membran wykorzystywanych w procesie odwróconej osmozy zapewnia ponad 95% skuteczności usuwania chlorowanych związków organicznych. ChZO, pojawiające się na skutek prowadzonych procesów uzdatniania (wtórne), usuwane są także w procesie sorpcji oraz intensywnego utleniania. Nie mniej jednak produkty chlorowania związków organicznych zdecydowanie trudniej usunąć niż ich prekursorów. Dlatego też zakłady uzdatniania wody powinny dążyć do całkowitego usunięcia prekursorów ChZO z wody przed procesem chlorowania. W przypadku konieczności przeprowadzenia wstępnego utleniania powinno się zastosować utleniacz inny niż chlor, np. ditlenek chloru lub ozon (Kowal i in. , 2007; Świdarska-Bróz, 1993).

2. METODY OCENY TOKSYCZNOŚCI I GENOTOKSYCZNOŚCI

W środowisku wodnym znajduje się wiele czynników o potencjalnym działaniu toksycznym lub genotoksycznym, w tym mutagennym oraz kancerogennym. Detekcja oraz identyfikacja substancji obecnych w wodzie, szczególnie wodociągowej, w oparciu o analizę chemiczną jest kosztowna i wymaga zastosowania nowoczesnych technik analitycznych. Sama analiza chemiczna nie powinna być podstawą do prognozowania biologicznych skutków jakie mogą wywołać mikrozanieczyszczenia, na organizmy żywe. Stąd też istnieje konieczność zastosowania w kontroli jakości środowiska wodnego, obok metod analitycznych, badań bioindykacyjnych. Niezwykle przydatnym narzędziem jest analiza epidemiologiczna, która daje możliwość porównania zachorowalności oraz umieralności na różne choroby, szczególnie nowotwory złośliwe, w populacji ludzi żyjących w zbliżonych warunkach. Niewątpliwą wadą takiej analizy jest jednak bardzo długi czas, potrzebny na uzyskanie miarodajnych rezultatów. Zwykle wynosi on nawet 20-30 lat. Ponadto, powodzenie tej metody może zależeć od odpowiedniego doboru grupy kontrolnej, która musi być odpowiednio liczna oraz powinna wystrzegać się czynników potencjalnie zakłócających wyniki, w tym palenia papierosów oraz korzystania z innych używek, a także różnic w diecie pokarmowej. Analiza epidemiologiczna powinna być więc uzupełniona krótkoterminowymi testami toksyczności i genotoksyczności, a także długoterminowymi testami na zwierzętach doświadczalnych. Nie mniej jednak możliwości wykorzystywania w tym celu zwierząt są ograniczone. Po pierwsze, może budzić to wątpliwości natury etycznej, a ponadto ogromna liczba nowych substancji wprowadzonych do środowiska człowieka zdecydowanie utrudnia cały proces. W związku z tym, kluczową pozycję wśród badań bioindykacyjnych zajmują testy krótkoterminowe, które umożliwiają detekcję potencjalnych kancerogenów, a także wstępną ocenę ich szkodliwości przy zastosowaniu prostych organizmów testowych.

Testy krótkoterminowe są stosunkowo niedrogie i dość proste do przeprowadzenia. Ich największą zaletą jest krótki czas potrzebny do wykonania doświadczenia, a także możliwość szybkiej estymacji wyników.

2.1. OCENA TOKSYCZNOŚCI

Celem badania toksyczności jest uzyskanie informacji o właściwościach toksycznych substancji, tak aby można było odpowiednio ocenić zagrożenia jakie stwarza dla zdrowia i środowiska. Zapotrzebowanie na informacje o toksyczności w celu zapewnienia racjonalnej podstawy regulacji czynników środowiskowych stale wzrasta. Jednocześnie pojawia się coraz więcej technologii i metody testowania. Testy toksyczności mogą pomóc w ustaleniu, czy stężenia zanieczyszczeń w danym środowisku są wystarczająco wysokie, aby wywołać niekorzystne skutki dla organizmów oraz pozwala na ocenę ich wpływu na przeżycie, wzrost, reprodukcję, zachowanie i/lub inne cechy tych organizmów.

W środowisku organizmy są narażone na działanie różnorodnych mikrozanieczyszczeń równocześnie. W testach prowadzonych nad mieszaninami związków zakłada się z reguły ich działanie addytywne i przyjmuje się, że toksyczność mieszaniny związków powinna być przybliżona do sumy toksyczności jej składników. W rzeczywistości często występuje zjawisko interakcji, czyli wzajemnego oddziaływania związków chemicznych (działanie skojarzone), którego wynikiem jest modyfikacja działania związków aktywnych, na które narażony jest organizm. Działanie skojarzone może mieć charakter synergizmu, czyli współdziałania czynników, którego efekt jest większy niż suma efektów działania czynników pojedynczych. Przeciwnie działanie dwóch lub kilku związków chemicznych osłabiających lub znoszących efekt toksyczny określa się mianem antagonizmu (Traczewska, 2011).

Szybkie testy toksyczności opracowano do oceny szkodliwego wpływu substancji chemicznej w różnych stężeniach na wybrane organizmy w jak najkrótszym czasie. Toksyczność ostra jest definiowana jako widoczne, szkodliwe skutki wywołane w organizmie przez daną substancję w trakcie ekspozycji. Zazwyczaj szybkie testy toksyczności polegają na określeniu liczby osobników, u których stwierdza się reakcję na działanie danej substancji chemicznej. Ma tu zastosowanie parametr LD_{50} (ang. *lethal dose*) jako doświadczalnie oszacowana dawka wywołująca śmierć 50% osobników badanej populacji oraz LC_{50} (ang. *lethal concentration*) do określenia stężenia (np. w powietrzu, wodzie, czy glebie) powodującego analogiczny efekt. Testy te można również stosować do określenia stężenia wywołującego efekty inne niż śmierć osobników, definiowanego jako EC_{50} (ang. *effective concentration*), czyli stężenie skutecznie wywołujące określoną reakcję fizjologiczną u 50% badanej populacji.

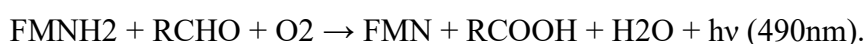
Testy toksyczności ostrej umożliwiają uzyskanie informacji dotyczących oddziaływania na organizmy związków chemicznych, mieszanin substancji, ścieków, odcieków i wód przeznaczonych do spożycia przez ludzi (Traczewska, 2011).

W celu określenia toksyczności zanieczyszczeń wody, w tym wody przeznaczonej do spożycia, bardzo popularne są przesiewowe testy z wykorzystaniem mikroorganizmów. W testach tych stosowane są różne gatunki bakterii, a toksyczność badanych substancji ocenia się np. na podstawie pomiaru bioluminescencji (*Aliivibrio fischeri*- znany wcześniej pod nazwą *Vibrio fischerii*) lub inhibicji wzrostu (*Pseudomonas putida*).

2.1.1. Microtox

Microtox jest testem pozwalającym określić toksyczność ostrą. Jako organizm testowy wykorzystywany jest szczep *Aliivibrio fischeri* (znany wcześniej jako *Vibrio fischerii*), należący do grupy bakterii luminescencyjnych. W systemie transportu elektronów u tych bakterii lucyferaza katalizuje utlenienie mononukleotydu flawinowego. Efektem jest luminescencja świetlna tychże bakterii mierzona fotometrycznie. W warunkach normalnych komórki bakterii zużywają 20% energii na świecenie, a w obecności związków wysoce szkodliwych dla mikroorganizmów ich luminescencja zanika.

Podstawą bioluminescencji, czyli wytwarzania światła przez żywe organizmy, jest reakcja utleniania związku zwanego lucyferyną przez enzym- lucyferazę. Reakcja przebiega następująco:



Lucyferaza łącząc się z kofaktorem FMNH_2 , przy pomocy tlenu, przekształca aldehyd w kwas tłuszczowy, a sama ulega wzbudzeniu przechodząc na poziom wyższy energetycznie. W wyniku utleniania powstaje cząsteczka w stanie wzbudzonym, oksylucyferyna, której przejście do stanu podstawowego wiąże się z emisją światła (światło o długości fali 490 nm, zielono-niebieskie). Kofaktor zostaje utleniony do FMN. Istnieje hipoteza, że enzymatyczny proces prowadzący do produkcji kwantów światła mógł ewoluować jako mechanizm detoksykacji reaktywnych form tlenu. Bakterie wykazujące bioluminescencję posiadają zestaw genów nazwany operonem Lux. Bioluminescencja bakterii *Aliivibrio fischeri*, jest ściśle związana z gęstością ich populacji. Komórki bakterii emitują światło w wyniku syntezy białek

kompleksu lucyferazy, kodowanych przez pięć genów strukturalnych luxCDABE, które są częścią operonu luxICDABE. Gen kodujący białko regulatorowe LuxR jest transkrybowany w odwrotnym kierunku niż przylegające do niego geny operonu luxICDABE. Ekspresja genu kodującego białkowy kompleks lucyferazy jest kontrolowana przez dwa białka regulatorowe LuxI i LuxR. Pierwsze z nich jest syntazą odpowiedzialną za syntezę autoinduktora acyl-HSL, drugie zaś rozpoznaje cząsteczkę sygnałową w wyniku czego następuje połączenie LuxR z HSL. Powstały kompleks LuxR/HSL ma również zdolność łączenia się z genem luxR. Powoduje to powstanie systemu kontroli negatywnej, który w warunkach silnej indukcji może hamować nadmierną biosyntezę białek z operonu luxICDABE (Węgrzyn i in., 2002).

Bakterie luminescencyjne emitują światło, gdy znajdują się w optymalnym dla siebie środowisku. Jeżeli szkodliwe substancje są obecne, luminescencja się zmniejsza. Im wyższy jest stopień toksyczności, tym mniejsza jest ilość światła emitowanego przez bakterie. Bakterie te są najbardziej rozpowszechnionymi organizmami emitującymi światło w obszarach morskich, a także w środowiskach słodkowodnych i lądowych. Organizmy te należą do bakterii Gram-ujemnych, zakwalifikowanych jako beztlenowce fakultatywne. Najczęściej stosowane gatunki to *Aliivibrio fischeri* i *Vibrio harveyi* (Girotti i in., 2008).

Obecnie Microtox jest najczęściej stosowanym, a jednocześnie najlepiej poznanym dostępnym na rynku biotestem wykorzystującym bakterie bioluminescencyjne jako element aktywny. Stanowi on użyteczne narzędzie wykorzystywane do oceny stopnia zanieczyszczenia wód, osadów dennych i gleb. Łączy w sobie zalety technik bioindykacyjnych z precyzją analizy instrumentalnej, przez co znalazł wiele zastosowań. Jako przykłady można wymienić: monitorowanie stanu wód podziemnych, badanie odcieków ze składowisk, oznaczanie toksyczności gleby i osadów, monitorowanie przebiegu procesów oczyszczania ścieków miejskich i przemysłowych, wstępne oznaczanie toksyczności ścieków dostarczanych do oczyszczalni, monitorowanie przebiegu procesu uzdatniania wody do celów spożywczych, a także kontrolę ścieków na poszczególnych etapach oczyszczania.

Bakterie *Aliivibrio fischeri* są dostępne handlowo w formie liofilizowanej. Po hydratacji posiadają lekko uszkodzoną ścianę komórkową, przez co łatwiej wchłaniają substancje toksyczne. Ich wrażliwość na związki organiczne jest kilkakrotnie większa niż bakterii pochodzących ze świeżej hodowli.

2.2. OCENA GENOTOKSYCZNOŚCI

Oceny genotoksyczności dokonuje się przede wszystkim na podstawie obecności mutacji genowych, aberracji chromosomowych, uszkodzeń lub zaburzeń naprawy DNA, a także powstawania adduktów pod wpływem działania badanego związku. Jeżeli analizowany związek tworzy trwałe wiązania z DNA, uznaje się go za czynnik mutageny, zagrażający organizmom żywym. Przykłady testów w zależności od efektu, który wykrywają przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Podział krótkoterminowych testów genotoksyczności w zależności od wykrywanego efektu

Testy wykrywające mutacje genowe	Testy wykrywające aberracje chromosomowe	Testy wykrywające uszkodzenia lub zaburzenia naprawy DNA
<ul style="list-style-type: none">• Test Amesa na bakteriach <i>Salmonella typhimurium</i>• Test recesywnej letalności na muszkach <i>Drosophila melanogaster</i>	<ul style="list-style-type: none">• Test mikrojądrowy na erytrocytach ssaków• Test wykrywający aberracje liczbowe w organizmach eukariotycznych (<i>Drosophila</i> lub komórki somatyczne ssaków)• Test wykrywający aberracje strukturalne w komórkach nabłonkowych zarodków i płuc chomika chińskiego	<ul style="list-style-type: none">• Test na nieplanowaną syntezę DNA (np. w pierwotnej hodowli hepatocytów szczura)• Test wymian chromatyd siostrzanych w komórkach somatycznych <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>

Niestety, żaden z obecnie dostępnych krótkoterminowych testów pojedynczo nie spełnia kryteriów idealnego systemu oceny genotoksyczności. Ich powtarzalność i dokładność często są niewystarczające do jednoznacznego wyciągnięcia wniosków. Ponadto testy charakteryzują się zróżnicowanym poziomem odpowiedzi w zależności od badanych substancji. Ponieważ dokładny skład próbek środowiskowych często jest nieznanym, dopasowanie testu, który okaże się najlepszym wyborem może być trudne. W związku z tym preferuje się systemy złożone z kilku testów pozwalające na identyfikację różnych czynników mutagennych.

Badania krótkoterminowe powinny być wykorzystywane tylko do wstępnej oceny związków chemicznych lub ich mieszanin, w tym próbek środowiskowych. Na podstawie

uzyskanych rezultatów powinno się decydować o przeprowadzeniu bardziej skomplikowanych analiz.

Testy krótkoterminowe mogą być wykonywane zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Do przeprowadzenia testów wykorzystuje się różnorodny materiał biologiczny. Mogą to być zarówno komórki bakteryjne, jak i komórki ssaków, w tym ludzkie.

Ocenę genotoksycznego działania związków chemicznych najczęściej przeprowadza się przy zastosowaniu krótkoterminowych testów bakteryjnych. Testy te zwykle mają dokładnie określoną wiarygodność. Zastosowanie bakterii w testach genotoksyczności ma wiele zalet. Bakterie cechują się bardzo prostą budową, a ich pojedyncza cząsteczka DNA jest łatwo dostępna dla związków chemicznych. Ze względu na częste podziały, którym ulegają te jednokomórkowe organizmy, w krótkim czasie można uzyskać miliony komórek bakteryjnych. Procesy genetyczne i biochemiczne zachodzące u bakterii są bardzo dokładnie poznane, dzięki czemu możliwe jest celowe wyhodowanie specjalnych szczepów, które będą wrażliwe na działanie związków potencjalnie genotoksycznych. Pozwoliło to na skonstruowanie wielu szczepów bakteryjnych charakteryzujących się zwiększoną przepuszczalnością błony komórkowej dla cząsteczek o dużej masie. W klasycznych testach stosowane są szczepy bakterii, które posiadają celowo wprowadzone mutacje w specyficznych genach. Należy zwrócić uwagę na fakt nieposiadania przez bakterie zdolności do aktywacji metabolicznej substancji chemicznych, którą z kolei posiadają komórki zwierzęce.

Jeśli chodzi o ocenę genotoksyczności próbek pochodzących ze środowiska wodnego, jedną z najczęściej stosowanych metod jest bakteryjny test *Salmonella*, zwany inaczej od nazwiska jego twórcy testem Ames (Lah i in., 2005; Lv i in., 2015; Traczewska, 2011; Trusz-Zdybek, 2009). Oprócz testu Ames stosuje się także inne testy pozwalające na ocenę genotoksyczności, w tym: SOS-Chromotest, Test Umu, Vitotox, Mutatox oraz test oparty na bioluminescencji szczepu *Vibrio harveyi* (Czyż i in., 2000; Czyż i in.; 2002 Czyż i in., 2003; Kusamran i in., 2003; Macova i in., 2011). W wielu przypadkach stwierdzono korelację pomiędzy wynikami tych testów z wynikami uzyskanymi w teście Ames (Madill i in., 1999; Ruiz i in., 1997; Shen i in., 2003) .

2.2.1. Mutatox

System Mutatox wykorzystuje bakterie luminescencyjne *Aliivibrio fischeri* (dawniej *Vibrio fischeri*) w celu wykrywania czynników genotoksycznych. Test wykrywa substancje działające niekorzystnie na strukturę DNA poprzez pomiar światła emitowanego przez specjalnie wyselekcjonowane bakterie luminescencyjne. Czas przeprowadzenia testu wynosi od 16 h do 24 h. Wykorzystywane szczepy pozbawione są zdolności świecenia (Podgórska i in., 2007). Substancje mutagenne powodują przywrócenie tej zdolności, inaczej niż w systemie Microtox, gdzie wynik był określany na podstawie redukcji ilości produkowanego światła przez organizmy testowe. System Mutatox może być używany w badaniu próbek środowiskowych, które są podejrzewane o posiadanie potencjału genotoksycznego. Główne zastosowania to określanie genotoksyczności chemikaliów, wody, ścieków, ekstraktów z osadów ściekowych, ścieków z procesów ługowania i materiałów niebezpiecznych, monitoringu wód w celu ochrony źródeł wody przeznaczonej do spożycia i bytowania organizmów. Może też być wykorzystywany do badań istniejących i nowych chemikaliów i ich mieszanin, oceny ryzyka biologicznego skażeń, które mają wpływ na środowisko wodne oraz oceny osadów ściekowych w celu wyboru metody i zakresu unieszkodliwiania (Madill i in., 1999; Węgrzyn i in., 2003)

2.2.2. Test *Vibrio harveyi*

Szczególnym przypadkiem są zanieczyszczenia mutagenne w środowisku morskim, ponieważ występują one tam w bardzo niskich stężeniach. Do oceny ich działania został opracowany szybki i tani test biologiczny, wykorzystujący zmutowane bakterie morskie *Vibrio harveyi* A16, niezdolne do emisji światła. Szczep posiada mutacje w genie luxE, a pod wpływem działania mutagenu jest w stanie odzyskać zdolność emisji światła. Organizm ten jest halotolerancyjny, a także łatwy i bezpieczny w hodowli w warunkach laboratoryjnych, ponieważ nie jest patogenny dla człowieka (Graindorge, 2001). Badania prowadzone z udziałem *V. harveyi* po ich kilkugodzinnej inkubacji z różnymi mutagenami w próbce osadu morskiego wykazywały znaczny wzrost luminescencji. Najlepsze rezultaty osiągnięto już po 4 godzinach, co wskazuje na możliwość szybkiego stwierdzenia obecności mutagenu w badanej próbce. Otrzymane przez badaczy wyniki wykazują powiązanie wzrostu poziomu luminescencji ze wzrostem stężenia mutagenu. Podobne rezultaty osiągnięto wykorzystując test do wykazania obecności mutagenów skumulowanych w tkankach roślinnych (Czyż i in., 2000;

Czyż i in., 2002; Czyż i in., 2003; Podgórska i in. 2006; Podgórska i in. 2007a, Podgórska i in. 2007b).

2.2.3. SOS-Chromotest

W teście SOS-Chromotest wykorzystywany jest szczep bakterii *Escherichia coli*. Bakterie te posiadają system naprawy DNA nazywany odpowiedzią SOS. Uruchomienie tego systemu oznacza, że miało miejsce uszkodzenie DNA. Jeżeli na komórki bakterii zadziała czynnik mutagenny lub genotoksyczny, może pojawić się sygnał wywołujący odpowiedź SOS (Quillardet, 1982; Quillardet, 1985).

Ten test kolorymetryczny opiera się na indukcji genu, który jest kontrolowany przez ogólny represor systemu SOS (naprawy DNA) u specyficznego mutantu *Escherichia coli* PQ7. W tym szczepie gen β -galaktozydazy (*lacZ*) znajduje się pod kontrolą operonu genu *sfiA*, który należy do systemu naprawy SOS. W związku z tym, po indukcji uszkodzenia DNA spowodowanego przez środki genotoksyczne, ulega ekspresji nie tylko gen *sfiA*, ale także *lacZ*. W konsekwencji produkt genu *lacZ*, β -galaktozydazę, można wykryć za pomocą testu kolorymetrycznego, który zapewnia pośredni pomiar uszkodzeń DNA zdolnych do indukowania układu naprawczego SOS. Dodatkowo, pomiar przewodzącej produkcji fosfatazy alkalicznej w *E. coli* PQ37 można wykorzystać jako wskaźnik niespecyficznej toksyczności (Mersch-Sundermann et al. 1996). Test SOS-Chromotest posiada szereg zalet, takich jak łatwość wykonania, krótki czas analizy, zastosowanie tylko jednego szczepu testowego, wysoka powtarzalność i łatwa kwantyfikacja wyników. Test SOS-Chromotest może być wykorzystywany w analizie genotoksyczności środowiska wodnego (Alloula, 2014; Kocak i in., 2010).

2.2.1. UMU-Chromotest

UMU-Chromotest jest krótkoterminowym testem bakteryjnym, w którym wykorzystuje się szczep *Salmonella typhimurium* TA1535. Opiera się na zdolności czynników uszkadzających DNA do indukowania ekspresji operonu *umu*. W połączeniu z genami indukowalnymi uszkodzeniem *recA*, *lexA* i *umuD*, gen *umuC* jest zaangażowany w mutagenezę bakteryjną nazywaną procesem naprawy SOS. W teście tym wykorzystuje się fuzję operonów, umieszczając operon *lac* (odpowiedzialny za wytwarzanie β -galaktozydazy-białka, które rozkłada laktozę) pod kontrolą białek związanych z *umu*, Indukcja genu *UmuC*

połączonego z genem lacZ mierzona jest poziomem aktywności wewnątrzkomórkowej β -galaktozydazy (Podsiadły, 1999).

Przeprowadzenie prostego testu kolorymetrycznego jest możliwe poprzez dodanie analogu laktozy, który jest rozkładany przez β -galaktozydazę, dając barwny związek, który można zmierzyć ilościowo za pomocą spektrofotometrii. Stopień wybarwienia jest pośrednią miarą wytwarzanej β -galaktozydazy, która sama w sobie jest bezpośrednio związana z ilością uszkodzeń DNA. Procedura testu została skodyfikowana zgodnie z normą ISO 13829 „Jakość wody – Oznaczanie genotoksyczności wody i ścieków przy użyciu testu Umu”. Czułość testu UMU-Chromotest jest porównywalna z testem Ames, a jego specyficzność jest większa od innych znanych i stosowanych do środowiska wodnego testów bakteryjnych (Vincent-Hubert i in., 2017; Nie i in., 2016; Shen i in., 2003; Takanashi in., 2009). Bardzo dużą zaletą testu jest możliwość miniaturyzacji i ograniczenia do minimum ryzyka subiektywnej interpretacji wyników (Podsiadły, 1999). Ze względu na liczne zalety test UMU-Chromotest znalazł zastosowanie w badaniach genotoksyczności wody, w tym wody przeznaczonej do spożycia (Dizer i in., 2002; Jin i in., 2016; Nie i in., 2016, Takanashi in., 2009).

3. METODY POBIERANIA PRÓBEK

Na całym świecie prowadzonych jest wiele badań i programów, których celem jest monitorowanie obecności zanieczyszczeń środowiskowych, a także określenie trendów w ich dystrybucji oraz zmian stężeń w zależności od różnych czynników. Nawet niewielka ilość mikrozanieczyszczeń może być szkodliwa dla organizmów żywych, jednak ich detekcja przy niskich stężeniach jest niezwykle trudna (Dévier i in., 2011). Odpowiedni dobór metody poboru próbek i zateżenia występujących w nich związków, które umożliwią wiarygodną ocenę stanu badanego środowiska jest więc dużym wyzwaniem.

Pobieranie próbek środowiskowych jest uznawane za najważniejszy etap każdej procedury analitycznej, ponieważ błędy popełnione na tym etapie nie mogą zostać skorygowane podczas ich dalszej analizy. Istnieje wiele metod pobierania próbek, a ich wybór zależy od charakteru analitów oraz zakresu stężenia, w którym występują. W najprostszych przypadkach próbka (np. wody lub powietrza) analizowana jest bezpośrednio na miejscu lub w laboratorium po pobraniu jej do odpowiedniego pojemnika. Jednakże z nielicznymi wyjątkami w takich przypadkach analiza ogranicza się jedynie do zidentyfikowania głównych związków znajdujących się w materiale. W zdecydowanej większości przypadków konieczne jest wykonanie dodatkowych operacji na próbce przed oznaczeniem analitów lub wykorzystaniem jej do testów biologicznych. Operacje te zazwyczaj obejmują izolację analitu z matrycy i jego wstępne zateżenie, co korzystnie wpływa na poprawę czułości metody. Konieczna może być również zmiana matrycy, w której obecny jest analit, na taką, która jest właściwa dla aparatury stosowanej do ostatecznej detekcji. W związku z tym wiele procedur przygotowania próbek, zwłaszcza w przypadku analizy śladowych składników w złożonych matrycach (np. próbki środowiskowe lub biologiczne) obejmuje wiele czasochłonnych etapów.

Techniki izolacji i wzbogacania organicznych mikrozanieczyszczeń obecnych w środowisku wodnym można podzielić na dynamiczne i pasywne.

3.1. DYNAMICZNE METODY POBIERANIA PRÓBEK

W celu pobierania i ekstrakcji mikrozanieczyszczeń ze środowiska wodnego najczęściej stosuje się metody dynamiczne (aktywne). „Dynamiczne pobieranie próbek” odnosi się do metod, które wymagają fizycznej interwencji lub zewnętrznego nakładu energii, co oznacza, że przepływ strumienia analizowanej wody przez medium zatrzymujące odbywa się w sposób wymuszony. W przypadku tak pobieranych próbek wody do zateżania zwykle stosuje się

ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi (tj. ekstrakcja ciecz-ciecz) lub ekstrakcję do fazy stałej (SPE), która pozwala ograniczyć zużycie rozpuszczalnika. Powszechnie jest również stosowanie adsorpcji na żywicach XAD. Dynamiczne metody pobierania próbek zapewniają wiarygodne dane, jednak dotyczą one tylko jednego punktu lub stosunkowo krótkiego przedziału czasowego. Wyraźnie kontrastuje to z czasem ekspozycji na mikrozanieczyszczenia większości organizmów (Ohe i in., 2004).

3.2. PASYWNE METODY POBIERANIA PRÓBEK

Klasyczne metody generują problemy logistyczne, głównie ze względu na konieczność pobierania i transportowania do laboratorium znacznych ilości wody w celu przygotowania próbek i oznaczenia interesujących nas analitów, a przy tym zajmują dużo czasu, są pracochłonne i kosztowne. W związku z powyższymi ograniczeniami, począwszy od 1987 roku (Södergren, 1987), dużą popularność zyskały próbniki pasywne (Emelogu i in., 2013; Gilli i in., 2005; Karacik i in., 2013; Kim i in., 2014; Metcalfe, i in., 2014; Mueller i in., 2011; Sabaliunas i in., 2000).

Urządzenia tego typu umożliwiają koncentrację związków w miejscu pobierania próbek, przy czym charakteryzują się bardzo prostą budową. Składają się z fazy odbierającej, w której zatrzymywany jest analit oraz membrany, czyli fazy ograniczającej, która umożliwia selektywny transport związków chemicznych. Na skutek różnicy potencjałów chemicznych analitów w medium zatrzymującym i środowisku, w którym umieszczony jest próbnik, następuje swobodny przepływ masy przez membranę, stanowiącą integralną część próbniaka, do fazy odbierającej (Górecki i in., 2002; Shi i in., 2014).

ZASADA DZIAŁANIA

Anality są wychwytywane i zatrzymywane w odpowiednim medium w pasywnym próbniku, będącym fazą odbierającą. Może to być rozpuszczalnik, reagent lub porowaty adsorbent. Faza odbierająca jest wystawiona na działanie fazy wodnej. Wymianę między pasywnym próbniakiem a fazą wodną można opisać za pomocą równania kinetycznego pierwszego rzędu:

$$C_S(t) = C_W \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t})$$

gdzie:

$C_S(t)$ – oznacza stężenie analitu w próbniku w czasie ekspozycji t ,

C_W – oznacza stężenie analitu w środowisku wodnym,

k_1 i k_2 – oznaczają stałe szybkości pobierania i uwalniania

Próbniki pasywne charakteryzują się małymi gabarytami, nie wymagają źródła zasilania, a także zmniejszają zużycie drogich i toksycznych rozpuszczalników organicznych. Dodatkową zaletą próbników tego typu jest możliwość łatwego wyznaczenia średniej ważonej w czasie wartości stężenia interesujących nas substancji. Najczęściej stosowanymi próbnikami pasywnymi są urządzenia z membraną półprzepuszczalną (SPMD) (Lu i in., 2002; Marruci i in., 2013) oraz Polar Organic Chemicals Integrative Sampler (POCIS) (Alvarez, 2013; Bayen et al., 2014; Ibrahim i in., 2012; Morin i in., 2012).

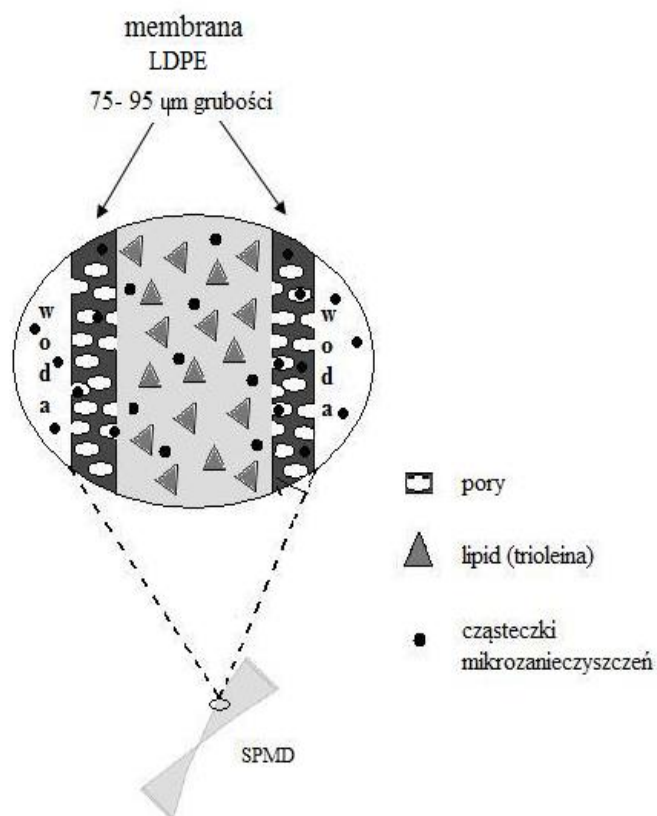
Tabela 2. Zalety i wady próbników pasywnych (Górecki i in., 2002; Shi i in., 2014)

PRÓBNIKI PASYWNE	
ZALETY	WADY
<ul style="list-style-type: none">• Prosta budowa i niewielkie wymiary urządzeń• Eliminacja zewnętrznych źródeł zasilania• Ograniczenie ilości zużywanych rozpuszczalników organicznych• Możliwość oznaczenia średnich ważonych w czasie stężeń analizowanych związków	<ul style="list-style-type: none">• Wpływ czynników środowiskowych (biofouling, temperatura, natężenie przepływu) na efektywność akumulacji• Niewielka wrażliwość próbników na chwilowe wahania stężeń• Konieczność kalibracji próbników w celu określenia szybkości pobierania analizowanych związków przez próbnik• Narażenie na wandalizm w miejscu zamontowania próbników

3.2.1. Urządzenia z membrana półprzepuszczalną

BUDOWA I ZASADA DZIAŁANIA

Urządzenia z membraną półprzepuszczalną (*ang. Semipermeable Membrane Devices-SPMDs*) są przeznaczone do zateżnienia hydrofobowych związków organicznych obecnych w próbkach wody lub powietrza (Huckins i in., 1992; Huckins i in., 1995). Zostały zaprojektowane tak, aby odwzorowywać bioakumulację związków organicznych w tkance tłuszczowej organizmów, przy zastosowaniu powtarzalnej matrycy (Lu i in., 2002). SPMDs zawierają neutralny lipid o dużej masie cząsteczkowej (>600 Da), najczęściej trioleinę, otoczony cienką (75- 95 μm) folią z polietylenu o małej gęstości (LDPE). Polietylenową membranę uznaje się za nieporowatą, jednak przypadkowe ruchy termiczne łańcucha polimerowego powodują tworzenie się chwilowych porów o maksymalnej średnicy 10 Å (Lu i in., 2002). Membrany te, naśladując membrany biologiczne, umożliwiają selektywną dyfuzję rozpuszczonych niskocząsteczkowych związków organicznych, a tym samym ich kondensację w trioleinie. Zasadę działania urządzenia z membraną półprzepuszczalną przedstawiono na Rysunku 2.



Rys. 2. Zasada działania urządzenia z membraną półprzepuszczalną (Huckins i in., 2006)

Trioleina została zastosowana w SPMD z kilku powodów. Po pierwsze, dla danego związku organicznego istnieje ścisły związek pomiędzy wartością współczynnika podziału trioleina- woda (K_{tw}) a wartością powszechnie dostępnego współczynnika podziału oktanol- woda (K_{ow}) (Huckins i in., 1993). Po drugie, duża masa cząsteczkowa trioleiny (>800 Da) znacznie zmniejsza przepuszczalność membrany polietylenowej (Lu i in., 2002). Ponadto, trioleina wysokiej czystości jest dostępna komercyjnie (Sabaliūnas and Södergren, 1997). W celu odzyskania związków zatrzymanych w lipidzie stosuje się ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi.

ZASTOSOWANIE W MONITORINGU ŚRODOWISKA WODNEGO

Począwszy od 1990 roku urządzenia z membraną półprzepuszczalną stały się powszechnie wykorzystywane w monitoringu wód. Technika wykorzystująca SPMD ma duże znaczenie przy szacowaniu zagrożenia związanego z ekspozycją na działanie zanieczyszczeń, ponieważ pozwala uzyskiwać średnie, ważone w czasie, stężenia zanieczyszczeń rozpuszczonych i przyswajalnych biologicznie dla długich okresów czasu. Membrany półprzepuszczalne zawierające trioleinę znajdują zastosowanie przy ekstrakcji hydrofobowych związków niepolarnych, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (Karacik i in., 2013; Marrucci i in., 2013; Mueller i in., 2011; Pazdro, 2002), chlorowane pestycydy (Karacik i in., 2013) czy polichlorowane bifenyle (Kim i in., 2014, Karacik i in., 2013, Marrucci i in., 2013). Zestawienie związków chemicznych, zatrzymywanych w SPMD przedstawiono w Tabeli 3. Uzyskane dzięki SPMD ekstrakty poddaje się dalszym analizom, zarówno chemicznym jak i biologicznym (Bustamante i in., 2013; Goodbred i in., 2009; Petty i in., 2000; Sabaliūnas and Södergren, 1997).

Opisywana technika sprawdziła się przy analizie próbek wody różnego pochodzenia, w tym ze środowiska morskiego (Chang i in., 2015; Chęć i in., 2006; Marrucci i in., 2011; Pazdro, 2002; Prest i in., 1995), rzek (Kim i in., 2014; Mueller i in., 2011; Liao i in., 2006) jezior oraz oczyszczalni ścieków (Esteve-Turrillas i in., 2008; Gourlay-Francé i in., 2008; Stuer-Lauritsen i in., 2000). Długotrwałe prowadzenie monitoringu wód przy zastosowaniu SPMDs umożliwia ocenę zmian zachodzących w nich na przestrzeni lat (Mueller i in., 2011).

Dzięki połączeniu urządzeń z membraną półprzepuszczalną oraz bioanaliz możliwe jest określenie potencjału toksycznego i genotoksycznego badanych próbek środowiskowych (Buschini i in., 2008; Sabaliūnas i in., 2000). Skuteczność metody wykazano dla

krótkoterminowych testów biologicznych wykorzystujących zjawisko bioluminescencji bakteryjnej szczepów *Aliivibrio fischeri* (Sabaliūnas and Södergren, 1997) m. in. przy teście Microtox™ (ocena potencjału toksycznego) (Gillii in., 2005) oraz *Vibrio harveyi* (ocena potencjału mutagennego) (Chęć i in., 2006). Prowadzono również badania nad możliwością wykorzystania ekstraktów otrzymanych przy pomocy SPMD w powszechnie stosowanym teście Ames, jednak uzyskiwane w ten sposób stężenia potencjalnych mutagenów okazały się niewystarczające do wywołania mutacji szczepu *Salmonella typhimurium* (Gillii in., 2005; Sabaliūnas and Södergren, 1997).

Zastosowanie urządzeń z membraną półprzepuszczalną jako narzędzia do oceny ekologicznych skutków wprowadzenia do środowiska organicznych zanieczyszczeń pochodzenia antropogennego zdaje się być obiecujące, zważywszy na obecny problem z określeniem skutków długotrwałej ekspozycji na występujące w wodzie mikrozanieczyszczenia organiczne. SPMDs zawierające trioleinę mogą być stosowane w zastępstwie, jak również jako uzupełnienie analiz wykonywanych przy użyciu organizmów wskaźnikowych do określenia biodostępności mikrozanieczyszczeń w środowisku wodnym. Dane literaturowe dowodzą, że stosowanie SPMDs może być przydatne w monitoringu organicznych mikrozanieczyszczeń wody (Koči i in., 2009; Moring, 1997; Miége i in., 2015; Miége i in., 2012; Paulik i in., 2016; Vrana i in., 2005; Vrana i in., 2002; Wang i in., 2016; Wang i in., 2014; Zimmerman i in., 2000). Zainteresowanie naukowców urządzeniami z membraną półprzepuszczalną nie maleje i wciąż trwają prace nad modyfikacjami metody, dostosowaniem jej do specyficznych środowisk, a także pozwalające znaleźć nowe możliwości zastosowania (DeVita i in., 1998, Klučarova i in., 2013; Šetková i in., 2005; Wenzel i in., 2004).

Tabela 3. Przykłady związków zatrzymywanych w membranie SPMD

PESTYCYDY CHLOROORGANICZNE	WWA I ICH POCHODNE
<ul style="list-style-type: none"> • Heksachlorobenzen (HCB) • pentachloroanizol (PCA) • alfa-benzoheksachlorek (a-BHC) • Lindane • beta-benzoheksachlorek (b-BHC) • heptachlor • delta-benzoheksachlorek (d-BHC) • Dacthal • Oksychlordan • Epoksyd heptachloru • trans-chlordan • trans-Nonachlor • o,p'-DDE • cis-chlordan • Endosulfan • p,p'-DDE • Dieldrina • o,p'-DDD • Endryna • cis-Nonachlor • o,p'-DDT • p,p'-DDD • Endosulfan-II • p,p'-DDT • Siarczan endosulfanu • p,p'-metoksychlor • Mirex 	<ul style="list-style-type: none"> • Naftalen • Acenaftylen • Acenaften • Fluoren • Fenantren • antracen • Fluoranten • Pirenej • Benz[a]antracen • Chryzen • Benzo[b]fluoranten • Benzo[k]fluoranten • benzo[a]piren • Indeno[1,2,3-cd]piren • Dibenzo[a,h]antracen • Benzo[g,h,i]perylene • bifenyl • dibenzofuran • C1-naftaleny • C2-naftaleny • C3-naftaleny • C4-naftaleny • 1-metylnaftalen • 2-metylnaftalen • 2,6-dimetylnaftalen • 2,3,5-trimetylnaftalen • C1-fluoreny • C2-fluoreny • C3-fluoreny • 1-metylofluoren • dibenzotiofen • C1-dibenzotiofeny • C2-dibenzotiofeny • C3-dibenzotiofeny • C1-fenantreny/antraceny • C2-fenantreny/antraceny • C3-fenantreny/antraceny • C4-fenantreny/antraceny • 1-metylofenantren • C1-fluoranteny/pireny • C1-chryzeny • C2-chryzeny • C3-chryzeny • C4-chryzeny • benzo[e]piren
KONGENERY PCDD/PCDF	INNE
<ul style="list-style-type: none"> 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioksyna • 1,2,3,7,8-pentachloro-dibenzo-p-dioksyna • 1,2,3,4,7,8-heksachloro-dibenzo-p-dioksyna • 1,2,3,6,7,8-Heksachloro-dibenzo-p-dioksyna • 1,2,3,7,8,9-Heksachloro-dibenzo-p-dioksyna • 1,2,3,4,6,7,8-heptachloro-dibenzo-p-dioksyna • Oktachloro-dibenzo-p-dioksyna • 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran • 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran • 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran • 1,2,3,4,7,8-heksachlorodibenzofuran • 1,2,3,6,7,8-heksachlorodibenzofuran • 2,3,4,6,7,8-heksachlorodibenzofuran • 1,2,3,7,8,9-heksachlorodibenzofuran • 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzofuran • Oktachlorodibenzofuran 	<ul style="list-style-type: none"> • alletryna • Chlorpiryfos • Diazynon • Fenwalerat

4. TEZA ROZPRAWY

Kierując się przesłankami literaturowymi sformułowano następujące tezy pracy:

1. *Urządzenia z membraną półprzepuszczalną mogą być skutecznym narzędziem do zateżniania próbek wody in-situ w celu oceny jakości biologicznej wody przeznaczonej do spożycia, w której mikrozanieczyszczenia organiczne występują w bardzo niskich stężeniach.*
2. *Zastosowanie wybranych testów bioindykacyjnych (Microtox, SOS-Chromotest, UMU-Chromotest) pozwala zminimalizować objętość próbki niezbędnej do określenia jakości biologicznej próbek wody zateżnionych przy pomocy urządzeń z membraną półprzepuszczalną.*

5. CELE I ZAKRES BADAŃ

Głównym celem przedstawionych badań była ocena przydatności urządzeń z membraną półprzepuszczalną do poboru próbek wody wodociągowej pochodzących z różnych etapów uzdatniania do analiz toksyczności i genotoksyczności zawartych w nich mikrozanieczyszczeń organicznych. Wyodrębniono następujące cele jednostkowe:

1. Określenie wpływu procesów uzdatniania na stężenie w wodzie wodociągowej wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) lotnych związków organicznych (LZO) oraz pestycydów chloroorganicznych (PCO).
2. Ocena zmienności występowania i stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), lotnych związków organicznych (LZO) oraz pestycydów chloroorganicznych (PCO) w zależności od pory roku.
3. Analiza toksyczności i genotoksyczności mikrozanieczyszczeń obecnych w próbkach.

Zakres badań obejmował:

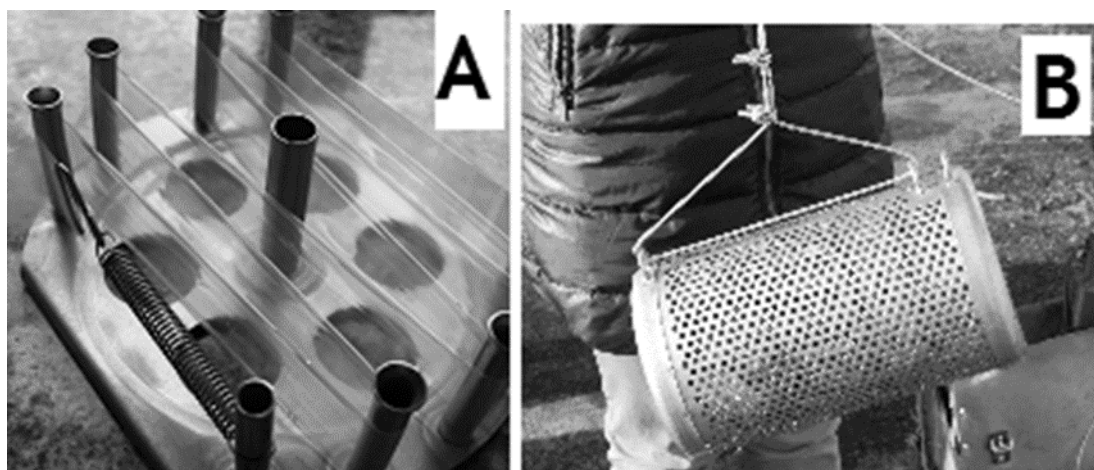
- Pobór próbek wody w Zakładzie Uzdatniania Wody „Mokry Dwór” z jednoczesnym ich zateżeniem *in-situ* przy pomocy urządzeń z membraną półprzepuszczalną przez okres jednego roku z comiesięczną wymianą membrany w czterech punktach:
 - A. Dopływ wody surowej,
 - B. Strumień wody w rurze tuż przed ozonowaniem,
 - C. Zbiornik wody czystej,
 - D. Woda po przejściu przez system dystrybucji.
- Określenie występowania i stężenia wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), lotnych związków organicznych (LZO) oraz pestycydów chloroorganicznych (PCO) w próbkach wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania.
- Analizę toksyczności mikrozanieczyszczeń organicznych obecnych w próbkach za pomocą testu Microtox.
- Analizę genotoksyczności mikrozanieczyszczeń organicznych obecnych w próbkach za pomocą testów SOS-Chromotest oraz UMU-Chromotest.
- Określenie korelacji pomiędzy stężeniem wybranych mikrozanieczyszczeń a toksycznością i genotoksycznością próbek.
- Ocenę zmienności występowania i stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), lotnych związków organicznych (LZO) oraz pestycydów chloroorganicznych (PCO) w zależności od pory roku.

6. MATERIAŁY I METODY

6.1. POBIERANIE PRÓBEK

Pobór próbek przeprowadzono przy współpracy z MPWiK S.A., Centrum Nowych Technologii. Próbki do analiz pobierano od Lutego 2016 do Stycznia 2017 w Zakładzie Uzdatniania Wody "Mokry Dwór", zlokalizowanym na Dolnym Śląsku w okolicach Wrocławia, który zasilany jest wodą z rzeki Oławy.

Urządzenia z membraną półprzepuszczalną (SPMD) o standardowej konfiguracji (długość: 91,4 cm, szerokość: 2,5 cm, grubość membrany: 70-95 μm , 1 ml trioleiny o 99% czystości) z firmy ExposMeter AB (Tavelsjő, Szwecja) przymocowano do metalowych chwytaków, tak aby zapewnić maksymalną powierzchnię adsorpcyjną i umieszczono w perforowanych pojemnikach ze stali nierdzewnej (Rysunek 3). Tak przygotowane urządzenia zamontowano w Zakładzie Uzdatniania Wody.



Rys. 3. Montaż urządzenia z membraną półprzepuszczalną
A: na chwytaku, B: w perforowanym pojemniku

W pierwszej połowie roku (luty-czerwiec) próbki były pobierane w trzech miejscach:

A- pompownia „Czechnica” będąca wejściem wody surowej,

B- rurociąg jako strumień wody bezpośrednio przed ozonowaniem,

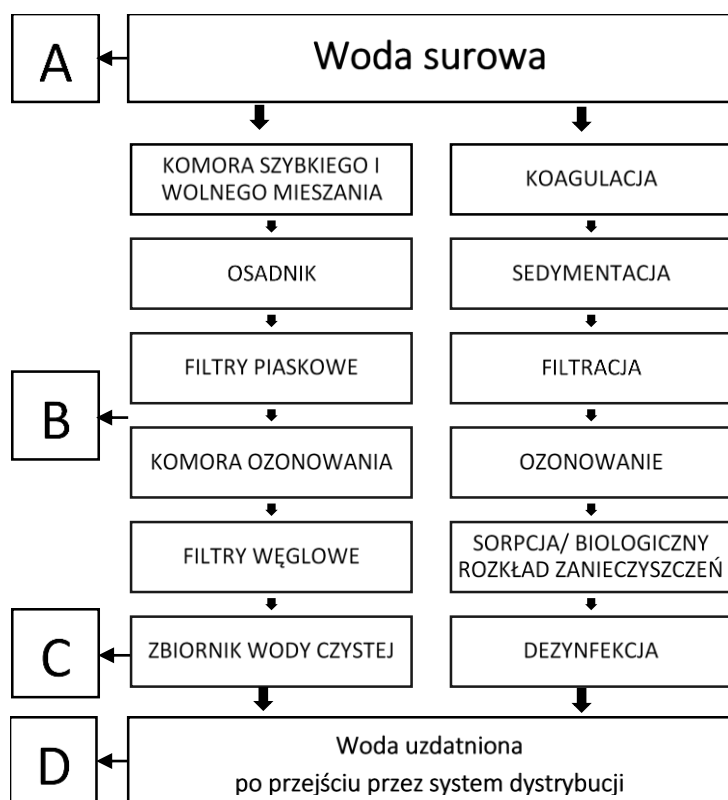
C- zbiornik wody czystej, w którym znajduje się woda po kompletnym uzdatnieniu.

Następnie, aby rozszerzyć zakres badań, w drugiej połowie roku (lipiec-grudzień) zdecydowano się dodać czwarty punkt:

D- strumień bieżącej wody z kranu jako punkt odpowiadający uzdatnionej wodzie po przejściu przez system dystrybucji.

Układ technologiczny stosowany w zakładzie uzdatniania wody „Mokry Dwór” przedstawiono na Rysunku 4. Charakterystykę miejsc pobierania próbek opisano poniżej w Tabeli 4. Niestety, ze względu na problemy technologiczne, które pojawiły się podczas badań, konieczne było zrezygnowanie z punktu B, począwszy od września 2016.

Po miesiącu przebywania w wodzie urządzenia z membraną zastępowano nowymi, w związku z czym każda membrana reprezentowała stan wody w danym miesiącu. Wyjątek stanowiły membrany oznaczone „III-IV”, które z powodu problemów technicznych w ZUW pozostawiono w wodzie przez osiem tygodni. Montowano po dwie membrany na każdy punkt pobierania próbek. Dodatkowo, w trakcie montażu przy każdym punkcie pomiarowym wystawiano na ekspozycje również środowiskowe membrany kontrolne, mające na celu ocenę wpływu adsorpcji hydrofobowych związków z powietrza w trakcie instalacji urządzeń. Szczegółowy opis pobieranych próbek zawarto w Tabeli 5.



Rys. 4. Układ technologiczny stosowany w Zakładzie Uzdatniania Wody „Mokry Dwór”, z wybranymi punktami pobierania próbek (A-D)

Tabela 4. Charakterystyka punktów pobierania próbek

Miejsce pobierania próbek	Oznaczenie stosowane w opisie wyników	Charakterystyka
POMPOWNIĄ „CZECHNICA”: wejście wody surowej	A	Miejscem, w którym rozpoczyna się proces uzdatniania wody w zakładzie „Mokry Dwór”, jest pompownia „Czechnica”, zasilana wodą powierzchniową, bez żadnego wstępnego oczyszczania, z rzeki Oławy. Rzeka ma długość 99 km, a powierzchnia zlewni wynosi 1167,4 km ² . Źródło rzeki leży na Przedgórzu Sudeckim na wysokości około 315 m n.p.m. Skład wody w rzece Oławie jest silnie zależny od pór roku i warunków atmosferycznych. Woda charakteryzuje się wysoką zawartością rozpuszczonych związków organicznych, koloidów i zawiesin. W przeciwieństwie do wód infiltrowanych lub gruntowych, zawiera niewielką ilość minerałów, takich jak mangan i żelazo.
RUROCIĄG: woda po filtracji na filtrach piaskowych, bezpośrednio przed dezynfekcją ozonem	B	Strumień wody opuszczający filtry piaskowe jest pozbawiony zawiesin, zarówno tych dopływających w wodzie surowej, jak i tych powstałych podczas procesu koagulacji. W wodzie natomiast dalej znajdują się rozpuszczone związki organiczne, wpływające na smak i zapach. Aby skutecznie usunąć je na filtrach węglowych, stosowane jest ozonowanie, które zwiększa biodegradowalność związków organicznych, rozbijając je na mniejsze cząsteczki. Powstałe podczas ozonowania uboczne produkty dezynfekcji (ozonowanie nie jest stosowane w układzie w celu dezynfekcji strumienia) są adsorbowane na złożu węglowym (przez pierwszy okres jego eksploatacji) lub rozkładane przez biomasę w złożu (przez kolejny okres pracy filtra).
ZBIORNIK WODY CZYSTEJ: woda po całkowitym uzdatnieniu	C	W zbiorniku wody czystej znajduje się strumień po całkowitym uzdatnieniu oraz dezynfekcji dwutlenkiem chloru. Woda ta spełnia wymogi stawiane wodzie przeznaczonej do spożycia, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia. Dawka środków dezynfekujących dozowanych przed zbiornikiem wody czystej musi być odpowiednio duża, by uniemożliwić wtórne zanieczyszczenie w sieci wodociągowej. Ze zbiornika woda jest bezpośrednio pobierana i pompowana do sieci wodociągowej.
STRUMIEŃ BIEŻĄCEJ WODY W KRANIE: woda po przejściu przez system dystrybucji	D	Pomimo ciągłego ulepszania metod uzdatniania wody (modyfikacja procesów i układów technologicznych) nie ma gwarancji chemicznej oraz biologicznej stabilności wody wpływającej do systemu zaopatrzenia w wodę (Kowal i in. 2007). Powoduje to, że jakość uzdatnionej wody po przejściu przez system dystrybucji do odbiorcy często różni się od jakości wody opuszczającej zakład uzdatniania z powodu ponownego zanieczyszczenia.

Tabela 5. Stosowane w rozprawie oznaczenia próbek wraz z opisem

Stosowane oznaczenia	Opis próbki
Hex	Odparowany n-heksan, w ilości odpowiadającej zastosowanemu rozpuszczalnikowi w trakcie dializy (próbka wykonana w celu sprawdzenia wpływu potencjalnych zanieczyszczeń obecnych w rozpuszczalniku)
0 K	Próbka wykonana z czystej, nieużywanej membrany SPMD, poddana czyszczeniu i dializie w identycznych warunkach jak próbki środowiskowe (wykonana w celu sprawdzenia wpływu potencjalnych zanieczyszczeń obecnych w membranie przed jej użyciem)
II A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana w lutym 2016
II B	Próbka pochodząca z punktu B: rurociąg, pobierana w lutym 2016
II C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana w lutym 2016
III-IV A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana w marcu i kwietniu 2016
III-IV B	Próbka pochodząca z punktu B: rurociąg, pobierana w marcu i kwietniu 2016
III-IV C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana w marcu i kwietniu 2016
V A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana w maju 2016
V B	Próbka pochodząca z punktu B: rurociąg, pobierana w maju 2016
V C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana w maju 2016
VI A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana w czerwcu 2016
VI B	Próbka pochodząca z punktu B: rurociąg, pobierana w czerwcu 2016
VI C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana w czerwcu 2016
VII A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana w lipcu 2016
VII B	Próbka pochodząca z punktu B: rurociąg, pobierana w lipcu 2016
VII C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana w lipcu 2016
VII D	Próbka pochodząca z punktu D: woda po przejściu przez system dystrybucji, pobierana w lipcu 2016
VIII A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana w sierpniu 2016
VIII B	Próbka pochodząca z punktu B: rurociąg, pobierana w sierpniu 2016

VIII C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana w sierpniu 2016
VIII D	Próbka pochodząca z punktu D: woda po przejściu przez system dystrybucji, pobierana w sierpniu 2016
IX A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana we wrześniu 2016
IX C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana we wrześniu 2016
IX D	Próbka pochodząca z punktu D: woda po przejściu przez system dystrybucji, pobierana we wrześniu 2016
X A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana w październiku 2016
X C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana w październiku 2016
X D	Próbka pochodząca z punktu D: woda po przejściu przez system dystrybucji, pobierana w październiku 2016
XI A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana w listopadzie 2016
XI C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana w listopadzie 2016
XI D	Próbka pochodząca z punktu D: woda po przejściu przez system dystrybucji, pobierana w listopadzie 2016
XII A	Próbka pochodząca z punktu A: pompownia- wejście wody surowej, pobierana w grudniu 2016
XII C	Próbka pochodząca z punktu C: zbiornik wody czystej, pobierana w grudniu 2016
XII D	Próbka pochodząca z punktu D: woda po przejściu przez system dystrybucji, pobierana w grudniu 2016

6.2. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZ

Po upływie miesiąca od montażu SPMD były wyciągane z wody i transportowane w chłodzonych pojemnikach do laboratorium, gdzie przeprowadzano czyszczenie mechaniczne i chemiczne, zgodnie z zaleceniami producenta. Wszystkie stosowane rozpuszczalniki były czystości analitycznej. Membrany zostały umieszczone w strumieniu bieżącej wody i energicznie wyszorowane miękką szczoteczką. Następnie SPMD zanurzono w mieszaninie 1M HCl, wody oraz n-heksanu, po czym przemywano kolejno wodą, acetonem i izopropanolem. Po oczyszczeniu wykonano dializę zgodnie z procedurą SOP E-15 (Schaefer et al., 2009), i dobrą praktyką SPMD (Alvarez, 2010a). Każdą SPMD umieszczono osobno w szklanym, szczelnie zamykanym słoiku, w którym znajdowało się 130 ml n-heksanu i umieszczono w temperaturze 18°C na 18 godzin. Po upływie tego czasu dializat z każdej SPMD przelano do osobnych szklanych butelek, a do słoików wlało dodatkowe 130 ml rozpuszczalnika i kontynuowano inkubację przez kolejne 8 godzin. Po inkubacji złączono oba dializaty dla każdej próbki, a następnie każdy z nich podzielono na trzy równe części, tak aby mogły one posłużyć do różnych analiz. Następnie n-heksan został całkowicie odparowany na rotacyjnej wyparce próżniowej (57°C, 500 Pa, 130 rpm), a kolbki z ekstraktami przechowywano w temperaturze -10°C do czasu przeprowadzenia analiz. Jednakowe procedury przeprowadzono dla środowiskowych membran kontrolnych oraz fabrycznie nowej, nieużywanej membrany. W celu oceny wpływu rozpuszczalnika, n-heksan w ilości odpowiadającej ilości użytej na jedną membranę wlało do kolb okrągłodennych i również odparowano.

6.3. ANALIZY CHEMICZNE

6.3.1. Analiza ilościowa wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych

Analizę obecności i ilości szesnastu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w pobranych próbkach wody z różnych etapów uzdatniania wykonano przy współpracy z Zakładem Szkodliwości Chemicznych i Toksykologii Genetycznej (Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec).

Suche ekstrakty zalano 4 ml cykloheksanu, następnie odparowano do sucha w atmosferze azotu i zalano 1 ml acetonitrylu. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) oznaczono techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją

fluoroscencyjną na chromatografie ciekowym AT 1200 firmy Agilent Technologies z detektorem fluoroscencyjnym oraz detektorem spektrofotometrycznym DAD. Listę analizowanych związków wraz z ich wybranymi właściwościami przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Lista analizowanych szesnastu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz ich wybrane właściwości

Związek	Skrót	Numer CAS ^a	M(g/mol) ^b	Log K _{ow} ^c	Rozpuszczalność w wodzie (25°C) (ng/L)	Kancerogenność ^d
Acenaften	Ac	83-32-9	154	4.33	3900000	3
Acenaftylen	Ace	208-96-8	152	4.07	3930000	-
Antracen	A	120-12-7	178	4.54	73000	3
Benzo [a] antracen	B[a]A	56-55-3	228	5.91	14000	2B
Benzo [a] piren	B[a]P	50-32-8	252	6.35	3800	1
Benzo [b] fluoranten	B[b]F	205-99-2	252	5.78	1200	2B
Benzo [g, h, i] perylen	B[g,h,i]P	191-24-2	276	6.9	260	3
Benzo [k] fluoranten	B[k]F	207-08-9	252	6.2	550	2B
Chryzen	Chr	218-01-9	228	5.61	2000	2B
Dibenzo [a, h] antracen	D[a,h]A	53-70-3	278	6.86	500	2A
Fluoranten	Flu	86-73-7	202	5.22	260000	3
Fluoren	Fl	86-73-7	166	4.18	1980000	3
Indeno [1,2,3-c, d] piren	I[c,d]P	193-39-5	276	6.75	62000	2B
Naftalen	N	91-20-3	128	3.37	31700000	2B
Fenantren	Phe	85-01-8	178	4.46	1290000	3
Piren	Pyr	129-00-0	202	5.3	135000	3

^a oznaczenie numeryczne przypisane substancji chemicznej przez amerykańską organizację Chemical Abstracts Service (CAS),

^b masa cząsteczkowa

^c Współczynnik podziału woda-oktanol (Huckins et al. 1999)

^d Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC): Grupa 1 - substancje rakotwórcze dla człowieka, Grupa 2B - substancje możliwie rakotwórcze dla człowieka, Grupa 3 - substancje niemożliwe do zaklasyfikowania jako rakotwórcze dla człowieka (IARC, 2010)

Odczynniki, roztwory i materiały:

- acetonitryl o czystości do HPLC
- cykloheksan o czystości do HPLC
- azot sprężony o czystości 5.0
- woda o czystości do HPLC
- mieszanina wzorców WWA (EPA 610 PAH Mix; Supelco)

Aparatura i przyrządy:

- chromatograf ciekłowy AT 1200 firmy Agilent Technologies z detektorem fluorescencyjnym
- łaźnia ultradźwiękowa

Warunki pracy chromatografu ciekłowego:

- rozdział na kolumnie chromatograficznej:
Zorbax Eclipse PAH 5,0 μm ; 150x4,6 mm firmy Agilent Technologies
- objętość nastrzyku 10 μl
- elucja gradientowa acetonitryl/woda
 - 50:50 1 min
 - 100:0 16 min
 - 100:0 25 min
 - 50:50 30 min
- temp. kolumny: 30 $^{\circ}\text{C}$
- czas trwania analizy: 30 minut
- przepływ fazy ruchomej: 1 ml/minutę
- Parametry detektora fluorescencyjnego dł. fali Ex 229 nm; dł. fali Em. 400 nm

Najmniejsze stężenia WWA jakie można oznaczyć według opisanej metody (najniższe stężenia z zakresu krzywej kalibracyjnej) są umieszczone w Tabeli 7. Dokładność metody z analizy Certyfikowanego Materiału Odniesienia (SRM 1975) wyrażona jako procent odzysku wartości oczekiwanej wynosi 75,2-99,5%. Metoda opracowana w oparciu o:

- NIOSH 5506 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by HPLC (NIOSH 5506, 1998);
- „Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy” (Opracowanie zbiorowe, 2000);
- PN-Z-04240-5:2006 „Ochrona czystości powietrza: Badania zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych” (173. PN-Z-04240-5, 2006).

Tabela 7. Granica wykrywalności i granica oznaczalności wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oznaczanych na chromatografie ciekowym AT 1200 firmy Agilent Technologies z detektorem fluorescencyjnym

Związek	Skrót stosowany w tabelach	Granica wykrywalności [ug/ml]	Granica oznaczalności [ug/ml]
Naftalen	N	0,033	0,100
Acenaftylen	Ace	0,067	0,200
Acenaften	Ac	0,033	0,100
Fluoren	Fl	0,007	0,020
Fenantren	Fen	0,003	0,010
Antracen	A	0,003	0,010
Fluoranten	Flu	0,007	0,020
Piren	Pyr	0,003	0,010
Benzo[a]antracen	B[a]A	0,003	0,010
Chryzen	Chr	0,003	0,010
Benzo[b]fluoranten	B[b]F	0,007	0,020
Benzo[k]fluoranten	B[k]F	0,003	0,010
Benzo[a]piren	B[a]P	0,003	0,010
Dibenzo[a,h]antracen	D[a,h]A	0,007	0,020
Benzo[g,h,i]perylene	B[g,h,i]P	0,007	0,020
Indeno[1,2,3-c,d]piren	I[1,2,3-c,d]P	0,003	0,010

6.3.2. Analiza ilościowa pestycydów chloroorganicznych i lotnych związków organicznych

Suche ekstrakty w kolbkach okrągłodennych rozpuszczono w pentanie. Ścianki przemywano dwiema porcjami rozpuszczalnika o objętości 1,5 ml oraz jedną o objętości 1 ml. Rozpuszczone ekstrakty przeniesiono ilościowo do 5 ml kolbek miarowych i uzupełniono pentanem do kreski. Roztwór rozdzielono na dwie próbki i poddano analizie na zawartość szesnastu pestycydów chloroorganicznych (Tabela 8) metodą chromatografii gazowej z detektorem μ ECD oraz dziewięciu lotnych związków organicznych (Tabela 9) metodą chromatografii gazowej z detektorem MS.

Tabela 8. Wybrane pestycydy chloroorganiczne

Związek	Numer CAS ^a	M(g/mol) ^b	Log K _{ow} ^c	Rozpuszczalność w wodzie (25°C) (ng/L)	Kancerogenność ^d
Aldryna	309-00-2	364,91	3,01	20000	2A
alfa-endosulfan	59-98-8	406,93	4,74	320000	Brak danych
alfa-heksachlorocykloheksan (alfa-HCH)	319-84-6	290,83	3,80	2000000	2B
beta-endosulfan	33213-65-9	406,93	3,83	320000	Brak danych
beta-heksachlorocykloheksan (beta-HCH)	319-85-7	290,83	3,78	200000	2B
delta-heksachlorocykloheksan (delta-HCH)	319-86-8	290,83	4,14	31400000	2B
Dieldryna	60-57-1	380,91	5,40	186000	2A
Endryna	72-20-8	380,91	5,20	230000	3
Epoksyd heptachloru	1024-57-3	389,30	5,40	350000	Brak danych
delta-heksachlorocykloheksan (Lindan) (gamma-HCH)	58-89-9	290,83	3,72	7300000	1
Heksachlorobenzen (HCB)	118-74-1	284,77	5,73	4700	2B
Heptachlor	76-44-8	373,32	6,10	-	2B
Izodryna	465-73-6	364,91	6,75	14000	Brak danych
Dichlorodifenyldichloroetan (p, p' – DDD)	72-54-8	320,03	6,02	160000	3
Dichlorodifenyldichloroetylen (p, p' – DDE)	72-55-9	318,02	6,51	40000	
Dichlorodifenylotrichloroetan (p, p' – DDT)	50-29-3	354,48	6,91	25000	2A

^a oznaczenie numeryczne przypisane substancji chemicznej przez amerykańską organizację Chemical Abstracts Service (CAS)

^b masa cząsteczkowa

^c Współczynnik podziału woda-oktanol (Huckins et al. 1999)

^d Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC): Grupa 1 - substancje rakotwórcze dla człowieka, Grupa 2B - substancje możliwie rakotwórcze dla człowieka, Grupa 3 – substancje niemożliwe do zaklasyfikowania jako rakotwórcze dla człowieka (IARC, 2010)

Tabela 9. Wybrane lotne związki organiczne

Związek	Numer CAS ^a	M(g/mol) ^b	Log K _{ow} ^c	Rozpuszczalność w wodzie (25°C) (ng/L)	Kancerogenność ^d	T _{wrz}
Trichlorometan	67-66-3	119,37	1,97	7950000000	2B	61,2
Bromodichlorometan	75-27-4	163,82	2,00	3968000000	2B	90,0
Dibromochlorometan	124-48-1	208,28	2,16	2700000000	3	120,0
Tribromometan	75-25-2	252,73	2,40	3100000	3	149,1
1,2-Dichloroetan	107-06-2	98,95	1,48	8600000000	2B	83,5
Benzen	71-43-2	78,11	2,13	1790000000	1	80,1
Tetrachloroeten	127-18-4	165,83	3,40	2060000000	2A	121,1
Tetrachlorometan	56-23-5	153,82	2,83	7930000000	2B	76,7
Trichloroeten	79-01-6	131,38	2,61	1280000	1	87,2

^a oznaczenie numeryczne przypisane substancji chemicznej przez amerykańską organizację Chemical Abstracts Service (CAS)

^b masa cząsteczkowa

^c Współczynnik podziału woda-oktanol (Huckins et al. 1999)

^d Według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem (IARC): Grupa 1 - substancje rakotwórcze dla człowieka, Grupa 2B - substancje możliwe rakotwórcze dla człowieka, Grupa 3 – substancje niemożliwe do zaklasyfikowania jako rakotwórcze dla człowieka (IARC, 2010)

Jako granicę oznaczalności dla obu grup oznaczanych związków przyjęto najniższy punkt na krzywej kalibracyjnej. W przypadku pestycydów chloroorganicznych wynosił on 5,0 ng/ ml (25 ng w próbce), natomiast dla związków lotnych 0,4 µg/ ml (2 µg w próbce).

Identyfikacja pestycydów (potwierdzenie) przeprowadzono według zaleceń EN-EN ISO 6468:2002 stosując dwie różne kolumny chromatograficzne:

- Kolumna DB-35MS (30mx0,250x0,25µm)
- Kolumna HP-5MS (20mx0,180x0,18µm).

6.4. ANALIZY BIOLOGICZNE

Ze względu na opisane wcześniej liczne zalety testów krótkoterminowych, w tym przede wszystkim niewielką ilość próbki wymaganą do przeprowadzenia testu oraz krótki czas analizy, w celu określenia jakości biologicznej próbek wody zdecydowano się na przeprowadzenie testów Microtox, SOS-Chromotest oraz UMU-Chromotest.

Suche ekstrakty w kolbkach okrągłodennych, uzyskane po odparowaniu rozpuszczalnika na etapie przygotowania próbek, rozpuszczono w DMSO. Ścianki przemywano dwiema porcjami rozpuszczalnika o objętości 2,0 ml oraz jedną o objętości 1,0 ml. Rozpuszczone ekstrakty podzielono do analiz biologicznych: 2,5 ml zostało wykorzystane w teście toksyczności ostrej Microtox, 6x360 µl w teście genotoksyczności UMU-Chromotest oraz 6x10 µl w teście genotoksyczności SOS-Chromotest.

6.4.1. Analiza toksyczności testem Microtox™

Analiza przy użyciu Microtox™ Basic Test została przeprowadzona dla wszystkich próbek środowiskowych, a także dla membran kontrolnych i zastosowanych rozpuszczalników (DMSO, n-heksan), zgodnie z zaleceniami producenta (Gaudet i in., 1994). Do badań wykorzystano komercyjnie dostępny szczep bakterii *Aliivibrio fischeri* (producent: Modern Water). Dla każdej próbki (ekstrakty rozpuszczone w DMSO) wykonano 14 podwójnych rozcieńczeń wykorzystując 2% roztwór NaCl w wodzie dejonizowanej jako rozcieńczalnik, który stanowił również próbę kontrolną. Próbki we wszystkich rozcieńczeniach umieszczono w szklanych kuwetach ochłodzonych do temperatury 15°C. Następnie do kuwet dodano 10 µl roztworu bakterii. Intensywność luminescencji była mierzona przy zastosowaniu Microtox™ Model 500 Analyzer po 0-, 5- i 15-min czasie ekspozycji.

Do obliczeń stopnia inhibicji emisji światła badanych organizmów zastosowano następujące równania:

$$R_t = \frac{I_{ct}}{I_{c0}}$$

$$G_t = \frac{R_t \times I_{s0}}{I_{st}} - 1$$

$$\% \textit{inhibicji} = \frac{G_t}{1 + G_t} \times 100$$

gdzie:

R_t – korekta dla każdej inhibicji spowodowanej próbką kontroli negatywnej (próba ślepa)

I_{c0} , I_{ct} – maksymalna ilość światła wykryta w kontroli negatywnej odpowiednio po czasie początkowym 0 oraz po czasie t

I_{s0} , I_{st} – ilość światła wykryta w próbce wody odpowiednio po czasie początkowym 0 oraz po czasie t

G_t – stosunek utraconej luminescencji po czasie t do pozostałej w czasie t , co można przekształcić w % *inhibicji*.

Końcowe wyrażenie toksyczności badanych próbek przedstawia się jako EC_{50} , co oznacza Efektywne Stężenie (*ang. Effective Concentration*) próbek, które zmniejsza emisję światła organizmów testowych o 50%. Oblicza się je z regresji liniowej wykresu logarytmu stężeń oraz procentu inhibicji. W prezentowanych wynikach uzyskane wartości zostały wyrażone jako ilość trioleiny z membran SPMD mg/ml badanej próbki, powodująca spadek emisji światła o 50%. Następnie wyliczono ekwiwalent toksyczności określony jako $1/EC_{50}$, co zostało wykorzystane w reprezentacji graficznej przedstawionych danych. Powszechnie stosuje się również jednostki toksyczne TU (*ang. Toxic Unit*), będące wartością $1/EC_{50}$ pomnożoną przez 100, jednakże jako że w przeliczeniu na ilość trioleiny [mg/ml próbki] pozbyto się już wyrażenia %, w tym przypadku TU jest odpowiada parametrowi $1/EC_{50}$ [mg trioleiny/ml próbki].

Toksyczność próbek można również wyrazić jako V_{tox} (Koči i in., 2003), co jest rozumiane jako objętość rozcieńczalnika, która jest wymagana do rozcieńczenia wszystkich substancji toksycznych zaabsorbowanych w jednej membranie w trakcie jednego dnia przebywania w wodzie, aby osiągnąć wybrane stężenie, w tym wypadku EC_{50} . Im wyższy V_{tox} tym większa ilość absorbowanych substancji toksycznych, a tym samym większe zanieczyszczenie próbki. Zależność definiuje równanie:

$$V_{tox(50)} = \frac{1}{m \times EC_{50} \times d}$$

gdzie:

m – stężenie ekstrahowanych membran, wyrażone jako liczba membran w ml rozpuszczalnika (DMSO) (szt/ml),

EC₅₀ – efektywne stężenie próbki, które zmniejsza emisję światła organizmów testowych o 50%

d – czas przebywania SPMD w wodzie (dni).

6.4.2. Analiza genotoksyczności testem SOS-Chromotest

Test SOS-Chromotest przeprowadzono zgodnie z wytycznymi producenta (Environmental Bio-detection Products Inc., Ontario, Kanada) na 96-mikrodołkowych jałowych, jednorazowych płytkach. Jako że wiele związków chemicznych pozostaje nieaktywnych aż do przetworzenia przez odpowiedni system aktywacji metabolicznej, analizę wykonano w dwóch wariantach:

- 1) bez aktywacji metabolicznej (-S9),
- 2) z aktywacją metaboliczną przy zastosowaniu frakcji post-mitochondrialnej pochodzącej z wątroby szczura (S9), traktowanej środkiem indukującym enzymy Aroclor 1254 (+S9).

W dniu poprzedzającym planowaną analizę odpowiednio przygotowano bakterie poprzez przeniesienie w sterylnych warunkach medium wzrostowego do fiolki, w której znajdowały się liofilizowany szczep *Escherichia coli*. Bakterie inkubowano przez 15 godzin w temperaturze 37°C.

Dla każdej próbki środowiskowej, próbek kontrolnych oraz zastosowanych rozpuszczalników w objętości 10 µl/dołek przygotowano siedem podwójnych rozcieńczeń w trzech powtórzeniach. Analizy prowadzono w obecności pozytywnej i negatywnej próby kontrolnej. W przypadku testu prowadzonego bez aktywacji metabolicznej kontrolą pozytywną był 1-tlenek 4-nitrochinoliny (4-NQO) w stężeniu 1 µg/ml i jego sześć podwójnych rozcieńczeń w dwóch powtórzeniach. Negatywną kontrolną był rozcieńczalnik. W przypadku testu prowadzonego z aktywacją metaboliczną kontrolą pozytywną był 2-amino-antracen (2-AA) w stężeniu 1 µg/ml i jego sześć podwójnych rozcieńczeń w dwóch powtórzeniach. Kontrolą negatywną był rozcieńczalnik (DMSO). Do wszystkich dołek zawierających materiał testowy dodawano po 100µl hodowli bakteryjnej i inkubowano przez 2 h w t temperaturze 37°C. Po tym czasie do dołek dodawano substrat fosfatazy alkalicznej w obecności niebieskiego chromogenu, a zmiana natężenia barwy związana z aktywnością enzymu β-galaktozydazy

mierzona była w spektrofotometrze mikroplótkowym (TECAN Magellan™). Wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm dla oznaczenia aktywności enzymatycznej oraz 420 nm dla określenia żywotności bakterii. Pomiar absorbancji wykonano w czasie t=0 i t=90 min od dodania substratu fosfatazy alkalicznej, po dodaniu roztworu zatrzymującego reakcję.

Na podstawie pomiarów absorbancji dla wszystkich próbek we wszystkich analizowanych stężeniach wyznaczono współczynnik indukcji- **IF** (*Induction Factor*):

$$IF = \frac{\beta - gal}{G}$$

gdzie:

$\beta - gal$ - aktywność β -galaktozydazy:

$$\beta - gal = \frac{A_{600S} - A_{600B}}{A_{600N} - A_{600B}}$$

A_{600S} - absorbancja próbki długości fali 600 nm

A_{600B} - absorbancja próbki ślepej (blank) przy długości fali 600 nm

A_{600N} - absorbancja kontroli negatywnej przy długości fali 600 nm

G -Współczynnik wzrostu bakterii:

$$G = \frac{A_{420S} - A_{420B}}{A_{420N} - A_{420B}}$$

A_{420S} - absorbancja próbki przy długości fali 420 nm

A_{420B} - absorbancja próbki ślepej (blank) przy długości fali 420 nm

A_{420N} - absorbancja kontroli negatywnej przy długości fali 420 nm.

Jako że genotoksyczne działanie związków chemicznych hamuje wzrost bakterii i ekspresję enzymatyczną, należało również dobrać wartość przeżywalności organizmów testowych, poniżej której próbka jest zbyt cytotoksyczna, a wyniki uznawane są za nieważne. Zgodnie z sugestią producenta testu do potwierdzenia wyniku dodatniego wymagany był

wskaźnik przeżywalności (*ang. Survival Rate*) wynoszący 80%, który został obliczony dla wszystkich próbek we wszystkich testowanych stężeniach na podstawie wzoru:

$$\text{Współczynnik przeżywalności \%} = \frac{A_{420S}}{A_{420N}} \times 100\%$$

W prezentacji wyników genotoksyczność badanych próbek została wyrażona jako współczynnik MIF, oznaczający maksymalny współczynnik indukcji uzyskany dla danej próbki (*ang. Maximum Induction Factor*). Próbki uznawane są za genotoksyczne, gdy $MIF > 1,5$.

6.4.3. Analiza genotoksyczności testem UMU-Chromotest

Test UMU-Chromotest przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta (Environmental Bio-detection Products Inc., Ontario, Kanada), bazującymi na normie ISO 138929. W teście wykorzystano 96-mikrodołkowe jałowe, jednorazowe płytki. Analogicznie jak w przypadku testu SOS-Chromotest analizę wykonano w dwóch wariantach:

- 1) bez aktywacji metabolicznej (-S9),
- 2) z aktywacją metaboliczną przy zastosowaniu frakcji post-mitochondrialnej pochodzącej z wątroby szczura (S9), traktowanej środkiem indukującym enzymy Aroclor 1254 (+S9).

W dniu poprzedzającym planowaną analizę przygotowano bakterie przenosząc w sterylnych warunkach medium wzrostowe do fiolki, w której znajdował się liofilizowany szczep *Salmonella typhimurium*. Bakterie inkubowano przez 15 godzin w temperaturze 37°C. Dla każdej próbki środowiskowej, próbek kontrolnych oraz zastosowanych rozpuszczalników w objętości 360 µl/dołek przygotowano cztery podwójne rozcieńczenia w trzech powtórzeniach. Analizy prowadzono w obecności pozytywnej i negatywnej próby kontrolnej. W przypadku testu prowadzonego bez aktywacji metabolicznej kontrolą pozytywną był 1-tlenek 4-nitrochinoliny (4-NQO) w stężeniu 1 µg/ml, natomiast w przypadku testu prowadzonego z aktywacją metaboliczną kontrolą pozytywną był 2-amino-antracen (2-AA) w stężeniu 1 µg/ml. Dla obu wariantów negatywną kontrolną był rozcieńczalnik (DMSO).

Do wszystkich dołków zawierających materiał testowy dodawano po 70 µl hodowli bakteryjnej i inkubowano przez 2 h w t temperaturze 37°C. Po inkubacji przeniesiono po 30 µl z każdego dołka na nowe płytki, które zawierały 270 µl medium wzrostowego z dodatkiem

glukozy w każdym dołku. W celu obliczenia wzrostu bakterii wykonano pomiar absorbancji przy długości fali 600 nm, po czym kontynuowano inkubację w 37°C przez 2h i ponownie zmierzono absorbancję próbek. Następnie przeniesiono 30 µl z każdego dołka na nową płytkę, która zawierała 120 µl B-buforu, po czym do dołków dodawano 30 µl ONPG (galaktozyd o-nitrofenylu) w obecności buforu fosforanowego i wymieszano. Płytki inkubowano przez 30 min do zaobserwowania żółtej barwy, po czym dodano roztwór zatrzymujący reakcję. Aktywność β-galaktozydazy mierzono w spektrofotometrze mikropłytkowym (TECAN Magellan™) przy długości fali 420 nm.

Na podstawie pomiarów absorbancji dla wszystkich próbek we wszystkich analizowanych stężeniach wyznaczono współczynnik indukcji- **IF** (*Induction Factor*):

$$IF = \frac{U_S}{G}$$

gdzie:

U_S - aktywność β-galaktozydazy (jednostki względne)

$$U_S = \frac{A_{420}S - A_{420}B}{A_{420}N - A_{420}B}$$

$A_{420}S$ - absorbancja próbki przy długości fali 420 nm

$A_{420}B$ - absorbancja próbki ślepej (blank) przy długości fali 420 nm

$A_{420}N$ - absorbancja kontroli negatywnej przy długości fali 420 nm.

G -Współczynnik wzrostu bakterii:

$$G = \frac{A_{600}S - A_{600}B}{A_{600}N - A_{600}B}$$

$A_{600}S$ - absorbancja próbki długości fali 600 nm

$A_{600}B$ - absorbancja próbki ślepej (blank) przy długości fali 600 nm

$A_{600}N$ - absorbancja kontroli negatywnej przy długości fali 600 nm

W porównaniu z testem SOS-Chromotest, w przypadku testu UMU-Chromotest dla potwierdzenia wyniku dodatniego wystarczający jest niższy wskaźnik przeżywalności (*ang. Survival Rate*) wynoszący 50%.

Analogicznie jak w przypadku SOS-Chromotest, w prezentacji wyników genotoksyczność badanych próbek została wyrażona jako współczynnik MIF, oznaczający maksymalny współczynnik indukcji uzyskany dla danej próbki (*ang. Maximum Induction Factor*). Za genotoksyczne uznawano próbki, dla których współczynnik MIF przekraczał wartość 1,5.

7. WYNIKI I Dyskusja

7.1. WIELOPIERŚCIENIOWE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE

Wyniki oznaczenia ilościowego szesnastu wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w próbkach wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania zestawiono w Tabeli 10. Od wartości uzyskanych dla poszczególnych próbek odjęto wartości uzyskane dla odpowiadających im środowiskowych membran kontrolnych.

Wyniki uzyskane dla n-heksanu, zastosowanego do przygotowania próbek do analizy (przepłukiwanie membran, dializa, rozpuszczanie analitów), pokazują, że nie miał on żadnych dodatkowych zanieczyszczeń, a jego wpływ na wyniki był znikomy. Podobne wnioski można wyciągnąć na podstawie analizy wyników otrzymanych dla czystych membran procesowych (proces blank membranes), które przeszły takie same procedury jak membrany zastosowane do poboru próbek. To pokazuje, że badany materiał nie został zanieczyszczony podczas przygotowywania próbek do analizy.

W analizowanych próbkach stwierdzono obecność 12 z 16 analizowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Przedstawione wyniki wskazują, że najczęściej występującymi WWA były fenantren i piren, które wykryto w prawie wszystkich próbkach, co może być związane z ich bardzo wysoką rozpuszczalnością w wodzie. Obecność tych związków stwierdzono we wszystkich próbkach wody surowej pobieranych w punkcie A oraz w większości próbek z punktów B (rurociąg) i D (woda u odbiorcy). W zbiorniku wody czystej (punkt C) zwykle występowały w bardzo niskich stężeniach, często na granicy wykrywalności. Z kolei najwyższe wartości stężenia stwierdzono w przypadku fluorantenu, jednak był on obecny tylko w wodzie surowej i na początkowych etapach procesu uzdatniania. Wraz z postępowaniem procesu uzdatniania następowało jego całkowite usunięcie, co zaobserwowano w całym okresie prowadzenia badań.

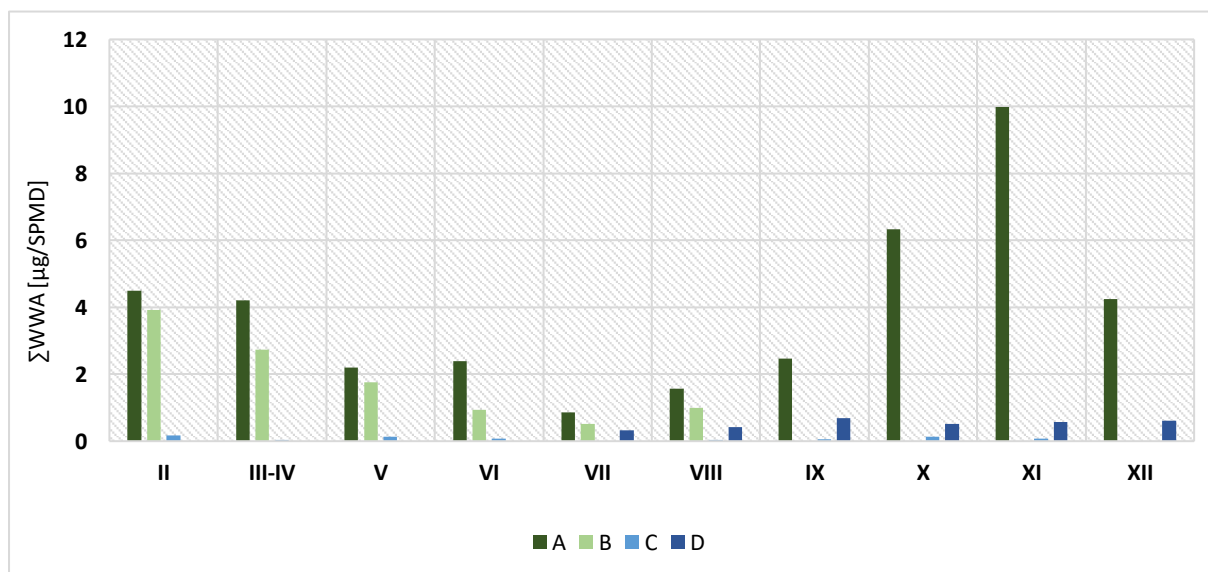
Sumę stężeń wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (Σ WWA) przedstawiono na Rysunku 5 i wynosiła od 0,869 do 9,982 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu A; 0,521 - 3,914 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu B; 0,000 - 0,168 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu C i 0,325 - 0,667 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu D. Między punktami A i B spadek sumy stężeń WWA jest niezauważalny, podczas gdy obniżenie stężenia jest widoczne między punktami B i C, po dezynfekcji ozonem.

Tabela 10. Stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oznaczanych ilościowo [µg/SPMD]

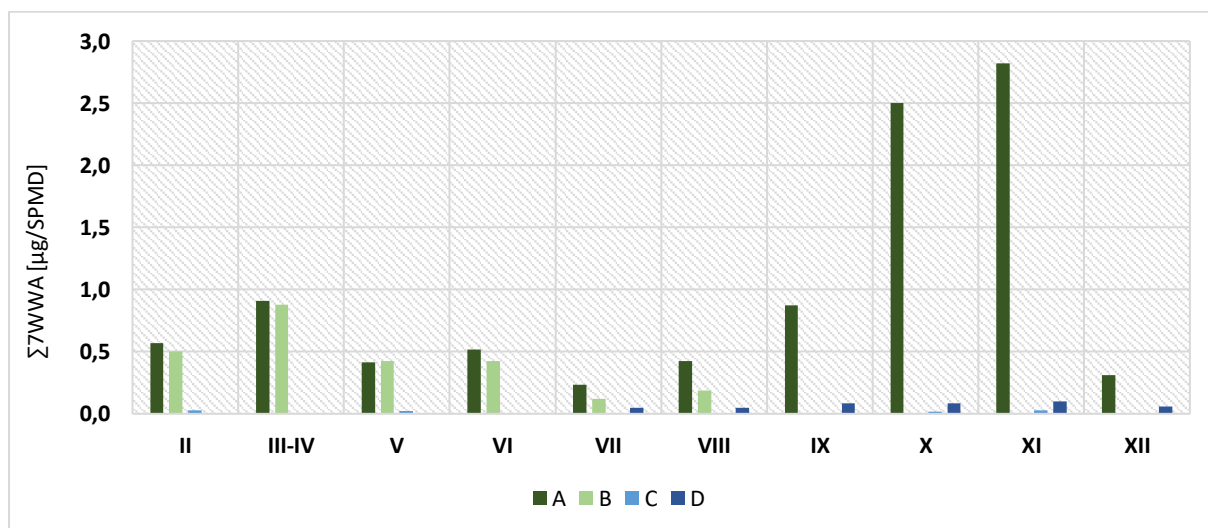
Oznaczenie próbki	Czas [dni]	Średnia T [°C]	A	Ac+Fl	Ace	B[a]A	B[a]P	B[b]F	B[g,h,i]P	B[k]F	Chr	D[a,h]A	Flu	I[c,d]P	N	Phe	Pyr	ΣWWA ^c	Σ7WWA ^d
Hex	-	-	- ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,024	0,026	0,050	0,000
0 K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,096	0,024	0,120	0,000
II A	33	4,5	0,018	-	-	0,145	-	0,054	-	0,024	0,178	-	2,114	0,020	0,148	0,980	0,818	4,499	0,569
II B	33	4,4	-	-	-	0,283	-	0,035	-	0,010	0,163	-	1,957	0,010	-	0,412	1,044	3,914	0,501
II C	33	4,9	-	-	-	-	-	0,028	-	-	-	-	0,060	-	-	0,080	-	0,168	0,028
III-IV A	64	8,6	-	-	-	0,260	0,078	0,100	-	0,076	0,342	-	1,800	0,054	-	0,390	1,104	4,204	0,910
III-IV B	64	8,5	-	-	-	0,320	0,020	0,088	-	0,072	0,346	-	1,212	0,030	-	0,000	0,642	2,730	0,876
III-IV C	64	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,000	0,032	0,032	0,000
V A	27	17,4	-	-	-	0,122	0,020	0,069	-	0,045	0,121	-	1,150	0,035	-	0,202	0,431	2,195	0,412
V B	27	16,8	-	-	-	0,077	-	0,127	-	0,058	0,14	-	1,012	0,022	-	0,101	0,228	1,765	0,424
V C	27	16,8	-	-	-	-	-	0,011	-	-	0,013	-	-	-	-	0,083	0,029	0,136	0,024
VI A	31	21,3	-	-	-	0,140	0,029	0,100	-	0,059	0,142	-	1,173	0,047	-	0,158	0,544	2,392	0,517
VI B	31	21,3	-	-	-	0,044	-	0,179	-	0,047	0,122	-	0,210	0,032	-	0,086	0,213	0,933	0,424
VI C	31	21,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,059	0,025	0,084	0,000
VII A	35	22,2	-	-	-	0,024	-	0,102	0,020	0,019	0,041	-	0,444	0,048	-	0,046	0,125	0,869	0,234
VII B	35	22,3	-	-	-	0,019	-	0,051	0,000 ^b	-	0,035	-	0,321	0,014	-	0,000	0,081	0,521	0,119
VII C	35	22,4	-	-	-	-	-	-	0,000	-	-	-	-	-	-	0,000	0,000	0,000	0,000
VII D	35	25,0	-	-	-	0,048	-	-	0,000	-	-	-	-	-	-	0,000	0,277	0,325	0,048
VIII A	28	20,8	-	-	-	0,111	0,014	0,133	0,056	0,044	0,092	-	0,581	0,031	-	0,126	0,385	1,573	0,425
VIII B	28	20,7	-	-	-	0,026	-	0,091	0,045	-	0,058	-	0,506	0,015	-	0,048	0,203	0,992	0,190
VIII C	28	20,4	-	-	-	-	-	-	0,039	-	-	-	-	-	-	0,000	0,000	0,039	0,000
VIII D	28	25,0	-	-	-	0,051	-	-	0,046	-	-	-	-	-	-	0,063	0,265	0,425	0,051
IX A	40	16,5	-	-	-	0,143	0,031	0,212	0,079	0,061	0,109	-	0,709	0,039	0,278	0,257	0,557	2,475	0,873
IX C	40	16,9	-	-	-	-	-	-	0,030	-	-	-	-	-	-	0,016	0,010	0,056	0,000
IX D	40	25,0	-	-	-	0,087	-	-	0,062	-	-	-	-	-	-	0,109	0,429	0,687	0,087
X A	36	8,2	0,167	-	-	0,108	-	0,108	0,081	0,021	0,080	-	1,206	0,014	2,172	1,767	0,605	6,329	2,503
X C	36	8,5	-	-	-	-	-	0,020	0,062	-	-	-	-	-	-	0,044	0,012	0,138	0,020
X D	36	25,0	-	-	-	0,082	-	-	0,040	-	-	-	-	-	-	0,027	0,364	0,513	0,082
XI A	32	3,8	0,254	-	-	0,200	0,026	0,056	0,048	0,024	0,148	-	3,066	0,019	2,349	2,104	1,688	9,982	2,822
XI C	32	4,1	-	-	-	-	-	0,027	0,029	-	-	-	-	-	-	0,024	-	0,080	0,027
XI D	32	25,0	-	-	-	0,075	-	-	-	-	-	-	-	0,024	-	0,092	0,374	0,565	0,099
XII A	36	1,1	0,091	-	-	0,141	-	0,043	0,066	0,013	0,103	-	1,951	0,013	0,000	0,996	0,832	4,249	0,313
XII C	36	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,000	-	-	0,000	-	0,000	0,000
XII D	36	25,0	0,013	-	-	0,061	-	-	0,056	-	-	-	-	-	-	0,084	0,400	0,614	0,061

^a - nie wykryto^b 0,000: dla próbek, w których stężenie WWA było ≤ stężenie w próbkach kontrolnych^c Σ WWA: Suma wszystkich wykrytych WWA^d Σ7WWA: Suma 7 WWA z grupy 1 i 2B klasyfikacji IARC: B [a] A, B [a] P, B [b] F, B [k] F, Chr, I [c, d] P, N

Całkowitą sumę stężeń rakotwórczych i potencjalnie rakotwórczych WWA ($\Sigma 7\text{WWA}$) przedstawiono na Rysunku 6 i wynosiła od 0,234 do 2,822 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu A, 0,119 - 0,876 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu B, 0,000 - 0,028 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu C oraz 0,048 - 0,099 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu D. Stężenie benzo [a] pirenu (najbardziej niebezpiecznego spośród analizowanych WWA) mieściło się w zakresie 0,000 - 0,078 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu A, 0,000-0,020 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ dla punktu B. Z kolei w punkcie C i D benzo [a] pirenu nie wykryto w żadnej próbce.

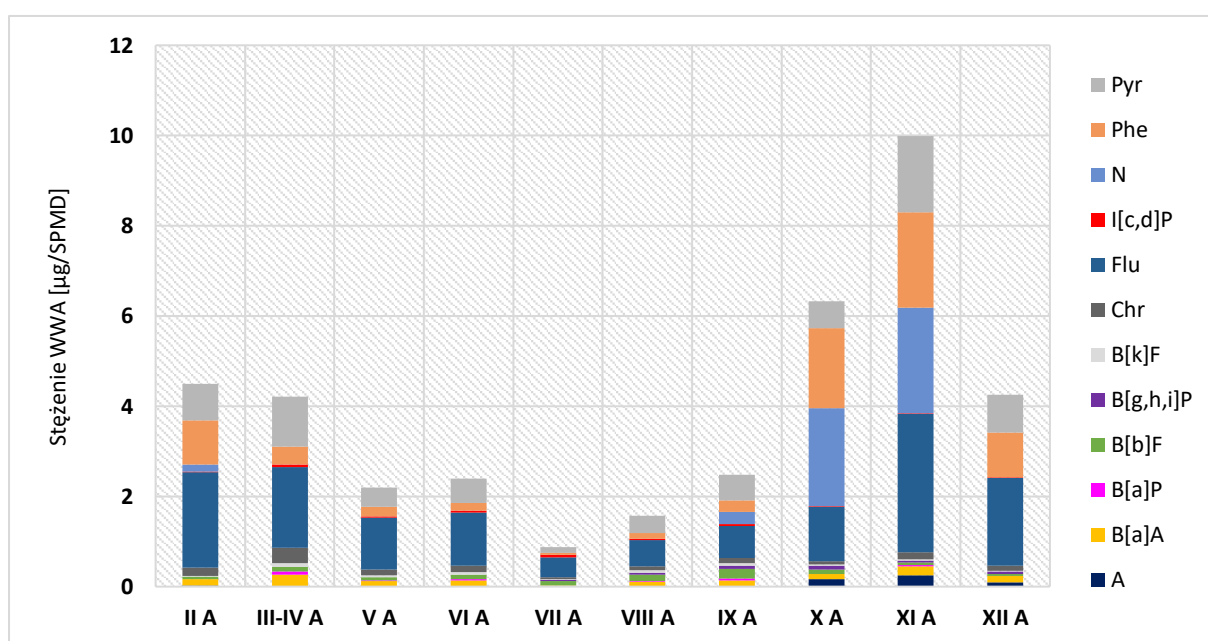


Rys.5. Suma stężeń wszystkich wykrytych WWA [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] w próbkach wody z różnych etapów uzdatniania (A: przepompownia - dopływ wody surowej; B: rurociąg - strumień wody tuż przed ozonowaniem; C: zbiornik czystej wody, D- bieżącą wodą w zlewie laboratoryjnym) w określonych miesiącach.



Rys. 6. Suma stężeń WWA z grupy 1 i 2B klasyfikacji IARC ($\Sigma 7\text{ WWA}$) [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] w próbkach z różnych etapów uzdatniania wody pitnej (A: przepompownia - wejście wody surowej; B: rurociąg - strumień wody tuż przed ozonowaniem; C: zbiornik czystej wody, D- woda bieżąca w zlewie laboratoryjnym) w poszczególnych miesiącach.

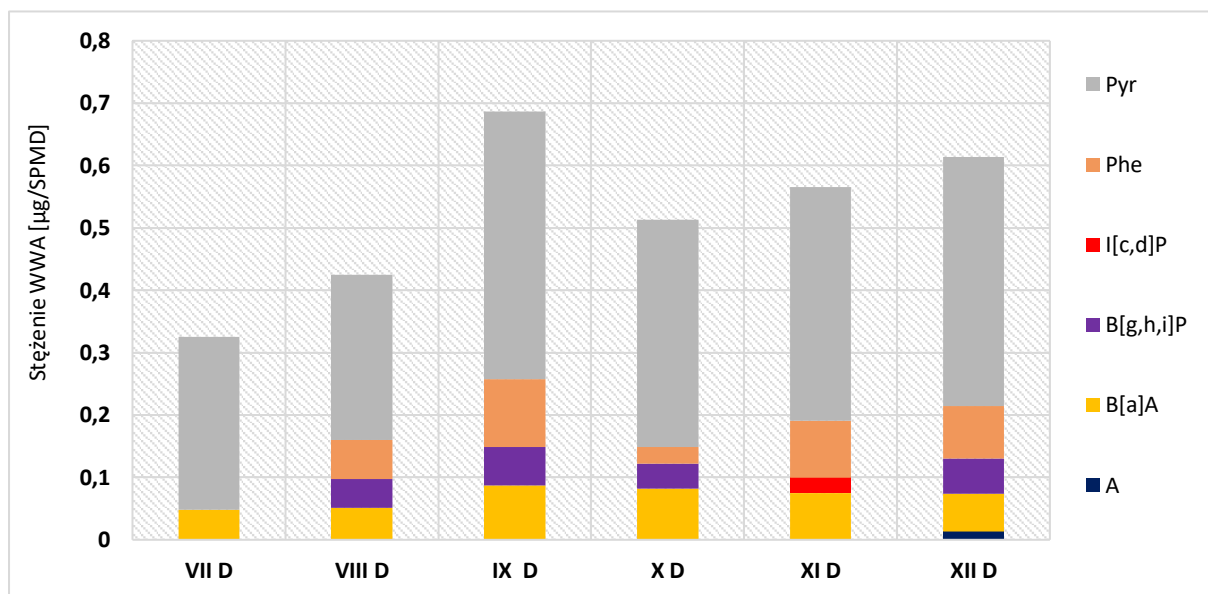
W wodzie surowej (punkt A) dominującym związkami były fluoranteny, którego obecność stwierdzono w każdej próbce. We wszystkich próbkach z całego roku pobranych w punkcie A wykryto również benzo[a]antracen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, chryzen, indeno[1,2,3-cd]piren, fenantren i piren. Zawartość poszczególnych WWA w wodzie surowej przedstawiono na Rysunku 7. Można zauważyć, że duży wpływ na całkowitą sumę \sum WWA ma naftalen, który wykryto w czterech próbkach z punktu A, przy czym w próbkach pochodzących z października i listopada (XA, XIA) były to znaczne ilości. Związek ten został jednak całkowicie usunięty już w początkowym etapie procesu uzdatniania wody, w związku z czym nie wykryto go w próbkach pochodzących z innych punktów poboru.



Rys. 7. Stężenie WWA [µg/SPMD] wykrytych w próbkach wody z punktu A (przepompownia - dopływ wody surowej) w określonych miesiącach.

W przypadku próbek uzdatnionej wody pobieranej u odbiorcy (punkt D) zaobserwowano wzrost stężenia niektórych WWA w stosunku do próbek pochodzących ze zbiornika wody czystej w stacji uzdatniania wody (punkt C). We wszystkich analizowanych próbkach z punktu D pojawił się piren i benzo[a]antracen, a także fenantren i benzo[g,h,i]perylen, które wykryto w większości próbek, zaś indeno[1,2,3-cd]piren i antracen tylko w próbkach pochodzących z jednego miesiąca, odpowiednio w XID i XIID (Rysunek 8). Co ciekawe, fluoranten, który jest najczęściej wykrywanym WWA w wodzie przeznaczonej do spożycia (WHO, 2011), nie został wykryty w żadnej próbce z punktu D. Dwa spośród wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych zidentyfikowanych w punkcie D

(benzo [a] antracen i indeno [1,2, 3-cd] piren) są potencjalnie rakotwórcze (grupa IARC 2B), jednakże ich stężenia były na tyle niskie, że nie powinny być powodem do niepokoju.

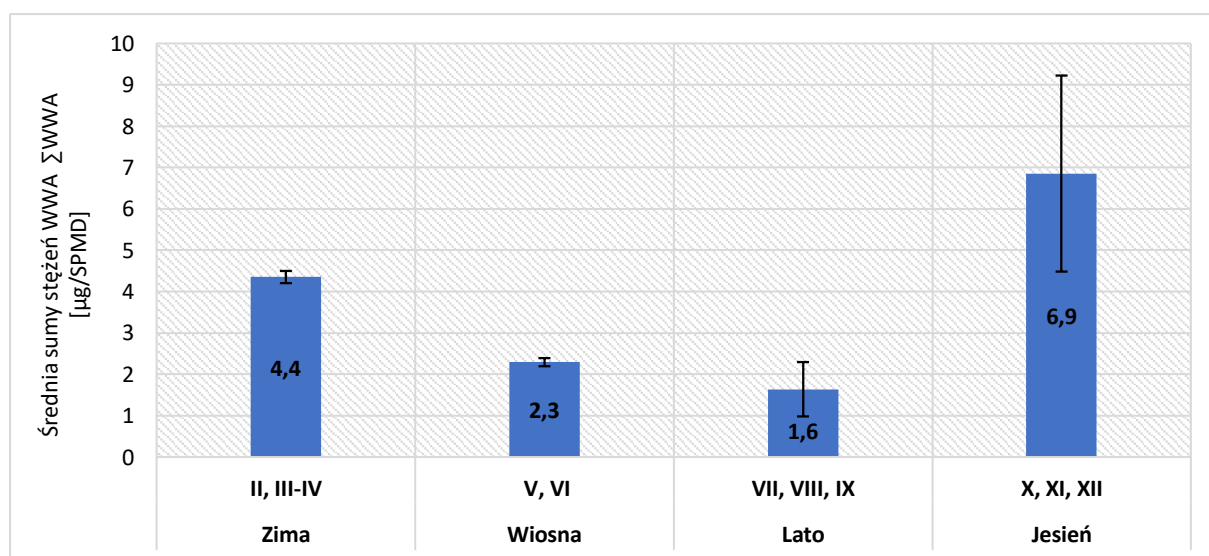


Rys. 8. Stężenie WWA [µg/SPMD] wykrytych w próbkach wody z punktu D (woda uzdatniona po przejściu przez system dystrybucji), w poszczególnych miesiącach.

Istnieje tylko kilka publikacji, z którymi można porównać wyniki pomiaru stężeń WWA na różnych etapach uzdatniania (Gilli i in., 2005; Nowacka i in., 2013; Nowacka i in., 2014; Nowacka i in., 2015a; Nowacka i in., 2015b), w tym tylko jedna z nich opisuje wyniki uzyskane przy zastosowaniu urządzeń z membraną półprzepuszczalną (Gilli i in., 2005). We wspomnianej publikacji Gilli i in. przedstawiają wyniki pomiaru stężeń WWA, uzyskane przy zastosowaniu chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS). Stężenie mikrozanieczyszczeń wyrażone zostało jako µg/mg trioleiny. W badaniach wykazano znaczący spadek stężenia poszczególnych WWA (w okresie badań wynoszącym trzy miesiące) w uzdatnionej wodzie, w stosunek do wody surowej, co odpowiada punktom A i C w prezentowanej pracy. Zmiana wyniosła 0,488 z 7,811 w październiku 2002 r., 0,928 z 3,864 w listopadzie 2002 r. oraz 0,821 z 257,043 w grudniu 2002 r. Z kolei badania przeprowadzone przez Nowacką i in. wykazują duże wahania stężeń WWA na różnych etapach uzdatniania wody. W rezultacie stężenie sumy Σ WWA w uzdatnionej wodzie (81,56 ng/L) w stosunku do wody surowej (96,31 ng/L) nie jest znacząco niższa. Ponadto między punktami reprezentującymi wodę surową i uzdatnioną znajdowało się również wiele dodatkowych punktów poboru próbek (po każdym etapie procesu oczyszczania). Można zauważyć bardzo duże różnice stężeń WWA w zależności od etapów uzdatniania wody oraz zastosowanych procesów. Należy zauważyć, że w badaniu zastosowano inną metodę poboru próbek niż

w niniejszej pracy. Pobrano został 1 l wody z każdego punktu, po czym przeprowadzono ekstrakcję do fazy stałej, a następnie analizę GC-MS w celu ustalenia stężenia WWA. Ponadto należy dodać, że badanie to przeprowadzono jednokrotnie w sezonie zimowym, w związku z czym autorka sugeruje przeprowadzenie podobnych badań również w innych porach roku (Nowacka i in., 2013). W dalszych badaniach Nowacka koncentruje się na procesie koagulacji, wykazując dużą korelację między rodzajem zastosowanego koagulantu a skutecznością usuwania poszczególnych WWA. Proces koagulacji przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych po jednorazowym pobraniu próbki z zakładu uzdatniania wody po procesie ozonowania w sezonie letnim (Nowacka i in., 2015b) i jesiennym (Nowacka i in., 2015a). Wydajność usuwania była różna dla poszczególnych WWA, a spadek stężenia sumy Σ WWA wynosił 44,4% (Nowacka i in., 2015b) i 46,4% (Nowacka i in., 2015a) dla najbardziej skutecznego koagulantu.

Wyniki uzyskane w niniejszej rozprawie wskazują na znaczne różnice sumy stężeń Σ WWA w wodzie surowej w próbkach pobieranych w różnych porach roku (Rysunek 9).



Rys. 9. Porównanie średniej sumy stężeń Σ WWA w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku

Do obliczenia średniej wartości stężenia dla zimy wzięto pod uwagę próbki IIA i III-IVA, próbki VA, VI A dla wiosny, VIIA, VIIIA i IXA dla lata oraz XA, XIA i XIIA dla jesieni. Najwyższe średnie stężenie uzyskano jesienią (6,853 µg/SPMD), a najniższe latem (1,639 µg/SPMD). Zakład uzdatniania wody zlokalizowany jest na bardzo dużym obszarze miejskim. W związku z tym prawdopodobną przyczyną tak wysokich wartości stężeń WWA w okresie jesienno-zimowym może być zwiększone stężenie produktów spalania w atmosferze w tym okresie wynikające z sezonu grzewczego.

Zbliżone rezultaty dotyczące zmian stężenia WWA w wodach powierzchniowych w zależności od pory roku uzyskał Amandy i in., który również pobierał próbki przy zastosowaniu SPMD. Badania dotyczyły próbek wody z rzeki Crocodile River w Republice Południowej Afryki. Najwyższe średnie stężenie sumy Σ WWA stwierdzono zimą i wynosiło 2,117 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$, kolejno jesienią (1,450 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$) i latem (0,984 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$), a najniższe wiosną (0,905 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$). Tak więc również w tym przypadku średnie stężenie sumy WWA okazało się być wyższe w przypadku sezonu jesienno-zimowego w porównaniu z wiosenno-letnim, nie mniej jednak różnica nie była aż tak wyraźna jak w przypadku wyników opisywanych w niniejszej rozprawie. Należy mieć na uwadze, że w opisywanym przez Amandy'ego regionie panują zupełnie inne warunki klimatyczne, w związku z czym powody zmian stężenia również są inne. Autor jako potencjalną przyczynę wysokich stężeń WWA odnotowanych w okresie zimowym wskazuje niski poziom opadów, co powoduje drastyczny spadek poziomu wody w rzece, a tym samym zwiększenie udziału procentowego uzdatnionych ścieków z oczyszczalni w Johannesburgu odprowadzanych do rzeki Crocodile River, z której pobierano analizowane próbki. Drugim czynnikiem mogącym według autora wpłynąć na zwiększenie stężenia WWA w okresie zimowym jest spadek temperatury na badanym obszarze, co z kolei ogranicza ich ulatnianie (Amandy i in, 2014).

Podobną korelację sezonową dla wód powierzchniowych wykazał również Kafizadeh, badając próbki wody z rzeki Soltan Abad (Iran), dla których stężenia były następujące: 12,64 ng/L jesienią, 9,54 ng/L zimą, 8,55 ng/L wiosną i 4,720 ng/L latem. Autor wspomina, że efekt ten można przypisać warunkom klimatycznym, efektowi fotooksydacji, ulatnianiu się i wysokiej degradacji podczas gorącego sezonu (Kafizadeh, 2015). Zupełnie inne wyniki uzyskali Karyab i Pan, którzy wykazali, że całkowite stężenia WWA wzrastają latem w porównaniu do zimy (Karyab i in., 2013; Pan i in., 2015).

Przedstawione wyniki wyraźnie wskazują, że podczas procesu uzdatniania wody, który jest stosowany w opisanym zakładzie uzdatniania wody, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne są usuwane w bardzo wydajny sposób. We wszystkich analizowanych miesiącach wraz z postępem procesu oczyszczania ilość każdego z WWA wykrytych w próbkach spadała, w większości przypadków nawet poniżej granicy oznaczalności metody analitycznej. Liczba, złożoność i stężenia WWA są zróżnicowane z każdym miesiącem. We wszystkich rozważanych miesiącach wraz z postępem procesu uzdatniania stężenie każdego wykrytego WWA spadło, w większości przypadków nawet poniżej granicy wykrywalności metody analitycznej. Niestety po przejściu przez system dystrybucji stężenie niektórych WWA nieznacznie wzrasta.

Przedstawione dane wskazują, że w okresie jesienno-zimowym występuje znaczny wzrost stężenia WWA w stosunku do okresu wiosenno-letniego, nie mniej jednak wniosek ten należy ograniczyć jedynie dla badanego regionu.

SZACUNKOWE STEŻENIE WWA W WODZIE

Do obliczenia średniej ważonej w czasie wartości stężenia (C_{TWA}) wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz pestycydów chloroorganicznych w wodzie wykorzystano arkusz kalkulacyjny Microsoft Excel stworzony przez Alvareza (Alvarez, 2010b). Narzędzie to wykorzystuje oryginalne modele przenikania związków przez SPMD oparte na kinetyce pierwszego rzędu. Kalkulator ten może być używany tylko wtedy, gdy w SPMD nie zostały zastosowane tak zwane PRC (ang. Performance Reference Compounds) będące wydajnościowymi związkami odniesienia i jest on ograniczony do substancji chemicznych, dla których częstości próbkowania zostały wyprowadzone eksperymentalnie (Alvarez, 2010b). Wspomniany arkusz kalkulacyjny wykorzystuje modele wczesnej absorpcji, w których każda faza krzywej absorpcji chemicznej (liniowa, krzywoliniowa i równowagowa) jest opisana za pomocą oddzielnych równań. Na podstawie stałej K_{SPMD} i okresu pobierania próbek oblicza się teoretyczny okres półtrwania ($t_{1/2}$) i określa się który model jest odpowiedni do obliczeń (Alvarez, 2010a). W przypadku prezentowanych badań wartości K_{SPMD} zaczerpnięto z publikacji Huckins'a (Huckins i in., 1999). Modele wykorzystywane w kalkulatorze są szeroko opisywane w literaturze (Anderson i in., 2008; Booi i in., 1998; Luellen i in., 2002; Rantalainen i in., 2000; Vrana i in., 2002). Zostały one podsumowane i szczegółowo opisane przez Huckins'a (Huckins i in., 2006).

Wyniki obliczeń średniej ważonej w czasie wartości stężenia (C_{TWA}), wyrażonej w ng/L, dla wszystkich wykrytych WWA (z wyłączeniem naftalenu, dla którego brak doniesień literaturowych umożliwiających wykonanie obliczeń) przedstawiono w tabeli 11. Jednakże należy mieć na uwadze, że są to jedynie wartości szacunkowe obliczone na podstawie danych eksperymentalnych uzyskanych przez innych autorów, więc ich interpretacja powinna mieć charakter jedynie pogładowy. W związku z tym dyskusja wyników przeprowadzona w niniejszej rozprawie odnosi się przede wszystkim do wyników wyrażonych w $\mu\text{g}/\text{SPMD}$, co było również zasugerowane przez recenzenta w czasopiśmie „Science of The Total Environment”, gdzie ukazały się opisywane wyniki stężeń WWA (Pogorzelec i in., 2018). Nie mniej jednak ogólny trend zmian stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w zależności od etapu procesu uzdatniania oraz wahań sezonowe dla obu

sposobów przedstawienia wyników pozostają zbieżne. Zgodnie w wytycznymi WHO w słabo zanieczyszczonych wodach powierzchniowych suma stężeń WWA powinna mieścić się w przedziale 50-250 ng/L, natomiast Typowy zakres sumy stężeń WWA w wodzie uzdatnionej przeznaczonej do spożycia wynosi około od 1 do 11 ng/L (WHO, 2011).

Tabela 11. Stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oznaczanych ilościowo [ng/L]

Oznaczenie próbki	Czas [dni]	Średnia T [°C]	A	B[a]A	B[a]P	B[b]F	B[g,h,i]P	B[k]F	Chr	Flu	I[c,d]P	Phe	Pyr	ΣWWA ^c	Σ6WWA ^d
II A	33	4,5	0,171	1,831	-	0,767	-	0,321	2,023	22,347	0,275	13,439	7,291	48,464	5,217
II B	33	4,4	- ^a	3,573	-	0,497	-	0,134	1,852	20,687	0,138	5,650	9,305	41,836	6,194
II C	33	4,9	-	-	-	0,398	-	-	-	0,634	0,000	1,097	-	2,129	0,398
III-IV A	64	8,6	-	1,693	0,522	0,732	-	0,524	2,004	4,856	0,384	6,870	2,563	20,147	5,859
III-IV B	64	8,5	-	2,083	0,134	0,645	-	0,496	2,027	3,270	0,213	0,000	1,490	10,358	5,598
III-IV C	64	8,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,000	0,074	0,074	0,000
V A	27	17,4	-	1,883	0,258	1,128	-	0,625	1,318	13,889	0,463	2,344	4,605	26,512	5,675
V B	27	16,8	-	1,188	-	2,075	-	0,806	1,525	12,222	0,291	1,172	2,436	21,715	5,885
V C	27	16,8	-	-	-	0,180	-	-	0,142	-	-	0,963	0,310	1,594	0,321
VI A	31	21,3	-	1,882	0,326	0,142	-	0,714	1,347	12,339	0,541	1,973	5,062	24,326	4,952
VI B	31	21,3	-	0,591	-	2,547	-	0,569	1,158	2,209	0,369	1,074	1,982	10,499	5,234
VI C	31	21,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,737	0,233	0,970	0,000
VII A	35	22,2	-	0,187	-	1,214	0,343	0,131	0,238	1,132	0,429	0,687	0,260	4,621	2,199
VII B	35	22,3	-	0,148	-	0,607	0,000 ^b	-	0,203	0,818	0,125	0,000	0,169	2,070	1,083
VII C	35	22,4	-	-	-	-	0,000	-	-	-	-	0,000	0,000	0,000	0,000
VII D	35	25,0	-	0,374	-	-	0,000	-	-	-	-	0,000	0,577	0,951	0,374
VIII A	28	20,8	-	1,652	0,174	2,096	1,250	0,590	0,966	6,766	0,395	1,492	3,966	19,348	5,874
VIII B	28	20,7	-	0,387	-	1,434	1,005	-	0,609	5,893	0,191	0,568	2,091	12,178	2,621
VIII C	28	20,4	-	-	-	-	0,871	-	-	-	-	0,000	0,000	0,871	0,000
VIII D	28	25,0	-	0,497	-	-	0,986	-	-	-	-	0,864	1,797	4,144	0,497
IX A	40	16,5	-	1,490	0,270	2,338	1,234	0,572	0,802	57,780	0,348	3,607	4,017	72,457	5,820
IX C	40	16,9	-	-	-	-	0,469	-	-	-	-	0,225	0,072	0,765	0,000
IX D	40	25,0	-	0,593	-	-	0,960	-	-	-	-	1,698	0,976	4,226	0,593
X A	36	8,2	1,663	1,250	-	1,406	1,776	0,257	0,833	11,686	0,177	25,115	4,943	49,106	3,924
X C	36	8,5	-	-	-	0,260	1,360	-	-	-	-	0,625	0,098	2,343	0,260
X D	36	25,0	-	0,621	-	-	0,667	-	-	-	-	0,407	0,773	2,468	0,621
XI A	32	3,8	2,364	2,604	0,348	0,820	1,184	0,331	1,734	33,423	0,270	28,470	15,515	87,063	6,108
XI C	32	4,1	-	-	-	0,396	0,716	-	-	-	-	0,325	-	1,436	0,396
XI D	32	25,0	-	0,639	-	-	-	-	-	-	0,234	1,332	2,219	4,424	0,874
XII A	36	1,1	0,906	1,632	-	0,560	1,447	0,159	1,073	18,905	0,164	14,156	6,797	45,800	3,588
XII C	36	1,5	-	-	-	-	-	-	-	0,000	-	0,000	-	0,000	0,000
XII D	36	25,0	0,146	0,462	-	-	0,933	-	-	-	-	1,267	0,849	3,658	0,462

^a –“: nie wykryto

^b 0,000: dla próbek, w których stężenie WWA było ≤ stężenie w próbkach kontrolnych

^c Σ WWA: Suma wszystkich wykrytych WWA z wyjątkiem naftalenu

^d Σ6WWA Suma 6 WWA z grupy 1 i 2B klasyfikacji IARC: B [a] A, B [a] P, B [b] F, B [k] F, Chr, I [c, d] P

7.2. PESTYCYDY CHLOROORGANICZNE

Przy pomocy chromatografii gazowej z detektorem μ ECD w badanych ekstraktach wykazano obecność 6 z 16 analizowanych pestycydów chloroorganicznych. W tabeli 12 przedstawiono wartość stężenia analitów dla poszczególnych próbek, uwzględniając jedynie te związki, których obecność stwierdzono przynajmniej w jednej próbce. Od wartości uzyskanych dla poszczególnych próbek odjęto wartości uzyskane dla środowiskowych membran kontrolnych.

Tabela 12. Stężenia wybranych pestycydów chloroorganicznych oznaczanych ilościowo [μ g/SPMD]

Oznaczenie próbki	Aldryna	beta-HCH	delta-HCH	Endryna	gamma-HCH (Lindan)	Heptachlor	Σ PCO
Hex	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0 K	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
II A	0,000	0,000	0,000	0,172	0,000	0,000	0,172
II B	0,000	0,000	0,000	0,118	0,000	0,000	0,118
II C	0,000	0,000	0,000	0,075	0,000	0,000	0,075
III-IV A	0,000	0,000	0,039	0,320	0,000	0,085	0,444
III-IV B	0,000	0,000	0,000	0,225	0,000	0,030	0,255
III-IV C	0,000	0,000	0,000	0,165	0,000	0,000	0,165
V A	0,000	0,000	0,000	0,135	0,000	0,035	0,170
V B	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,020	0,120
V C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
VI A	0,000	0,160	0,000	0,300	0,000	0,065	0,525
VI B	0,000	0,000	0,000	0,065	0,000	0,000	0,065
VI C	0,000	0,000	0,000	0,040	0,000	0,000	0,040
VII A	0,055	0,308	0,043	1,365	0,065	0,060	1,896
VII B	0,011	0,000	0,000	0,465	0,000	0,015	0,491
VII C	0,000	0,000	0,000	0,015	0,053	0,000	0,068
VII D	0,000	0,000	0,000	0,265	0,000	0,000	0,265
VIII A	0,000	0,235	0,000	0,650	0,053	0,125	1,063
VIII B	0,000	0,000	0,000	0,600	0,000	0,110	0,710
VIII C	0,000	0,000	0,000	0,375	0,000	0,030	0,405
VIII D	0,000	0,000	0,000	0,460	0,000	0,035	0,495
IX A	0,000	0,085	0,000	0,210	0,000	0,290	0,585
IX C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,135	0,135
IX D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,055	0,055
X A	0,000	0,221	0,000	0,305	0,053	0,160	0,739
X C	0,000	0,000	0,000	0,035	0,000	0,125	0,160
X D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,100
XI A	0,000	0,000	0,000	0,120	0,000	0,205	0,325
XI C	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,120	0,170
XI D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,115	0,115
XII A	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,110	0,210
XII C	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,015
XII D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Podobnie jak w przypadku analizy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych wyniki uzyskane dla n-heksanu, zastosowanego w przygotowaniu próbek do analizy oraz dla czystych membran procesowych (*ang. process blank membranes*) wskazują, że badany materiał nie został zanieczyszczony przed przeprowadzonymi analizami.

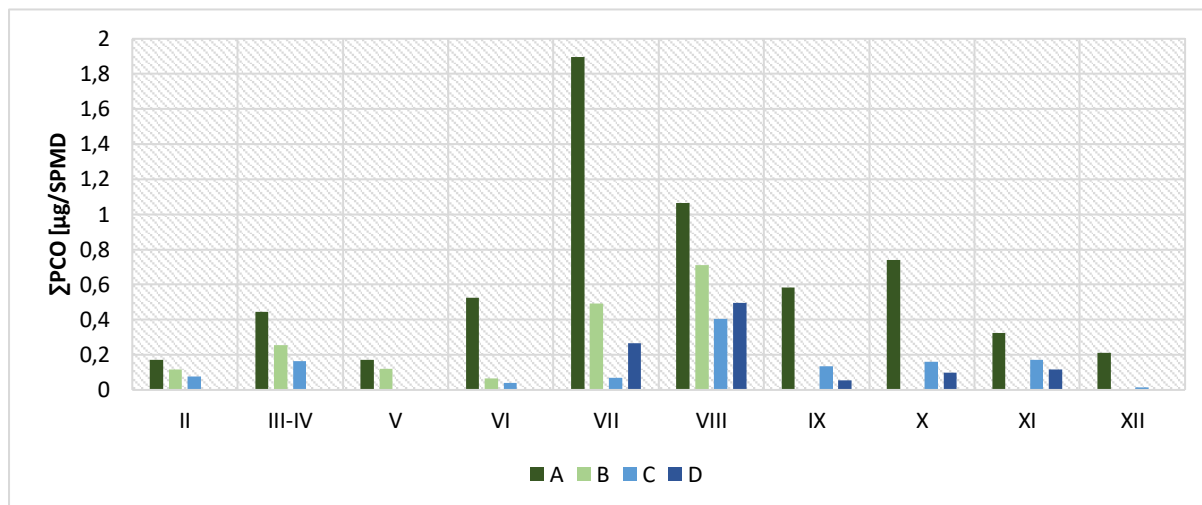
Na podstawie uzyskanych wyników należy stwierdzić, że najczęściej występującym pestycydem była endryna, której obecność stwierdzono we wszystkich próbkach pochodzących z punktu A (dopływ wody surowej) oraz z punktu B (rurociąg), a także w większości próbek pochodzących z punktu C (zbiornik wody czystej) i tylko w dwóch próbkach z punktu D (bieżąca woda w zlewie laboratoryjnym). Należy jednak podkreślić, że wraz z postępem procesu uzdatniania stężenie endryny sukcesywnie spadało, choć nie zawsze do zera. Stężenie endryny w wodzie u odbiorcy w próbkach VII D oraz VIII D, jest zdecydowanie wyższe niż w próbkach pochodzących ze zbiornika wody czystej (punkt C) pobieranych w tym samym czasie, co wskazuje na wtórne zanieczyszczenie tym pestycydem w trakcie transportu wody do odbiorcy w sieci wodociągowej. Najwyższe stężenie endryny odnotowano dla próbki VII A i wynosiło ono 1,365 µg/SPMD. Endryna stosowana jest jako insektycyd oraz rodentycyd.

Drugim najczęściej pojawiającym się pestycydem był heptachlor (insektycyd), obecny we wszystkich próbkach z punktów A i B, z wyjątkiem próbek II A, II B i VI B. W próbkach z punktów C i D występował on od lipca do listopada włącznie (próbki VII C-XI C oraz VII D-XI D). Dla wszystkich próbek odnotowano sukcesywny spadek stężenia tego pestycydu na kolejnych etapach uzdatniania. W odróżnieniu od endryny, w żadnej z próbek nie stwierdzono znaczącego wzrostu stężenia heptachloru pomiędzy punktami C i D. Najwyższe stężenie heptachloru odnotowano dla próbki IX A i wynosiło ono 0,290 µg/SPMD.

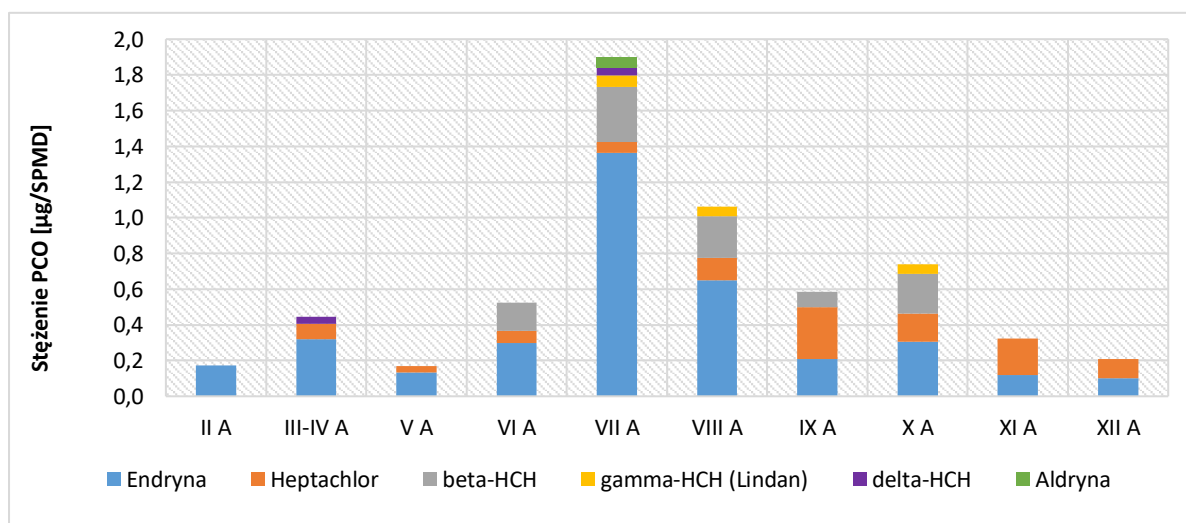
Pozostałe pestycydy pojawiały się zdecydowanie rzadziej i w większości przypadków zostały wykryte jedynie w punkcie A, co wskazuje, że w procesie uzdatniania zostały one całkowicie usunięte. Jedyny wyjątek stanowi gamma-HCH (lindan), którego stężenie w próbce VII C wyniosło 0,053 µg/SPMD, przy stężeniu w wodzie surowej (próbka VII A) wynoszącym 0,065 µg/SPMD.

Sumę stężeń wszystkich wykrytych pestycydów chloroorganicznych (Σ PCO) przedstawiono na Rysunku 10 i wynosiło od 0,172 do 1,896 µg/SPMD dla punktu A, 0,065 - 0,710 µg/SPMD dla punktu B, 0,000 - 0,405 µg/SPMD dla punktu C i 0,000 - 0,495 µg/SPMD

dla punktu D. Stężenie poszczególnych PCO [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] wykrytych w próbkach wody z punktu A przedstawiono na Rysunku 11.



Rys. 10. Suma stężeń wszystkich wykrytych PCO [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] w próbkach z różnych etapów uzdatniania wody (A: przepompownia - dopływ wody surowej; B: rurociąg - strumień wody tuż przed ozonowaniem; C: zbiornik czystej wody, D- bieżącą wodą w zlewie laboratoryjnym) w określonych miesiącach.



Rys. 11. Stężenie poszczególnych PCO [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] wykrytych w próbkach wody z punktu A (przepompownia - dopływ wody surowej) w określonych miesiącach.

Jedynie w nielicznych publikacjach podjęto zagadnienie wpływu procesów uzdatniania wody na stężenie opisywanych pestycydów chloroorganicznych (Valičková i in., 2013; Kong i in., 2016; Rad i in., 2017). Kong i in. prowadzili badania w zakładzie uzdatniania wody Jiubin w YiXing (Chiny), który jest zasilany wodą z górnego dorzecza Taihu. W publikacji opisano wyniki analizy obecności osiemnastu pestycydów chloroorganicznych. Dwa razy w miesiącu

przez okres trzynastu miesięcy (Czerwiec 2014 - Lipiec 2015) pobierano po 2,0 L wody w dwóch powtórzeniach z czterech punktów: (1) wejście wody surowej, (2) woda po procesie sedymentacji, (3) woda po filtracji oraz (4) woda uzdatniona. W celu załężenia analitów próbki poddawano ekstrakcji do fazy ciekłej, po czym odparowywano na rotacyjnej wyparce próżniowej. Następnie przeprowadzono oznaczenie ilościowe PCO metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. W wodzie surowej stwierdzono obecność dziesięciu analizowanych pestycydów chloroorganicznych o relatywnie wysokich stężeniach, natomiast wartości stężeń pozostałych ośmiu były bardzo niskie, lub nie zostały wykryte. Dominującym pestycydem był beta-HCH, a jego średnie stężenie wynosiło 290,8 ng/L. Kolejnymi często pojawiającymi się związkami był heptachlor, którego średnie stężenie wynosiło 56,1 ng/L oraz gamma-HCH (45,6 ng/L). DDE, DDD oraz DDT były wykrywane często, natomiast występowały w niskich stężeniach. Kong i in. zbadali również wpływ procesów uzdatniania na stężenie sumy PCO oraz poszczególnych związków. Autorzy wykazali, że efektywność usuwania dla sumy stężeń Σ PCO wynosiła poniżej 10% dla procesu sedymentacji i 8% dla procesu filtracji. W przypadku dezynfekcji nie stwierdzono znaczącego wpływu procesu na sumę stężeń Σ PCO. Dominującym pestycydem spośród wykrytych w wodzie uzdatnionej był beta-HCH, którego średnie stężenie wynosiło 200,8 ng/L, co wskazuje na jego bardzo duży wpływ na całkowitą sumę stężeń Σ PCO w wodzie uzdatnionej. Najefektywniej usuwanym spośród badanych pestycydów okazał się być heptachlor, którego stężenie spadało średnio o 31,8%, osiągając średnią wartość 22,5 ng/L w wodzie uzdatnionej. Podsumowując, Kong i in. podkreślają fakt niesatysfakcjonującego poziomu usuwania pestycydów chloroorganicznych w trakcie procesu uzdatniania wody w zakładzie, w którym pobierano próbki oraz wskazują na konieczność uzupełnienia procesu o techniki umożliwiające skuteczne usuwanie PCO (Kong i in., 2016).

Rad i in. również przeanalizowali wpływ procesów uzdatniania wody na stężenie wybranych pestycydów chloroorganicznych. Miejscem poboru próbek był zakład uzdatniania wody w Ahvaz (Iran), który jest zasilany wodą z rzeki Karun. Próbki pobierano przez około miesiąc o różnych porach dnia w trzech punktach: (1) wejście wody surowej, (2) woda po koagulacji, (3) woda po filtracji- w pełni uzdatniona. Wszystkie próbki pochodzące z danego punktu zostały następnie połączone i w objętości 2,5 l przetransportowane do laboratorium, gdzie 250 ml uzyskanej mieszaniny poddano trzykrotnej ekstrakcji z użyciem n-heksanu, a następnie odparowano na rotacyjnej wyparce próżniowej. Następnie przeprowadzono analizę ilościową dwunastu wybranych PCO (aldryna, alfa-HCH, beta-HCH, delta-HCH, gamma-

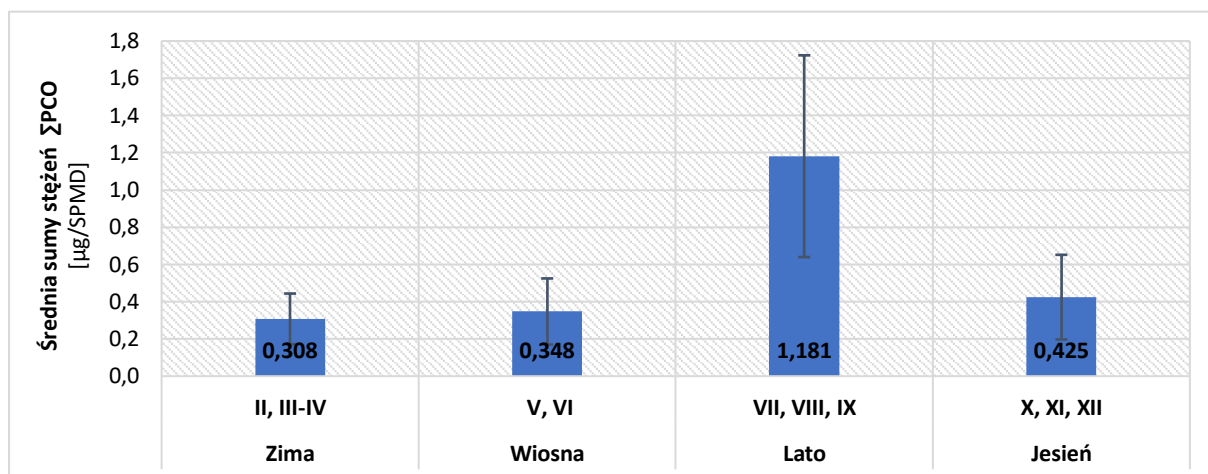
HCH, dieldryna, alfa-endosulfan, beta-endosulfan, heptachlor, metoksychlor, op'- DDT, pp'- DDT) przy zastosowaniu chromatografii gazowej z detektorem μ -ECD. Dominującymi związkami, które wykryto w próbkach wody pochodzącej ze wszystkich etapów, były heptachlor, metoksychlor oraz delta-HCH. Autorzy wykazali, spadek stężenia wszystkich pestycydów chloroorganicznych w próbkach wody po procesie uzdatniania w zakresie od 19,4% dla heptachloru do 83,5% dla aldryny. Dla sumy stężeń wszystkich wykrytych pestycydów spadek stężenia wynosił 49,3%. Analizując wpływ procesów jednostkowych, autorzy wykazali, że koagulacja okazała się być szczególnie skuteczna w przypadku usuwania alfa-HCH, prowadząc do 77,3% redukcji. Wysoki stopień redukcji uzyskano również dla heptachloru (42,8%), aldryny (42,8%) oraz alfa-endosulfanu (41,4%). Co ciekawe, stężenie metoksychloru wzrosło po procesie koagulacji o 44,3%. W przypadku pozostałych związków poziom redukcji po procesie koagulacji wynosił od 5,2% do 27,2%. Z kolei filtracja okazała się być najbardziej efektywna w usuwaniu gamma-HCH (lindan), beta-endosulfanu i aldryny, doprowadzając do obniżenia ich stężenia odpowiednio o 81,8%; 75,2% i 71,2%. W przypadku heptachloru i alfa-HCH odnotowano wzrost stężenia po procesie filtracji o odpowiednio 40,9% i 7,6%. Stężenie pozostałych pestycydów spadało w zakresie od 15,0% do 60,5%.

Valičková i in. w swoich badaniach przeprowadzonych w warunkach laboratoryjnych koncentrują się na procesie adsorpcji na różnych złożach, m.in na węglu aktywnym. Analizie przy zastosowaniu chromatografii gazowej z detektorem μ -ECD poddano pięć pestycydów chloroorganicznych: heksachlorobenzen (HCB), heptachlor, lindan (gamma-HCH) heksachlorobutadien (HCBd) oraz pentachlorobenzen (PeCB). Najwyższą skuteczność usuwania w procesie adsorpcji na węglu aktywnym stwierdzono dla HCBd- 64,5%, kolejno dla heptachloru- 60,5%, HCB- 59,9%, PeCB- 57,0% i lindanu- 56% (Valičková i in., 2013).

Należy mieć na uwadze, że każdy z autorów przedstawia uzyskane rezultaty w nieco inny sposób, w dodatku w żadnej z przedstawionych pozycji literaturowych nie wykorzystano urządzeń z membraną półprzepuszczalną w celu zateżenia związków obecnych w próbkach wody pochodzących z różnych etapów uzdatniania, przez co bezpośrednie porównanie z wynikami prezentowanymi w niniejszej rozprawie nie jest możliwe.

Analizując sezonową zmienność sumy stężeń \sum PCO w wodzie surowej, należy dostrzec znaczącą różnicę pomiędzy wynikami uzyskanymi latem (VII-IX) a pozostałymi porami roku, co zobrazowano na Rysunku 12. Najwyższą średnią sumy stężeń uzyskano latem i wynosiła

ona 1,181 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$, podczas gdy dla jesieni była to wartość 0,425 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$, dla zimy 0,308 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$, a dla wiosny 0,348 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$.



Rys. 12. Porównanie średniej sumy stężeń ΣPCO w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku

Kong i in. również wskazują na znaczące różnice stężeń poszczególnych związków w wodzie surowej w zależności od pory roku. Dla większości wykrytych pestycydów chloroorganicznych najwyższe wartości stężeń odnotowano wiosną i latem, natomiast najniższe jesienią i zimą. Szczególnie wysokie wahania sezonowe stwierdzono dla heptachloru oraz beta-HCH. Według autorów, znaczący wpływ na wysokie stężenia PCO odnotowane wiosną mogą mieć bardzo intensywne opady deszczu występujące w tym okresie na terenie prowadzonych badań (Kong i in., 2016).

Liu i in. prowadząc badania nad obecnością pestycydów chloroorganicznych w wodach rzeki Jiuxi w Chinach poddali analizie próbki wody pobierane od października do listopada oraz od marca do kwietnia. Wyniki uzyskane przez autorów wskazują, że średnie stężenia analizowanych pestycydów były zdecydowanie wyższe jesienią niż wiosną. Jedynym wyjątkiem był heptachlor, którego średnie stężenie było wyższe w październiku niż w marcu. Średnia suma stężeń ΣPCO wiosną wyniosła 7,15 ng/L, podczas gdy jesienią było to 19,8 ng/L. Wykazano również, że związki z grupy HCH wykazywały zdecydowanie większe sezonowe zmiany stężeń w porównaniu ze związkami z grupy DDT (Liu i in., 2020).

Amandy i in. przeprowadzili analizę zmienności sezonowej stężenia beta-HCH, gamma-HCH (lindan) oraz delta-HCH w próbkach wody z rzeki Crocodile River w Republice Południowej Afryki. Do poboru próbek wody wykorzystano urządzenie z membraną półprzepuszczalną. Najwyższe stężenia beta-HCH stwierdzono zimą i wiosną wynosiły

odpowiednio 0,154 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ i 0,153 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$. Zdecydowanie niższe stężenia odnotowano latem (0,071 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$) i jesienią (0,0455 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$). Dla porównania, w badaniach opisywanych w ramach niniejszej rozprawy, obecność beta-HCH wykryto w miesiącach od czerwca do października, a jego najwyższe stężenie odnotowano w lipcu i wynosiło 0,308 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$. Najwyższe stężenia lindanu w rzece Crocodile River stwierdzono jesienią i wynosiło 0,010 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$, natomiast najniższe latem (0,006 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$). W przypadku delta-HCH średnia wartość stężenia jesienią, zimą i wiosną wynosiła 0,003 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$, natomiast latem 0,001 $\mu\text{g}/\text{SPMD}$ (Amandy i in., 2014).

SZACUNKOWE STĘŻENIE PESTYCYDÓW W WODZIE

Analogicznie jak w przypadku opisywanych wcześniej wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych do średniej ważonej w czasie wartości stężenia (C_{TWA}) pestycydów chloroorganicznych w wodzie wykorzystano arkusz kalkulacyjny Microsoft Excel stworzony przez Alvareza (Alvarez, 2010b). Wyniki obliczeń średniej ważonej w czasie wartości stężenia (C_{TWA}), wyrażonej w ng/L , dla wykrytych pestycydów chloroorganicznych przedstawiono w Tabeli 13. Ze względu na brak doniesień literaturowych umożliwiających wykonanie obliczeń w zestawieniu nie ujęto aldryny i delta-HCH. Z przyczyn podanych już przy wynikach średniej ważonej w czasie wartości stężenia (C_{TWA}) WWA, również dla pestycydów chloroorganicznych przeprowadzona dyskusja wyników odnosi się przede wszystkim do wyników wyrażonych w $\mu\text{g}/\text{SPMD}$. W przypadku PCO ogólny trend zmian stężenia w zależności od etapu procesu uzdatniania oraz wahania sezonowe dla obu sposobów przedstawienia wyników są zbliżone. Warto również zauważyć, że stężenia pestycydów wyrażone w ng/L wody okazały się być zdecydowanie niższe niż dopuszczalne- przykładowo dla endryny, która była dominującym PCO w badanych próbkach maksymalne wykryte stężenie wynosiło 11,542 ng/L , podczas gdy norma mówi o 0,600 $\mu\text{g}/\text{L}$ (WHO, 2011).

Tabela 13. Stężenia CTWA wybranych pestycydów chloroorganicznych oznaczanych ilościowo [ng/L wody]

Oznaczenie próbki	Czas (dni)	Średnia T [°C]	beta-HCH	Endryna	gamma-HCH (Lindan)	Heptachlor	ΣPCO
II A	33	4,5	0,000	0,841	0,000	0,000	0,841
II B	33	4,4	0,000	0,577	0,000	0,000	0,577
II C	33	4,9	0,000	0,367	0,000	0,000	0,367
III-IV A	64	8,6	0,000	2,198	0,000	0,140	2,338
III-IV B	64	8,5	0,000	1,545	0,000	0,050	1,595
III-IV C	64	8,6	0,000	1,133	0,000	0,000	1,133
V A	27	17,4	0,000	0,767	0,000	0,063	0,830
V B	27	16,8	0,000	0,568	0,000	0,036	0,604
V C	27	16,8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
VI A	31	21,3	6,145	0,183	0,000	0,128	6,456
VI B	31	21,3	0,000	0,397	0,000	0,000	0,397
VI C	31	21,2	0,000	0,244	0,000	0,000	0,244
VII A	35	22,2	11,749	11,542	3,882	0,127	27,300
VII B	35	22,3	0,000	3,906	0,000	0,032	3,938
VII C	35	22,4	0,000	0,127	3,166	0,000	3,293
VII D	35	25	0,000	2,241	0,000	0,000	2,241
VIII A	28	20,8	8,399	3,768	2,660	0,232	15,059
VIII B	28	20,7	0,000	3,478	0,000	0,204	3,682
VIII C	28	20,4	0,000	2,174	0,000	0,056	2,230
VIII D	28	25	0,000	2,666	0,000	0,065	2,731
IX A	40	16,5	3,340	1,436	0,000	0,658	5,434
IX C	40	16,9	0,000	0,000	0,000	0,306	0,306
IX D	40	25	0,000	0,000	0,000	0,125	0,125
X A	36	8,2	3,488	1,573	2,460	1,234	8,755
X C	36	8,5	0,000	0,181	0,000	0,965	1,146
X D	36	25	0,000	0,000	0,000	0,215	0,215
XI A	32	3,8	0,000	0,575	0,000	1,780	2,355
XI C	32	4,1	0,000	0,240	0,000	1,042	1,282
XI D	32	25	0,000	0,000	0,000	0,231	0,231
XII A	36	1,1	0,000	0,516	0,000	0,849	1,365
XII C	36	1,5	0,000	0,077	0,000	0,000	0,077
XII D	36	25	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

7.3. LOTNE ZWIĄZKI ORGANICZNE

Analiza metodą chromatografii gazowej z detektorem MS w żadnej z próbek nie wykazała obecności ani jednego z dziewięciu badanych lotnych związków organicznych. Stężenie wszystkich z nich było poniżej granicy oznaczalności, wynoszącej 2,0 µg/próbkę. Nie musi to jednak oznaczać braku ich obecności w wodzie, którą analizowano, a jedynie ich brak w ekstraktach pozyskanych dzięki SPMD.

Prawdopodobną przyczyną jest fakt, że log K_{ow} dla większości analizowanych lotnych związków organicznych wynosi $<3,0$, a jak wcześniej wspomniano, dla danego związku organicznego istnieje ścisły związek pomiędzy wartością współczynnika podziału trioleina-woda (K_{tw}) a wartością współczynnika podziału oktanol-woda (K_{ow}) (Huckins i in., 1993). W związku z tym, można stwierdzić, że wartości log $K_{ow} <3,0$ są prawdopodobnie za niskie, aby SPMDs były odpowiednim narzędziem do zatykania związków o tak niskim współczynniku podziału oktanol-woda. Teoretycznie inną przyczyną mogłaby być utrata lotnych związków w trakcie przygotowania próbek, szczególnie na etapie odparowywania n-heksanu pochodzącego z dializy membran, jednakże proces ten był prowadzony w temperaturze 57°C, podczas gdy temperatura wrzenia substancji, które badano, mieści się w zakresie 61,2-121,1°C. Należy zatem uznać, że urządzenia z półprzepuszczalną membraną nie pozwoliły na wiarygodne określenie obecności lotnych związków organicznych z log $K_{ow} <3,0$, w tym ubocznych produktów dezynfekcji wody.

Wiele pozycji literaturowych wskazuje na pojawienie się lotnych związków organicznych na skutek procesu dezynfekcji. Monarca i in. analizując wpływ różnych typów dezynfektanta (NaClO, ClO₂, PAA) na powstawanie trihalometanów wykazali, że jedynie zastosowanie NaClO powodowało tworzenie się THMów. Nie mniej jednak wciąż było to stężenie bardzo niskie (Monarca i in., 2004). Rincón-Bedoya i in. analizując próbki wody po procesie chlorowania w zakładzie uzdatniania wody San Cristobal (Medellin, Kolumbia) stwierdzili obecność chloroformu, dibromochlorometanu, bromodichlorometanu oraz bromoformu w stężeniach odpowiednio 5,77; 0,24; 1,34 oraz 0,30 µg/L. Średnia suma stężeń wszystkich analizowanych THMów wynosiła 7,65 µg/L, co jest wartością znacznie mniejszą niż wartość dopuszczalną wynosząca 80 µg/L (Rincón-Bedoya i in., 2012). Z kolei Abda analizując próbki wody pobierane w zakładzie w Bouhamdane (Algieria) uzyskał zdecydowanie wyższą wartość średniej sumy stężeń THM w wodzie uzdatnione wynoszącą 100 µg/L. Najwyższe wartości stwierdzono jesienią. Wartości średniej sumy stężeń THM w wodzie surowej mieściły się w zakresie od 0,6 do 1,3 µg/L (Abda i in., 2015).

7.4. ANALIZA TOKSYCZNOŚCI: MICROTOX

Badania toksyczności ostrej próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania względem bakterii *Aliivibrio fischeri* prowadzono w dwóch punktach czasowych, po 5 i 15 min ekspozycji na działanie potencjalnych związków toksycznych. Wyniki analizy przedstawiono w Tabeli 14, jako wartości EC_{50} , $1/EC_{50}$, oraz $V_{tox(50)}$, a także na Rysunku 13 jako $1/EC_{50}$, oraz $V_{tox(50)}$. Zastosowanie różnych sposobów wyrażenia toksyczności ma na celu umożliwienie porównania uzyskanych wyników z danymi literaturowymi. EC_{50} zostało wyrażone jako ilość trioleiny z membran SPMD [mg] na 1 ml badanej próbki i na podstawie tego parametru obliczono wartości zależne.

Tabela 14 Wartości parametrów EC_{50} , $1/EC_{50}$, oraz $V_{tox(50)}$ po czasie ekspozycji 5 i 15 min dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach

Oznaczenie próbki	t=5				t=15			
	EC_{50} mg/ml	$1/EC_{50}$	Klasa toksyczności	$V_{tox(50)}$	EC_{50} mg/ml	$1/EC_{50}$	Klasa toksyczności	$V_{tox(50)}$
hex	33,030	0,030	Brak	0,023	30,041	0,033	Brak	0,025
DMSO	28,015	0,036	Brak	0,027	26,987	0,037	Brak	0,031
0 K	19,646	0,051	Brak	0,039	15,687	0,064	Brak	0,048
II A	1,598	0,626	Niska	0,430	1,115	0,897	Niska	0,617
II B	2,184	0,458	Niska	0,315	1,679	0,595	Niska	0,410
II C	4,526	0,221	Brak	0,152	4,022	0,249	Brak	0,171
III-IV A	0,799	1,252	Ostra	0,444	0,452	2,212	Ostra	0,784
III-IV B	0,873	1,146	Ostra	0,406	0,508	1,968	Ostra	0,698
III-IV C	1,134	0,882	Niska	0,313	0,656	1,525	Ostra	0,541
V A	2,170	0,461	Niska	0,387	0,631	1,585	Ostra	1,333
V B	8,640	0,116	Brak	0,097	3,098	0,323	Brak	0,271
V C	6,187	0,162	Brak	0,136	3,173	0,315	Brak	0,265
VI A	0,503	1,986	Ostra	1,454	0,271	3,691	Ostra	2,703
VI B	0,876	1,142	Ostra	0,836	0,590	1,694	Ostra	1,240
VI C	1,057	0,946	Niska	0,692	0,810	1,234	Ostra	0,903
VII A	0,381	2,626	Ostra	1,702	0,216	4,625	Ostra	2,999
VII B	0,666	1,502	Ostra	0,974	0,482	2,073	Ostra	1,344
VII C	1,996	0,501	Niska	0,325	0,953	1,050	Ostra	0,681
VII D	1,795	0,557	Niska	0,361	0,776	1,289	Ostra	0,836
VIII A	0,915	1,093	Ostra	0,886	0,597	1,674	Ostra	1,357
VIII B	4,153	0,241	Brak	0,195	2,552	0,392	Brak	0,318
VIII C	2,373	0,421	Niska	0,342	1,807	0,553	Niska	0,449
VIII D	2,231	0,448	Niska	0,363	2,135	0,468	Niska	0,380
IX A	1,679	0,595	Niska	0,338	1,672	0,598	Niska	0,339
IX C	2,491	0,402	Niska	0,228	1,573	0,636	Niska	0,361
IX D	6,661	0,150	Brak	0,085	5,078	0,197	Brak	0,112
X A	1,616	0,619	Brak	0,390	1,606	0,623	Niska	0,393
X C	5,489	0,182	Brak	0,115	4,468	0,224	Brak	0,141
X D	6,383	0,157	Brak	0,099	7,128	0,140	Brak	0,088
XI A	3,726	0,268	Brak	0,190	1,489	0,672	Niska	0,476
XI C	2,570	0,389	Brak	0,276	2,936	0,341	Brak	0,242
XI D	2,601	0,384	Brak	0,273	2,296	0,436	Niska	0,309
XII A	2,924	0,342	Brak	0,216	0,938	1,067	Niska	0,672
XII C	2,523	0,396	Brak	0,250	2,347	0,426	Niska	0,269
XII D	2,997	0,334	Brak	0,210	2,385	0,419	Niska	0,264

Przy wcześniej opisanym założeniu, że w przypadku przedstawionych badań, jednostka toksyczna TU odpowiada parametrowi $1/EC_{50}$ [mg trioleiny/ml próbki], wszystkie próbki przypisano do odpowiadających im klas toksyczności. Tabela 15 zawiera podsumowanie ilości próbek w poszczególnych klasach.

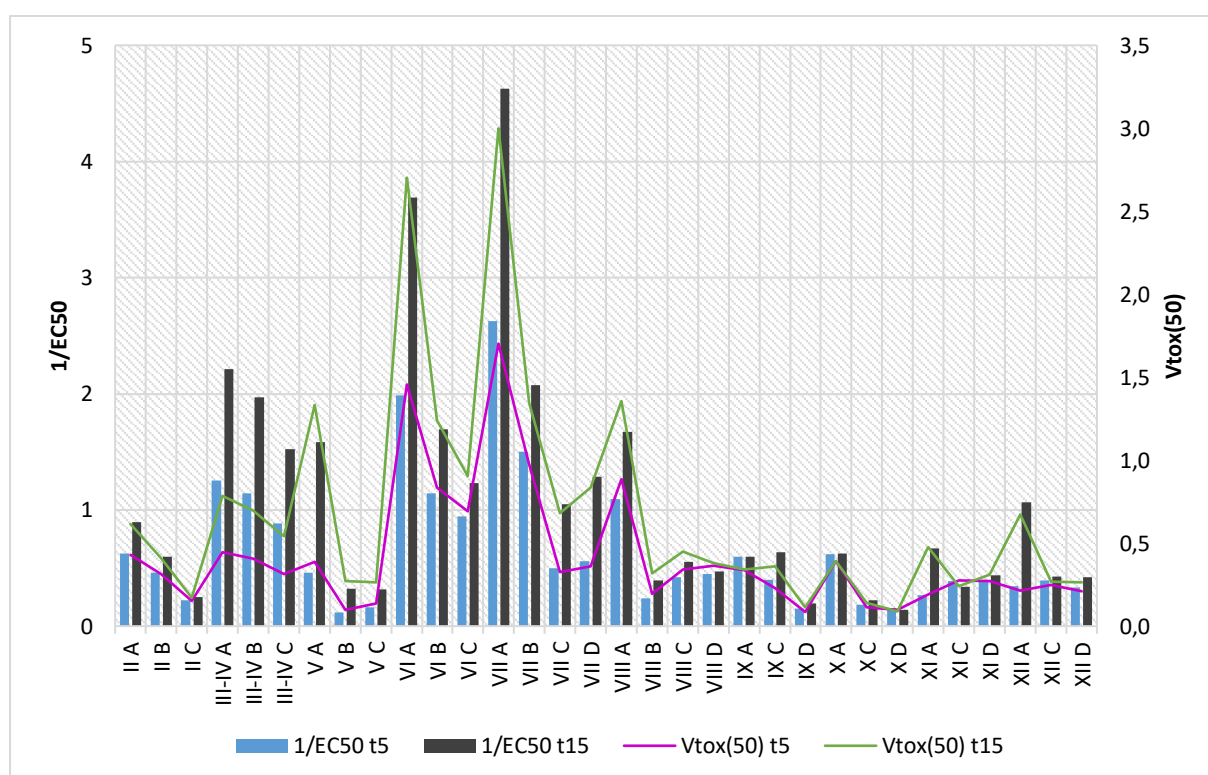
Tabela 15 Podsumowanie ilości próbek w poszczególnych klasach toksyczności

Zakres wartości	Klasa toksyczności	Ilość próbek	
		t=5 min	t=15 min
$1/EC_{50} < 0,4$	Brak toksyczności ostrej	A- 3 B- 2 C- 5 D- 4	A- 0 B- 2 C- 4 D- 2
$0,4 < 1/EC_{50} < 1,0$	Niska toksyczność ostra	A- 3 B- 1 C- 5 D- 2	A- 4 B- 1 C- 3 D- 3
$1,0 < EC_{50} < 10,0$	Ostra toksyczność	A- 4 B- 3 C- 0 D- 0	A- 6 B- 3 C- 3 D- 1

Wraz z rosnącym czasem ekspozycji bakterii *Aliivibrio fischeri* na działanie związków potencjalnie toksycznych zawartych w badanych próbkach zauważono wzrost toksyczności dla wszystkich próbek z wyjątkiem X D i XI C. Analizując uzyskane wyniki, należy zauważyć, że wszystkie próbki pochodzące z punktu A (przepompownia- wejście wody surowej) po 15 minutach prowadzenia testu określono jako toksyczne w mniejszym lub większym stopniu. Najwyższą toksyczność wykazano dla próbek VII A oraz VI A dla czasu ekspozycji $t = 15$ min i wynosiła odpowiednio 4,625 oraz 3,691. Wraz z postępowaniem procesu uzdatniania, w rurociągu bezpośrednio przed procesem ozonowania (punkt B), toksyczność znacząco spadała dla wszystkich próbek, jednakże wciąż większość próbek z punktu B, dla czasu ekspozycji $t = 15$ min, zaklasyfikowano jako próbki o charakterze co najmniej niskotoksycznym. Pomędzy próbkami pochodzącymi z punktów B i C, pobieranych w tym samym czasie, zauważyć można dalszy spadek toksyczności wraz z postępowaniem procesu uzdatniania dla próbek pochodzących ze wszystkich miesięcy, z wyjątkiem sierpnia, kiedy to toksyczność próbki VIII B wynosiła 0,392 podczas gdy dla próbki VIII C było to 0,553. Biorąc pod uwagę fakt, że ze względu na problemy techniczne, począwszy od września nie pobierano już próbek w punkcie B, należy zwrócić uwagę również na różnice pomiędzy toksycznością w punktach A i C dla okresu

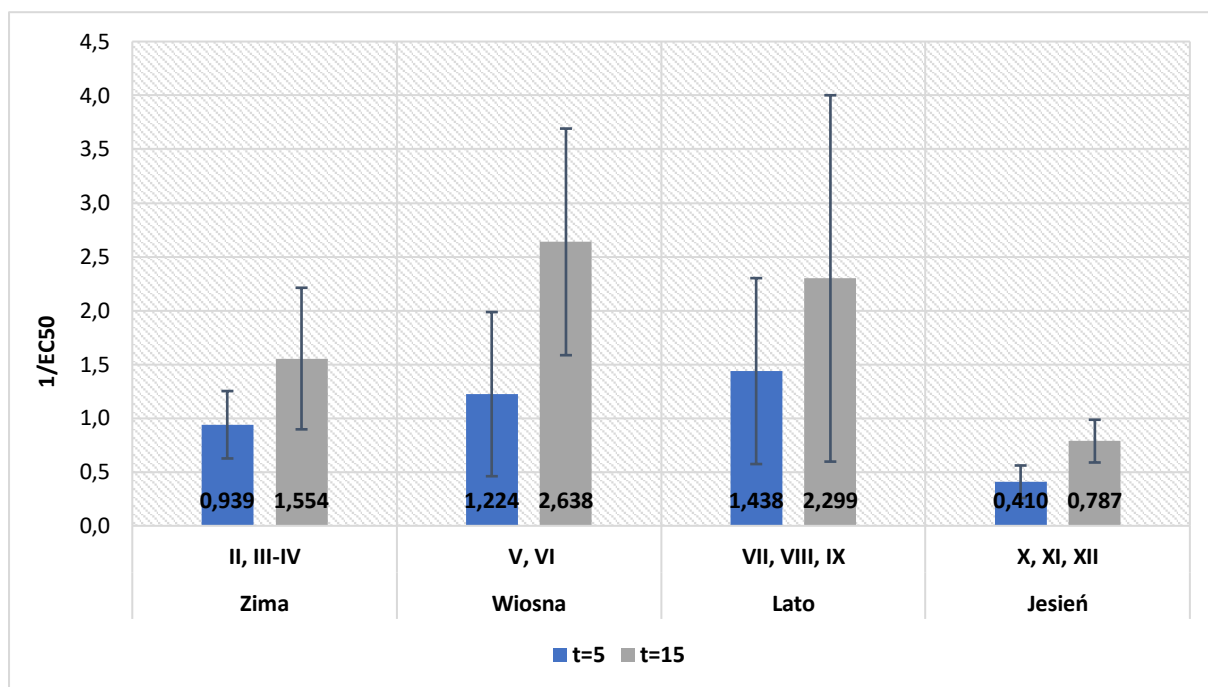
od września do grudnia. Analiza tych wyników wskazuje na nieznaczny wzrost toksyczności w punkcie C (0,636) w stosunku do A (0,598) dla próbek pochodzących z września. W punkcie D (woda u odbiorcy) toksyczność próbek była zbliżona do toksyczności próbek pochodzących z punktu C (zbiorniki wody czystej) w przypadku wszystkich próbek i wynosiła 0,140-1,289 dla czasu ekspozycji $t=15$ min.

Wyniki uzyskane dla rozpuszczalników (n-heksan, DMSO) użytych do przygotowania próbek do analizy (czyszczenie, dializa, rozpuszczanie materiału) wskazują, że w zastosowanym rozcieńczeniu nie były one toksyczne, więc ich wpływ na całkowitą toksyczność próbek był znikomy.



Rys. 13. Wartości parametrów $1/EC_{50}$ oraz $V_{tox(50)}$ uzyskane w teście Microtox po 5- i 15-minutowej ekspozycji organizmów testowych na działanie związków zawartych w próbkach

Toksyczność próbek wody pobieranej z rzeki Oławy zmieniała się wraz z każdym miesiącem. Na Rysunku 14 przedstawiono średnią wartość toksyczności ostrej w wodzie surowej (punkt A) dla poszczególnych pór roku. Analizując sezonową zmienność toksyczności należy dostrzec znaczącą różnicę pomiędzy wynikami $1/EC_{50}$ uzyskanymi wiosną i latem a jesienią i zimą. Najwyższą średnią wartość toksyczności ostrej uzyskano wiosną i wynosiła ona 2,638 dla $t=15$, podczas gdy dla lata była to wartość 2,299, dla zimy 1,554, a dla jesieni 0,787.



Rys. 14. Porównanie toksyczności wyrażonej jako $1/EC_{50}$ w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku, dla $t=5$ i $t=15$

Gilli i in. prowadzili badania mające na celu określenie toksyczności wody z rzeki Po przed i po procesie uzdatniania w zakładzie uzdatniania wody w Turynie (Włochy). Próbkę były pobierane za pomocą urządzeń z membraną półprzepuszczalną od października 2001 do stycznia 2004. W celu określenia toksyczności ostrej próbek zastosowano test Microtox. Analizując średnie wartości parametru EC_{50} przedstawione przez autorów można zauważyć niewielki spadek toksyczności w wodzie uzdatnionej w stosunku do wody surowej. Autorzy stwierdzili niską toksyczność ostrą względem organizmu testowego dla próbek wody surowej (zakres TU od 0,03-0,92), natomiast zdecydowana większość próbek wody uzdatnionej została zaklasyfikowana jako nietoksyczna. Wyjątek stanowiły próbki pobierane w styczniu oraz od sierpnia do grudnia 2002, które wykazywały niską toksyczność ostrą (zakres TU od 0,50 do 0,87). Ponadto autorzy nie stwierdzili zależności pomiędzy porą roku a poziomem toksyczności pobieranych próbek wody (Gilli i in., 2007).

Guzzella i in. przeprowadzili analizę zmian toksyczności wody w pilotażowym zakładzie uzdatniania zasilanym wodą z jeziora Trasimeno (Perugia, Włochy). Analizie poddano próbki wody surowej oraz próbki wody uzdatnionej przy zastosowaniu różnych dezynfektantów: $NaClO$, ClO_2 oraz PAA. Próbkę były pobierane czterokrotnie, w różnych

porach roku od lipca 2000 do czerwca 2001. W celu przeprowadzenia testu Microtox każdorazowo pobierano 20L wody i poddawano ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Pomiar luminescencji bakterii wykonywano po 15 i 30 min ekspozycji. Wyniki analizy wskazują, że w przypadku wszystkich zastosowanych środków dezynfekujących toksyczność próbek wody po dezynfekcji była zbliżona do toksyczności próbek wody surowej, z wyjątkiem próbek pobieranych w czerwcu, kiedy to woda po dezynfekcji okazała się być mniej toksyczna względem organizmu testowego niż woda surowa. Nie zaobserwowano różnicy między 15 a 30 min czasem narażenia bakterii na działanie próbek. Nie wykazano również istotnych różnic pomiędzy wynikami toksyczności próbek wody traktowanej różnymi dezynfektantami. (Guzzella i in., 2004). Z kolei Zani i in. prowadzili badania w tym samym zakładzie, wykazując bardzo duży wzrost toksyczności próbek po procesach flokulacji i filtracji na filtrach piaskowych w porównaniu do próbek wody surowej. Należy mieć na uwadze, że wspomniane procesy poprzedzała wstępna dezynfekcja ClO₂, w związku z czym autorzy jako przyczynę znaczącego wzrostu toksyczności wskazują powstawanie ubocznych produktów dezynfekcji (Zani i in, 2005).

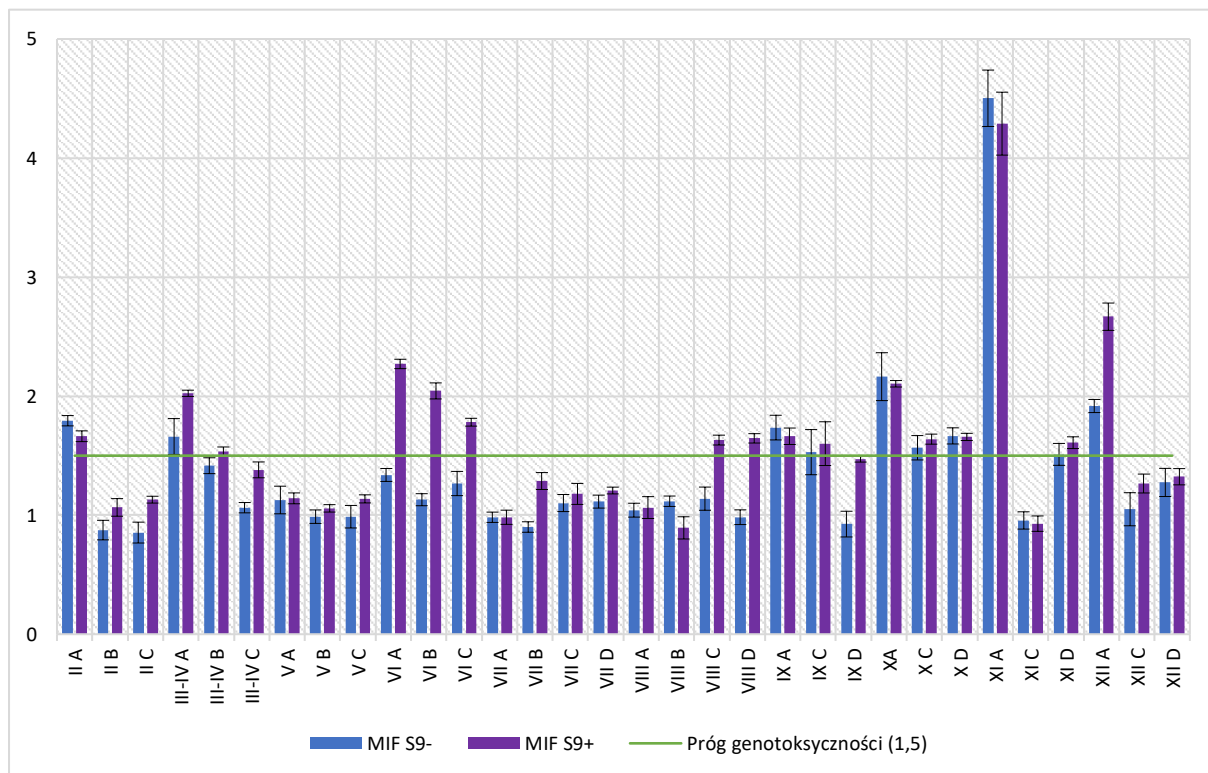
7.5. ANALIZA GENOTOKSYCZNOŚCI: SOS-CHROMOTEST

Wyniki analizy genotoksyczności za pomocą testu SOS-Chromotest zarówno bez (S9-) jak i z aktywacją metaboliczną (S9+) przedstawiono w Tabeli 16 oraz na Rysunku 15 jako maksymalny współczynnik indukcji MIF (Maximum Induction Factor) osiągnięty dla badanych próbek. W tabeli zawarto dodatkowo właściwe dla uzyskanych MIF współczynniki wzrostu bakterii GF (Growth Factor). Pogrubioną czcionką zaznaczono próbki, dla których MIF przekroczył wartość 1,5, co zgodnie z zasadą interpretacji wyników SOS-Chromotestu klasyfikuje je jako próbki zawierające związki genotoksyczne.

Tabela 16 Wartości parametrów MIF (Maximum Induction Factor) dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+) w teście SOS-Chromotest

Oznaczenie próbki	S9-			S9+		
	GF	MIF		GF	MIF	
		średnia	odch. stand.		średnia	odch. stand.
II A	0,988	1,794	0,043	1,051	1,663	0,045
II B	1,023	0,875	0,082	1,093	1,065	0,074
II C	0,926	0,854	0,088	1,121	1,130	0,029
III-IV A	0,911	1,661	0,151	1,159	2,024	0,026
III-IV B	1,185	1,416	0,067	0,986	1,534	0,039
III-IV C	1,035	1,063	0,043	0,879	1,381	0,067
V A	0,932	1,128	0,116	1,019	1,142	0,046
V B	0,887	0,988	0,057	1,083	1,057	0,031
V C	1,021	0,987	0,095	0,954	1,137	0,034
VI A	0,881	1,338	0,054	1,035	2,270	0,039
VI B	0,881	1,130	0,051	1,014	2,044	0,067
VI C	0,879	1,266	0,102	0,948	1,781	0,033
VII A	0,956	0,982	0,043	1,017	0,982	0,060
VII B	1,021	0,901	0,044	0,948	1,287	0,071
VII C	1,126	1,102	0,072	0,944	1,179	0,088
VII D	1,035	1,114	0,054	0,950	1,207	0,028
VIII A	0,997	1,042	0,058	0,965	1,064	0,092
VIII B	1,001	1,117	0,044	1,035	0,893	0,093
VIII C	1,031	1,139	0,097	0,952	1,631	0,041
VIII D	0,954	0,983	0,062	1,010	1,646	0,039
IX A	1,005	1,736	0,104	0,969	1,663	0,069
IX C	1,102	1,529	0,190	1,060	1,601	0,184
IX D	0,978	0,925	0,108	0,988	1,472	0,026
XA	0,856	2,164	0,201	1,021	2,104	0,027
XC	0,895	1,566	0,102	0,987	1,639	0,042
XD	0,853	1,666	0,068	0,948	1,657	0,030
XI A	0,888	4,502	0,237	0,944	4,289	0,264
XI C	0,876	0,956	0,073	1,051	0,929	0,065
XI D	1,077	1,511	0,092	0,844	1,609	0,049
XII A	0,934	1,917	0,055	0,838	2,667	0,115
XII C	1,014	1,050	0,139	1,156	1,266	0,079
XII D	0,959	1,275	0,118	1,092	1,323	0,068

Najwyższą wartość maksymalnego współczynnika indukcji osiągnięto dla próbki wody surowej pobranej w listopadzie (XI A) i wynosił on odpowiednio 4,502 dla S9- oraz 4,289 dla S9+.



Rys. 15. Maksymalny współczynnik indukcji (MIF) dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach uzyskanych w teście SOS-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+)

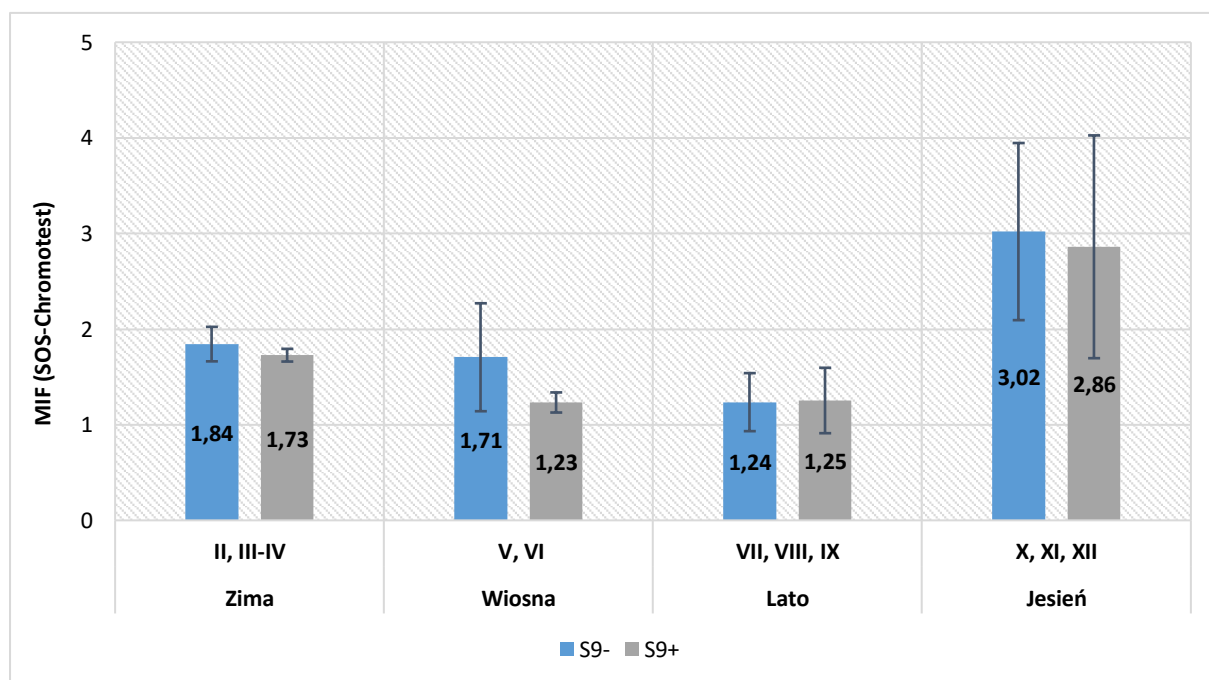
Widoczna jest zależność pomiędzy genotoksycznym działaniem na badane organizmy mikrozanieczyszczeń obecnych w próbkach wody surowej a wody w kolejnych etapach uzdatniania. Dla większości próbek poziom genotoksyczności malał wraz z postępem procesu uzdatniania wody lub pozostawał niezmienny.

Zastosowanie mikrosomalnej frakcji S9 skutkowało większą liczbą pozytywnych wyników testu, co wykazano w Tabeli 17 podsumowującej ilość próbek, które okazały się być genotoksyczne. Dla większości próbek wartość parametru MIF była wyższa w przypadku zastosowania frakcji mikrosomalnej, natomiast nie jest to regułą. Co więcej, dla wielu próbek uzyskane wartości w obu wariantach były do siebie zbliżone.

Tabela 17 Podsumowanie ilości próbek zaklasyfikowanych jako genotoksyczne w teście SOS-Chromotest

Zakres wartości	Ilość próbek	
	S9-	S9+
MIF > 1,5	A- 6 B- 0 C- 2 D- 2	A- 7 B- 2 C- 4 D- 4

Genotoksyczność próbek zmieniała się wraz z każdym miesiącem, zarówno w wariancie, w którym zastosowano aktywację metaboliczną, jak i bez niej. Na Rysunku 16 przedstawiono średnią wartość parametru MIF w wodzie surowej (punkt A) dla poszczególnych pór roku. W obu wariantach najwyższą średnią wartość parametru MIF uzyskano jesienią i wynosiła ona 3,02 dla S9- i 2,86 dla S9+. Wynik kwalifikujący próbki jako genotoksyczne uzyskano również w przypadku średniej dla zimy, podczas gdy wiosną średnia wartość parametru MIF jako genotoksyczne wskazuje tylko próbki w wariancie bez aktywacji metabolicznej. W przypadku średniej uzyskanej latem w obu wariantach wartość parametru MIF była mniejsza niż 1,5.



Rys. 16 Porównanie genotoksyczności wyrażonej jako Maksymalny współczynnik indukcji (MIF) w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku, uzyskanych w teście SOS-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+)

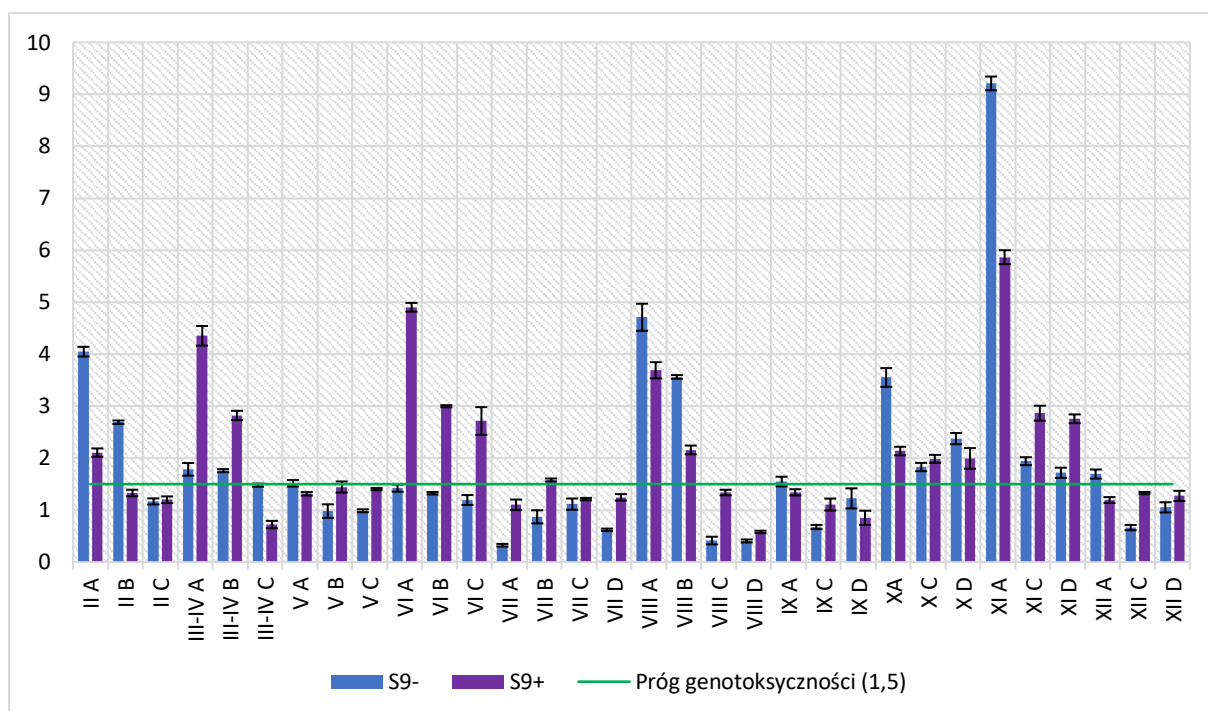
Dostępne są tylko nieliczne artykuły opisujące zastosowanie testu SOS-Chromotest w przypadku oceny genotoksyczności wody przeznaczonej do spożycia. Częściej takie badania dotyczą wód powierzchniowych (Kocak i in., 2010). Brakuje również publikacji opisujących wykorzystanie membran SPMD w celu przygotowania próbek do analizy genotoksyczności testem SOS. Alloula przeprowadził analizę wpływu procesów uzdatniania oraz zmienności sezonowej poziomu genotoksyczności wody z rzeki Bou-Namoussa (Annaba, Algieria) za pomocą testu SOS-Chromotest. Wodę z dwóch punktów (przed i po procesie uzdatniania) pobierano w kwietniu, czerwcu, wrześniu i grudniu. W opisywanym zakładzie proces uzdatniania przebiega następująco: chlorowanie wstępne, koagulacja i flokulacja, dekantacja, sterylizacja. Autor wykazał wzrost genotoksyczności próbek wody uzdatnionej w stosunku do wody surowej, jako przyczynę podając wzrost stężenia ubocznych produktów chlorowania. Obecność innych związków chemicznych nie była w publikacji analizowana. Ponadto jesienią autor wykazał znaczący wzrost poziomu genotoksyczności próbek wody względem organizmu testowego w porównaniu z innymi porami roku (Alloula, 2014).

7.6. ANALIZA GENOTOKSYCZNOŚCI: UMU-CHROMOTEST

Wyniki analizy genotoksyczności za pomocą testu UMU-Chromotest z aktywacją (S9+) oraz bez aktywacji metabolicznej (S9-) przedstawiono w Tabeli 18 oraz na Rysunku 17 jako maksymalny współczynnik indukcji MIF (Maximum Induction Factor) osiągnięty dla badanych próbek, wraz z właściwym mu współczynnikiem wzrostu bakterii GF (Growth Factor). Pogrubioną czcionką wyróżniono próbki, dla których MIF osiągnął wartość powyżej 1,5, co zgodnie z zasadą interpretacji wyników UMU-Chromotestu określa je jako próbki zawierające związki o działaniu genotoksycznym.

Tabela 18 Wartości parametrów MIF (Maximum Induction Factor) dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+) w teście UMU-Chromotest

Oznaczenie próbki	S9-			S9+		
	GF	MIF		GF	MIF	
		średnia	odch. stand.		średnia	odch. stand.
II A	1,171	4,048	0,093	0,978	2,107	0,080
II B	0,668	2,691	0,033	0,891	1,329	0,063
II C	0,873	1,167	0,059	0,892	1,199	0,064
III-IV A	0,619	1,785	0,122	0,773	4,354	0,189
III-IV B	0,638	1,759	0,029	0,801	2,821	0,089
III-IV C	0,853	1,481	0,030	0,876	0,722	0,071
V A	0,879	1,516	0,062	0,951	1,313	0,033
V B	0,857	0,981	0,130	0,840	1,444	0,107
V C	0,952	0,987	0,028	0,819	1,403	0,021
VI A	0,938	1,424	0,069	0,904	4,903	0,084
VI B	1,004	1,325	0,024	0,865	2,998	0,021
VI C	1,109	1,195	0,095	0,759	2,715	0,266
VII A	0,908	0,324	0,026	0,960	1,102	0,102
VII B	0,774	0,871	0,126	0,816	1,579	0,029
VII C	0,869	1,115	0,108	0,952	1,212	0,023
VII D	0,917	0,620	0,024	0,974	1,246	0,062
VIII A	0,893	4,711	0,261	0,878	3,690	0,156
VIII B	0,878	3,563	0,035	0,892	2,158	0,084
VIII C	0,821	0,414	0,074	0,994	1,338	0,053
VIII D	0,910	0,407	0,028	0,541	0,581	0,023
IX A	0,645	1,549	0,093	0,834	1,342	0,059
IX C	0,957	0,674	0,041	0,905	1,108	0,115
IX D	0,869	1,226	0,193	0,920	0,852	0,137
XA	1,038	3,552	0,180	0,942	2,136	0,082
XC	0,994	1,829	0,080	0,974	1,987	0,076
XD	1,021	2,375	0,108	0,901	1,995	0,198
XI A	0,811	9,210	0,132	0,740	5,867	0,134
XI C	1,072	1,942	0,076	0,824	2,865	0,144
XI D	0,928	1,718	0,099	0,796	2,757	0,084
XII A	1,208	1,694	0,088	0,597	1,194	0,056
XII C	0,965	0,664	0,051	0,534	1,328	0,022
XII D	1,153	1,053	0,098	0,904	1,274	0,098



Rys. 17 Maksymalny współczynnik indukcji (MIF) dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach uzyskanych w teście UMU-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+)

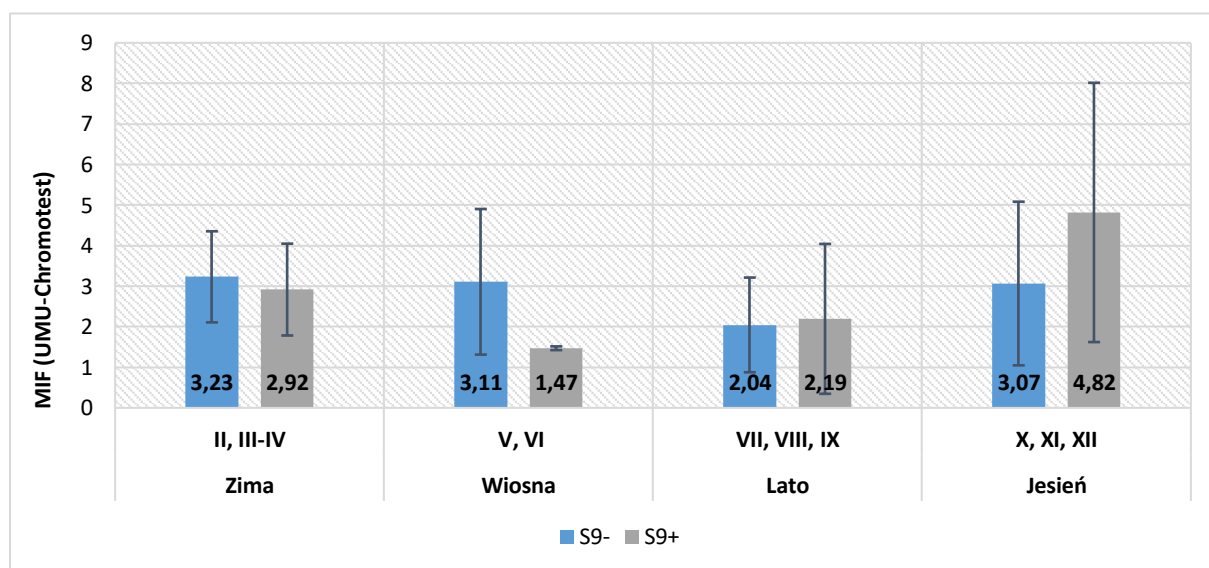
Podobnie jak w przypadku wyników uzyskanych dla SOS-Chromotestu można zauważyć zależność pomiędzy poziomem genotoksyczności wody surowej a wody w kolejnych etapach uzdatniania. Dla większości próbek poziom genotoksyczności malał wraz z procesem uzdatniania wody lub pozostawał niezmienny. Wyjątek stanowią próbki pobierane w lipcu, kiedy to wartości uzyskane w punkcie A są niższe niż w próbkach wody pochodzących z kolejnych etapów. Jest to widoczne zarówno w wariancie z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej, jak i bez, przy czym tylko próbka VII B w wariancie S9+ kwalifikuje się jako genotoksyczna, podczas gdy dla innych próbek pobranych w lipcu wartość parametru MIF była poniżej 1,5.

W obu wariantach S9-/S9+ pozytywny wynik testu wskazujący na genotoksyczność uzyskano dla 15 próbek, co wykazano w Tabeli 19. Nie mniej jednak w obu wariantach testu genotoksyczność wykazywały różne próbki. Wartość parametru MIF w niektórych przypadkach była wyższa przy zastosowaniu frakcji mikrosomalnej, natomiast w innych niższa. W porównaniu z wynikami uzyskanymi w teście SOS-Chromotest wyniki uzyskane dla obu wariantów różnią się od siebie w sposób bardziej znaczący.

Tabela 19 Podsumowanie ilości próbek zaklasyfikowanych jako genotoksyczne w teście UMU-Chromotest

Zakres wartości	Ilość próbek	
	S9-	S9+
MIF > 1,5	A- 8 B- 3 C- 2 D- 2	A- 6 B- 4 C- 3 D- 2

Na Rysunku 18 przedstawiono średnią wartość parametru MIF w wodzie surowej (punkt A) dla poszczególnych pór roku. Tak samo jak w przypadku SOS-Chromotestu, w obu wariantach testu najwyższą średnią wartość parametru MIF uzyskano jesienią. Parametry MIF wyniosły odpowiednio 3,07 dla S9- i 4,82 dla S9+. Wynik kwalifikujący próbki jako genotoksyczne uzyskano również w przypadku średniej dla wszystkich pozostałych pór roku w wariancie bez aktywacji metabolicznej, a dla zimy i lata również w wariancie z aktywacją metaboliczną. W przypadku średniej uzyskanej wiosną w wariancie z frakcją mikrosomalną wartość parametru MIF była poniżej 1,5.



Rys.18 Porównanie genotoksyczności wyrażonej jako Maksymalny współczynnik indukcji (MIF) w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku, uzyskanych w teście UMU-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+)

Podobnie jak w przypadku SOS-Chromotestu istnieją jedynie nieliczne publikacje opisujące zastosowanie testu UMU-Chromotest do oceny zmian genotoksyczności wraz z postępowaniem procesu uzdatniania wody (Wang i in., 2011; Zeng i in., 2015). Zdecydowana większość badań opisuje jedynie genotoksyczność wody już po procesie uzdatnienia, koncentrując

się przede wszystkim na ocenie wpływu procesu chlorowania, bez analizy wpływu innych procesów uzdatniania. Zeng i in. przeprowadzili analizę wpływu procesów uzdatniania oraz zmienności sezonowej poziomu genotoksyczności wody z rzeki Hanjiang (Wuhan, Chiny) za pomocą testu UMU-Chromotest. Do badań pobrano dwukrotnie (zimą i latem) 50 L wody z trzech punktów poboru: (1) woda surowa, (2) woda uzdatniona, (3) woda u odbiorcy. Dla wszystkich analizowanych próbkach stwierdzono genotoksyczne działanie względem szczepu *S. typhimurium* TA1535. W oparciu o wartość potencjału genotoksyczności autorzy uszeregowali próbki malejąco uzyskując następujące wyniki: woda uzdatniona -lato > woda u odbiorcy-lato > woda surowa- lato > woda surowa- zima > woda u odbiorcy - zima > woda uzdatniona - zima. Wyniki przez Zeng'a wyraźnie wskazują, że genotoksyczność względem organizmu testowego UMU-Chromotest była zdecydowanie wyższa latem niż zimą. W celu szczegółowej interpretacji uzyskanych wyników należałoby prowadzić równoległe analizy chemiczne oraz pobierać próbki przez zdecydowanie dłuższy czas, w większej liczbie powtórzeń (Zeng i in., 2015).

7.7. ZMIENNOŚĆ SEZONOWA

W Tabeli 20 zestawiono średnie wyniki uzyskane we wszystkich przeprowadzonych analizach dla poszczególnych pór roku. Zimą zaobserwowano najniższą średnią wartość sumy stężeń pestycydów chloroorganicznych, a także najwyższą wartość współczynnika MIF w teście UMU-Chromotest, w wariancie bez aktywacji metabolicznej. W miesiącach wiosennych odnotowano najwyższą toksyczność po 15 minutach ekspozycji bakterii *Aliivibrio fischeri* na działanie próbek, przy czym wartość współczynnika MIF w tym okresie była najniższa, zarówno w teście SOS-Chromotest jak i UMU-Chromotest, w wariancie z aktywacją metaboliczną. Wyniki uzyskane latem wskazują na najwyższą wartość średniej sumy stężeń analizowanych pestycydów chloroorganicznych i jednocześnie na najwyższą toksyczność w teście Microtox dla czasu ekspozycji $t=5$ min. W okresie letnim zauważono też najniższą wartość średniej sumy stężeń wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych przy jednocześnie najniższych wartościach MIF w teście SOS-Chromotest jak i UMU-Chromotest, w wariancie bez aktywacji metabolicznej. Jesienią odnotowano najwyższą średnią sumy stężeń wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz najwyższą wartość maksymalnego współczynnika indukcji w teście SOS-Chromotest w obu wariantach, a także w teście UMU-Chromotest przy zastosowaniu aktywacji metabolicznej. Z kolei wyniki toksyczności uzyskane jesienią są najniższe zarówno dla 5 min jak i 15 min ekspozycji.

Tabela 20. Zestawienie średnich wyników uzyskanych dla poszczególnych analiz w zależności od pory roku, w punkcie A (przepompownia - dopływ wody surowej). Strzałkami zaznaczony wartości największe (↑) i najmniejsze (↓) dla danej analizy

Typ analizy	Zima	Wiosna	Lato	Jesień
ΣWWA	4,35 ± 0,15	2,29 ± 0,10	1,64 ± 0,66 ↓	6,85 ± 2,37 ↑
ΣPCO	0,31 ± 0,14 ↓	0,35 ± 0,18	1,18 ± 0,54 ↑	0,42 ± 0,23
EC ₅₀ t=5	0,94 ± 0,31	1,22 ± 0,76	1,44 ± 0,86 ↑	0,41 ± 0,15 ↓
EC ₅₀ t=15	1,55 ± 0,66	2,64 ± 1,05 ↑	2,30 ± 1,70	0,79 ± 0,20 ↓
SOS MIF 9-	1,84 ± 0,18	1,71 ± 0,56	1,24 ± 0,30 ↓	3,02 ± 0,93 ↑
SOS MIF 9+	1,73 ± 0,07	1,23 ± 0,11 ↓	1,25 ± 0,34	2,86 ± 1,16 ↑
UMU MIF 9-	3,23 ± 1,12 ↑	3,11 ± 1,79	2,04 ± 1,17 ↓	3,07 ± 2,02
UMU MIF 9+	2,92 ± 1,13	1,47 ± 0,05 ↓	2,19 ± 1,85	4,82 ± 3,20 ↑

7.8. ANALIZA STATYSTYCZNA

Przy pomocy programu Statistica (Statsoft/TIBCO, wersja 13.3) przeprowadzono analizę statystyczną korelacji pomiędzy wynikami uzyskanymi w poszczególnych analizach chemicznych i biologicznych. Populację w analizie stanowiły wszystkie próbki. Rozkład danych odbiega od normalnego, zatem do określenia zależności zastosowano współczynnik korelacji rang Spearmana (r), którego wartości dla poszczególnych par analiz zestawiono w tabeli 21.

Według klasyfikacji J. Guilford'a na podstawie wartość współczynnika r wyniki interpretuje się następująco (Guilford, 1965):

- $|r| = 0$ – brak korelacji
- $0,0 < |r| \leq 0,1$ – korelacja nikła
- $0,1 < |r| \leq 0,3$ – korelacja słaba
- $0,3 < |r| \leq 0,5$ – korelacja przeciętna
- $0,5 < |r| \leq 0,7$ – korelacja wysoka
- $0,7 < |r| \leq 0,9$ – korelacja bardzo wysoka
- $0,9 < |r| < 1,0$ – korelacja niemal pełna
- $|r| = 1$ – korelacja pełna.

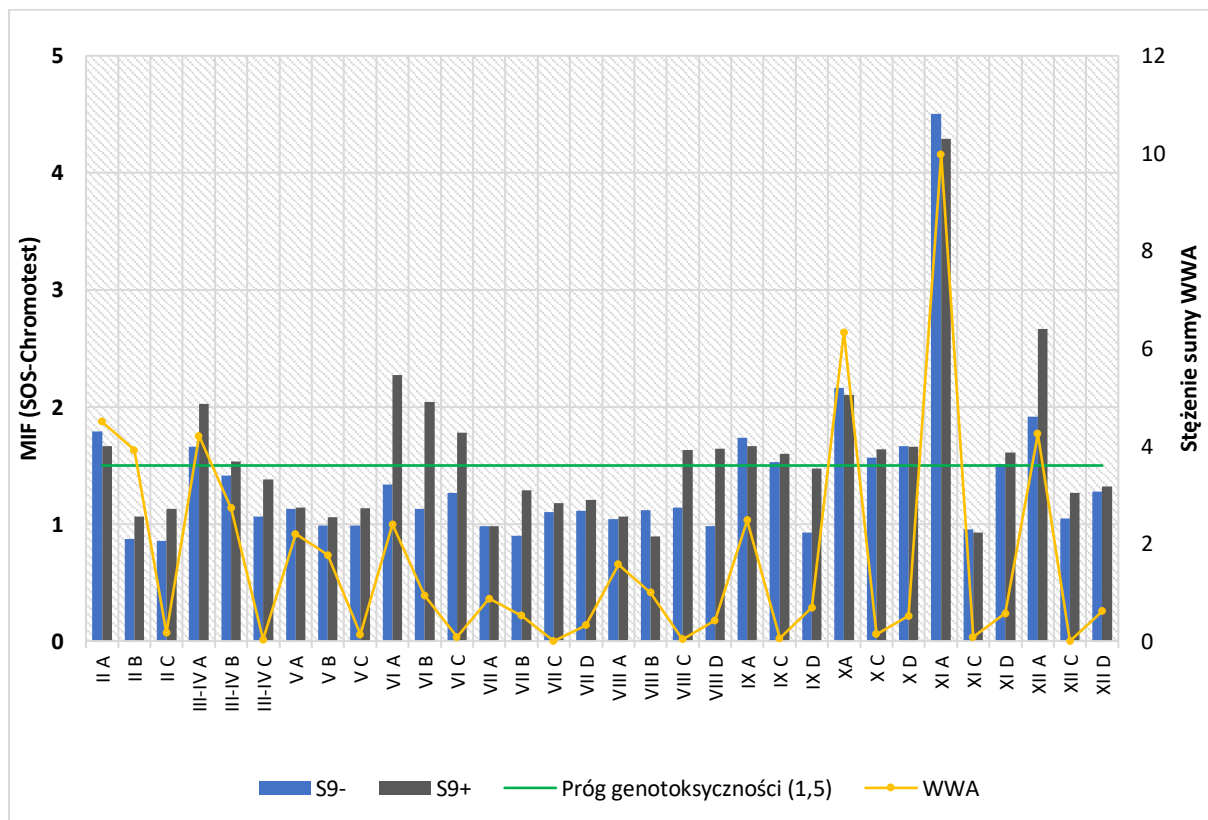
Tabela 21. Matryca wartości współczynnika korelacji rang (r) Spearmana pomiędzy wynikami przeprowadzanych analiz chemicznych i biologicznych. Pogrubione wartości są statystycznie istotne z $p < 0,05$

Typ analizy	1/EC ₅₀ , t=5	1/EC ₅₀ t=15	SOS MIF S9-	SOS MIF S9+	UMU MIF S9-	UMU MIF S9+
ΣWWA [µg/SPMD]	0,195	0,301	0,428	0,350	0,576	0,407
Σ7WWA [µg/SPMD]	0,302	0,363	0,363	0,302	0,561	0,511
ΣPCO [µg/SPMD]	0,487	0,477	0,181	0,087	0,208	0,203

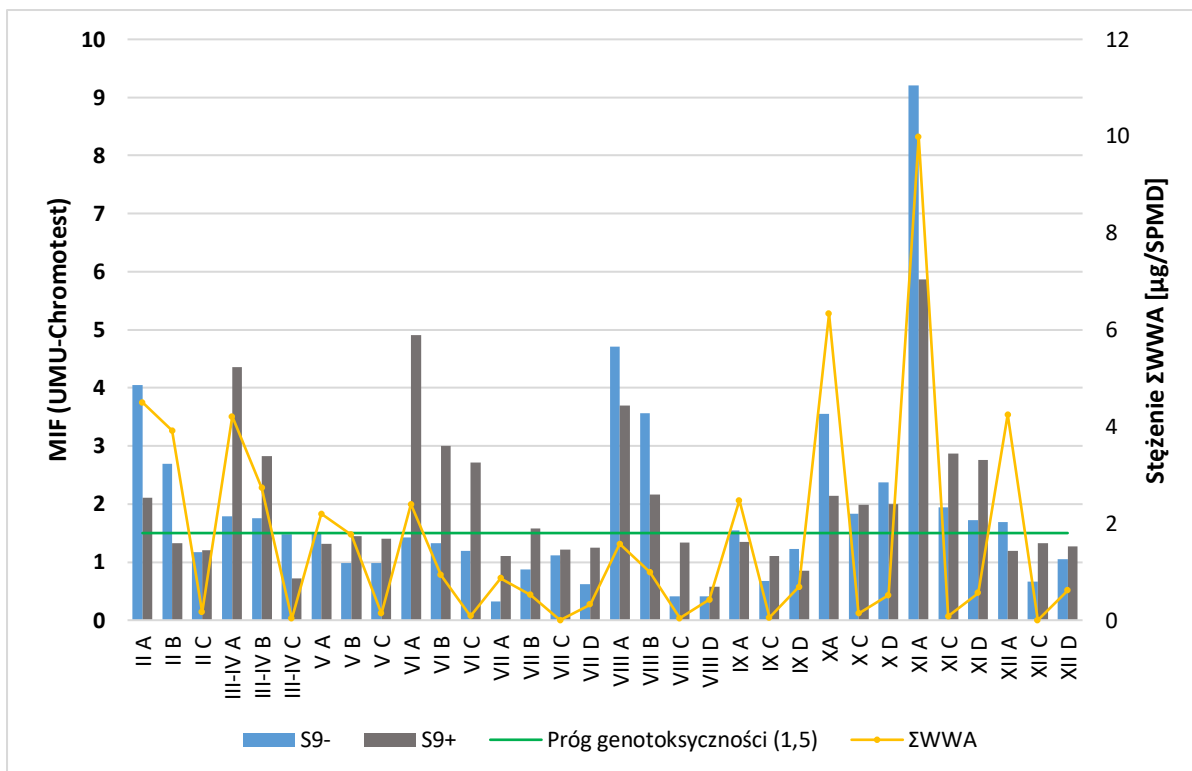
Pomiędzy stężeniem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych a genotoksycznością próbek wykazano statystycznie istotne ($p < 0,05$), a jednocześnie przeciętne dodatnie korelacje dla testu SOS-Chromotest przeprowadzonego w wariancie z aktywacją i bez aktywacji metabolicznej oraz dla testu UMU-Chromotest w wariancie z aktywacją metaboliczną. Dla testu UMU-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej korelacja pomiędzy stężeniem wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych a genotoksycznością próbek okazała się być wysoka i dodatnia. Pomiędzy

stężeniem pestycydów chloroorganicznych a toksycznością próbek wykazano statystycznie istotne, a jednocześnie przeciętne dodatnie korelacje zarówno dla czasu $t=5$ min jak i $t=15$ min. Korelacje pomiędzy sumą stężeń wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych a toksycznością próbek oraz pomiędzy sumą stężeń pestycydów chloroorganicznych a genotoksycznością próbek okazały się być statystycznie nieistotne.

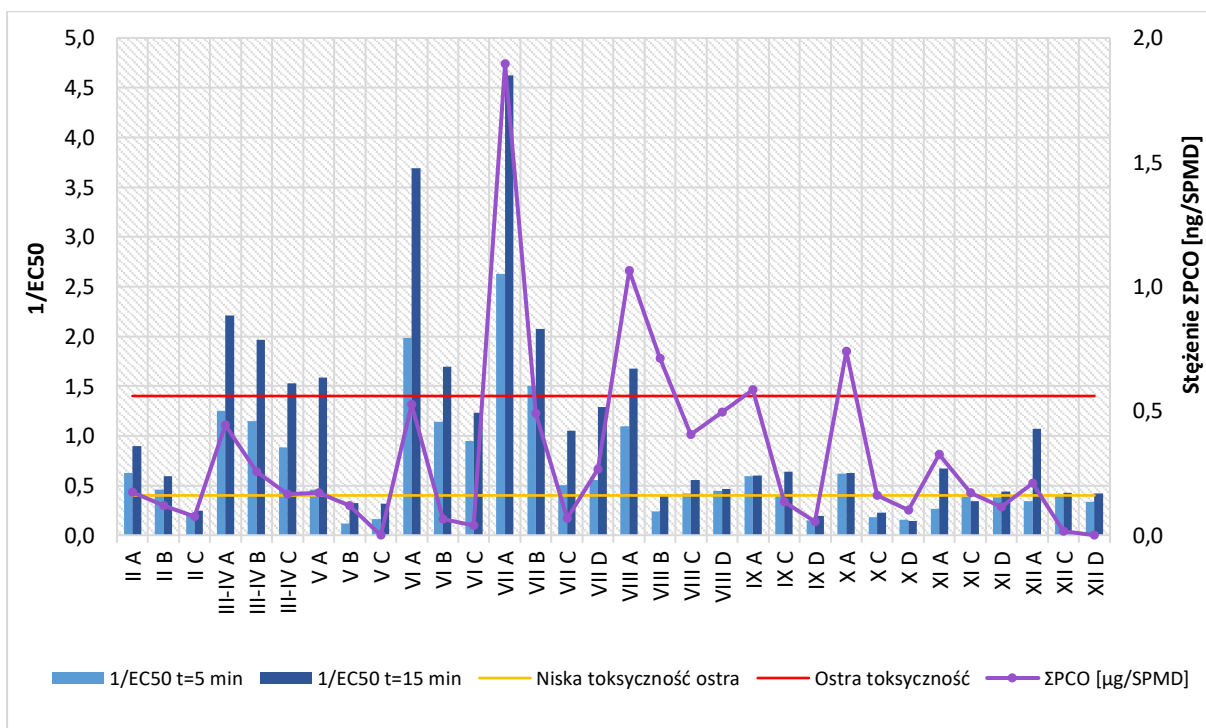
Należy też zwrócić uwagę na fakt, że dla obu testów genotoksyczności większą zależność stwierdzono w wariancie bez aktywacji metabolicznej, przy czym w teście UMU-Chromotest różnica pomiędzy wariantami była zdecydowanie większa. Dla sumy stężeń rakotwórczych i potencjalnie rakotwórczych WWA ($\Sigma 7\text{WWA}$) uzyskano wyniki bardzo zbliżone do wyników sumy stężeń wszystkich wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Szczegółowe wykresy korelacji pomiędzy poszczególnymi analizami, wykonane w programie Statistica, zamieszczono w Załączniku do niniejszej rozprawy. Dodatkowo, w celu zilustrowania zależności pomiędzy poszczególnymi analizami, na rysunkach 19 i 20 naniesiono równocześnie wyniki sumy stężeń WWA i wartości współczynnika MIF uzyskane w testach SOS-Chromotest (Rysunek 19) i UMU-Chromotest (Rysunek 20). Na Rysunku 21 zestawiono stężenie sumy pestycydów chloroorganicznych z wartością parametru $1/EC_{50}$ po czasie ekspozycji $t=5$ min i $t=15$ min.



Rys. 19. Suma stężeń WWA i wartości współczynnika MIF uzyskane w teście SOS-Chromotest



Rys. 20. Suma stężeń WWA i wartości współczynnika MIF uzyskane w teście UMU-Chromotest



Rys.21. Suma stężeń PCO i wartości parametru 1/EC₅₀ uzyskane w teście Microtox

Zbadano również, czy istnieje korelacja pomiędzy wartościami MIF uzyskanymi w testach SOS-Chromotest i UMU-Chromotest. Dla testów przeprowadzonych w wariancie bez aktywacji metabolicznej stwierdzono statystycznie istotną, przeciętną dodatnią korelacją ($r=0,432$), natomiast w wariancie z aktywacją metaboliczną korelacja wyników uzyskanych w obu testach była statystycznie nieistotna.

Postanowiono również zbadać, czy któryś z analizowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych lub pestycydów chloroorganicznych będzie wykazywać szczególnie wysoki wpływ na genotoksyczność lub toksyczność badanych próbek. Wartość współczynnika korelacji r-Spearmana pomiędzy stężeniem poszczególnych WWA oraz PCO a wynikami analiz biologicznych zestawiono odpowiednio w Tabeli 22 (WWA) i Tabeli 23 (PCO).

Tabela 22 Matryca korelacji pomiędzy stężeniem występujących w próbkach WWA i wynikami analiz biologicznych. Pogrubione wartości są statystycznie istotne z $p < 0,05$

WWA	1/EC ₅₀ , t=5	1/EC ₅₀ , t=15	SOS MIF 9-	SOS MIF 9+	UMU MIF 9-	UMU MIF 9+
A	-0,300	0,200	0,900	0,845	0,700	0,650
B[a]A	0,050	0,102	0,569	0,422	0,595	0,335
B[a]P	0,306	0,108	0,649	0,667	-0,180	0,252
B[b]F	0,454	0,472	0,281	0,121	-0,031	0,255
B[g,h,i]P	0,071	0,134	0,230	0,411	0,224	0,063
B[k]F	0,337	0,282	0,053	0,021	-0,218	0,484
Chr	0,110	0,162	0,377	0,354	0,382	0,397
Flu	-0,110	-0,025	0,632	0,492	0,630	0,240
I[c,d]P	0,540	0,540	-0,027	-0,037	-0,335	0,226
N	-0,800	-0,200	0,800	0,949	0,400	0,800
Phe	0,242	0,379	0,408	0,497	0,434	0,230
Pyr	0,098	0,158	0,408	0,390	0,554	0,305

Tabela 23 Matryca korelacji pomiędzy stężeniem występujących w próbkach pestycydów chloroorganicznych i wynikami analiz biologicznych. Pogrubione wartości są statystycznie istotne z $p < 0,05$

PCO	1/EC ₅₀ , t=5	1/EC ₅₀ , t=15	SOS MIF 9-	SOS MIF 9+	UMU MIF 9-	UMU MIF 9+
Aldryna	0,406	0,492	-0,334	-0,242	-0,352	-0,160
beta-HCH	0,700	0,700	-0,700	-0,700	-0,100	-0,300
delta-HCH	0,392	0,406	-0,023	-0,052	-0,135	0,003
Endryna	0,451	0,420	-0,026	-0,082	-0,015	0,058
gamma-HCH (Lindan)	0,775	0,775	-0,775	-0,775	-0,775	-0,775
Heptachlor	-0,135	-0,134	0,618	0,345	0,589	0,304

Analizując współczynniki korelacji uzyskane dla poszczególnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych można zauważyć, że jedynie w przypadku indeno[1,2,3-c, d]pirenu wykazano statystycznie istotną wysoką dodatnią zależność pomiędzy jego stężeniem a toksycznością próbki. Natomiast dla benzo[b]fluorantenu, stwierdzono korelację przeciętną dodatnią. Dla pozostałych dziesięciu WWA nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności pomiędzy stężeniem a toksycznością próbek. Związkami, dla których stwierdzono największą dodatnią korelację pomiędzy ich stężeniem a genotoksycznością były antracen oraz fluoranten. W obu przypadkach najwyższe wartości współczynnika r uzyskano dla testu SOS-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej. Współczynniki obliczone dla wariantu SOS S9+ oraz w teście UMU-Chromotest w wariancie S9- były nieznacznie niższe i wciąż statystycznie istotne, natomiast dla testu UMU-Chromotest w wariancie z aktywacją metaboliczną okazały się być statystycznie nieistotne. Statystycznie istotne, wysokie dodatnie korelacje wykazano również dla benzo[a]antracenu w wariancie bez aktywacji metabolicznej zarówno w przypadku testu SOS-Chromotest jak i UMU-Chromotest. Pomiedzy stężeniem benzo[a]pirenu, benzo[b]fluorantenu, benzo[k]fluorantenu, chryzenu, indeno[1,2,3-c, d]pirenu, benzo[g, h, i]peryleny i naftalenu a genotoksycznością nie wykazano żadnego związku istotnego statystycznie.

Analizując zależność pomiędzy stężeniem poszczególnych pestycydów chloroorganicznych a toksycznością próbek, należy zauważyć, że w przypadku endryny korelacja okazała się być przeciętna i niemal identyczna jak w przypadku sumy stężeń wszystkich pestycydów chloroorganicznych. Pomiedzy stężeniem pozostałych pestycydów nie wykazano związku stężenia z toksycznością próbek, natomiast należy mieć na uwadze, że ich stężenie było zdecydowanie niższe niż stężenie endryny. Stwierdzono również wysoką dodatnią korelację pomiędzy stężeniem heptachloru a genotoksycznością próbek w obu przeprowadzonych testach w wariancie bez aktywacji metabolicznej.

8. WNIOSKI

1. Przeprowadzone badania dowodzą, że urządzenia z membraną półprzepuszczalną mogą być skutecznym narzędziem do poboru próbek wody wodociągowej do analiz chemicznych i biologicznych, ponieważ pozwalają na efektywne zateżenie mikrozanieczyszczeń bezpośrednio w miejscu poboru próbki.
2. Podczas procesu uzdatniania wody, który jest stosowany w opisanym zakładzie uzdatniania wody, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne oraz pestycydy chloroorganiczne są usuwane w bardzo efektywny sposób.
3. Stężenie wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych w okresie jesienno-zimowym było zdecydowanie wyższe w porównaniu z okresem wiosenno-letnim, czego prawdopodobną przyczyną może być zwiększone stężenie produktów spalania w atmosferze ze względu na sezon grzewczy.
4. Urządzenia z półprzepuszczalną membraną nie pozwoliły na wiarygodne określenie obecności lotnych związków organicznych.
5. Test Microtox może być skutecznym narzędziem do oceny zmienności toksykologicznej próbek wody pobieranych na różnych etapach uzdatniania przy zastosowaniu membran SPMD.
6. Testy SOS-Chromotest oraz UMU-Chromotest pozwalają na ocenę zmienności genotoksykologicznej próbek wody pobieranych na różnych etapach uzdatniania przy zastosowaniu membran SPMD.
7. Istnieje zależność pomiędzy toksycznym i genotoksycznym działaniem na badane organizmy mikrozanieczyszczeń obecnych w wodzie surowej a wodzie w kolejnych etapach uzdatniania. Dla większości próbek zarówno poziom toksyczności jak i genotoksyczności malał wraz z postępowaniem procesu uzdatniania wody lub pozostawał niezmienny.
8. Pomiedzy sumą stężeń wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych a genotoksycznością próbek istnieje przeciętna (SOS 9-, SOS9+, UMU S9+) lub wysoka (UMU S9-) dodatnia korelacja.
9. Pomiedzy sumą stężeń pestycydów chloroorganicznych a toksycznością wody istnieje przeciętna dodatnia korelacja.

9. PODSUMOWANIE

Dopasowanie techniki pozwalającej na pobór i skuteczne zatężenie obecnych w wodzie wodociągowej mikrozanieczyszczeń jest niezwykle istotne ze względu na ich bardzo niskie stężenia, często uniemożliwiające przeprowadzenie analiz biologicznych. Wykorzystanie w tym obszarze próbników pasywnych, które w odróżnieniu od metod klasycznych nie wymagają poboru dużych ilości wody, w połączeniu z analizami toksyczności i genotoksyczności pozwala na efektywną ocenę jakości biologicznej wody przeznaczonej do spożycia, co ma charakter pionierski, ponieważ dotychczasowe doniesienia literaturowe o takim zastosowaniu membran SPMD są bardzo ograniczone. Ponadto technika wykorzystująca SPMD ma duże znaczenie przy szacowaniu zagrożenia związanego z ekspozycją na działanie zanieczyszczeń, ponieważ pozwala uzyskiwać średnią ważoną w czasie wartość stężenia zanieczyszczeń rozpuszczonych i przyswajalnych biologicznie dla długich przedziałów czasowych, odwzorowując akumulację analizowanych zanieczyszczeń w tkance tłuszczowej organizmów żywych.

Bardzo ograniczona liczba dostępnych publikacji podejmujących problem oceny jakości biologicznej wody przeznaczonej do spożycia na różnych etapach uzdatniania z jednoczesną szczegółową analizą chemiczną wskazuje, że może być to ciekawy i potrzebny kierunek badań.

10. LITERATURA

1. Abda A., Benouareth D.E., Tabet M., Liman R., Konuk M., Khallef M., Taher A., *Mutagenicity and genotoxicity of drinking water in Guelma region, Algeria*, Environmental Monitoring and Assessment 187:21, (2015)
2. Abdel-Shafy H.I., Mansour M.S.M., *A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation*, Egyptian Journal of Petroleum 25, 107-123 (2016)
3. Achour A., Derouiche A., Barhoumi B., Kort B., Cherif D., Bouabdallah S., Sakly M., Rhouma K.B., Touil S., Driss M.R., Tebourbi O., *Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue from northern Tunisia: Current extent of contamination and contributions of socio-demographic characteristics and dietary habits*, Environmental Research 156, 635-643, (2017)
4. Aktar MW, Sengupta D, Chowdhury A., *Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards*, Interdisciplinary Toxicology 2(1), 1–12, (2009)
5. Alexopoulos A., Leotsinidas M., Schinas V., Kondakis X.G., *Assessment of the possible mutagenic potential in drinking water samples from areas in SW Greece, using the Ames microsome mutagenicity assay*, Water, Air and Soil Pollution 114, 67-83, (1999)
6. Alloula R.A.M., *Undesirable side effects of drinking water chlorination by-items*, International Journal of Environmental Biology Research 1 (3), 29-33, (2014)
7. Alvarez D.A., *Development of semipermeable membrane devices (SPMDS) and polar organic chemical integrative samplers (POCIS) for environmental monitoring*, Environmental Toxicology and Chemistry 32 (10), 2179-2181, (2013)
8. Alvarez D.A., *Estimated Water Concentration Calculator from SPMDs from SPMD Data When Not Using PRCs: Version 4.1. Microsoft Excel spreadsheet*. <http://www.cerc.usgs.gov/Branches.aspx?BranchId=8;> (2010b)
9. Alvarez D.A., *Guidelines for the use of the semipermeable membrane device (SPMD) and the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) in environmental monitoring studies*, U.S. Geological Survey, Techniques and Methods 1–D4 2010, (2010a)
10. Amdany R., Chimuka L., Cukrowska E., Kukučka P., Kohoutek J., Vrana B., *Investigating the temporal trends in PAH, PCB and OCP concentrations in Hartbeespoort Dam, South Africa, using semipermeable membrane devices (SPMDs)*, Water SA 40(3), 425-436, (2014)
11. Anderson K.A., Sethajintanin, Sower G., Quarles L., *Field Trial and Modeling of Uptake Rates of In Situ Lipid-Free Polyethylene Membrane Passive Sampler*, Environmental Science & Technology 42, 4486–4493 (2008)
12. Augustijn-Beckers PW, Hornsby AG, Wauchope RD., *Additional Properties Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decision making II 137, (1994).
13. Bayen S., Segovia E., Loh L.L., Burger D.F., Eikaas H.S., Kelly B.C., *Application of Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) to monitor emerging contaminants in tropical waters*, Science of the Total Environment 482-483, 15-22, (2014)
14. Booij K., Sleiderink H.M., Smedes F., *Calibrating the uptake kinetics of semipermeable membrane devices, using exposure standards*, Environmental Toxicology and Chemistry 17, 1236-1245, (1998)
15. Buschini A., Giordani F., Pellacani C., Rossi C., Poli P., *Cytotoxic and genotoxic potential of drinking water: A comparison between two different concentration methods*, Water Research 42, 1999 – 2006 (2008)
16. Bustamante J., Navarro P., Arana G., de Diego A., Madariaga J.M., *Ultrasound assisted dialysis of semi-permeable membrane devices for the simultaneous analysis of a wide number of persistent organic pollutants*, Talanta 114, 32-37, (2013)
17. Butković V., Klasinc L., Orhanovic M., Turk J., *Reaction Rates of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons with Ozone in Water*, Environmental Science & Technology 17, 546-548 (1983)
18. Cantor K.P., *Carcinogens in drinking water: The epidemiological evidence*, Reviews on Environmental Health 25(1), 9-16, (2008)
19. Cantor K.P., *Drinking water and cancer*, Cancer Causes and Control 8, 292-308, (1997)

20. Castillo LE, Martinez E, Ruepert C, Savage C, Gilek M, Pinnock M, Solis E., *Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation, Limon, Costa Rica*, Science of the Total Environment 367, 418–32, (2006)
21. Chang W-T., Lee C-L., Brimblecombe P., Fang M-D., Chang K-T., *The effect of flow rate and temperature on SPMD measurements of bioavailable PAHs in seawater*, Marine Pollution Bulletin 97, 217-223 (2015)
22. Chęć E., Podgórska B., Węgrzyn G., *Direct addition of cultures of tester bacteria into semi-permeable membrane devices (SPMDs) as a modified procedure for preliminary detection of mutagenic pollution of the marine environment by use of microbiological mutagenicity assays*, Mutation Research 611, 17-24 (2006)
23. Chen Y., Jia R., Yang S., *Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water dissolved phase, suspended particulate matter and sediment from Weihe River in Northwest China*, International Journal of Environmental Research and Public Health 12, 14148-14163, (2015)
24. Chepchirchir B.S., Paschke A., Schüürmann G., *Passive sampling for spatial and temporal monitoring of organic pollutants in surface water of a rural-urban river in Kenya*, Science of the Total Environment 601-602, 453-460 (2017)
25. Cranor W.L., Alvarez D.A., Perkins S.D., Tegerdine G.A., Clark R.C., Huckins J. N., *Use of semipermeable membrane device (SPMD) technology for a probabilistic assessment of hydrophobic organic contaminants in selected reaches of Virginia rivers* (U. S. Geological Survey, 2005)
26. Czyż A., Jasiecki J., Bogdan A., Szpilewska H., Węgrzyn G., *Genetically modified Vibrio harveyi strains as potential bioindicator of mutagenic pollution of marine environments*, Applied and Environmental Microbiology 66(2), 599-605, (2000)
27. Czyż A., Kowalska W., Węgrzyn G., *Vibrio harveyi mutagenicity assay as a preliminary test for detection of mutagenic pollution of marine water*, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 70, 1065-1070, (2003)
28. Czyż A., Szpilewska H., Dutkiewicz R., Kowalska W., Biniewska-Godlewska A., Węgrzyn G., *Comparison of the Ames test and a newly developed assay for detection of mutagenic pollution of marine environments*, Mutation Research 519, 67-74, (2002)
29. De Lorenzo ME, Scott GI, Ross PE., *Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review*. Environmental Toxicology and Chemistry 20, 84–98, (2001)
30. Dévier M.-H., Mazzellier P., Aït-Aïssa S., Budzinski H., *New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures*, Comptes Rendus Chimie 14, 766-779 (2011)
31. DeVita W.M., Crunkilton R.L., *Quality control associated with use of semipermeable membrane devices*, Environmental Toxicology and Risk Assessment 7, 237-245, ASTM STP 1333, E. E. Little, A. J. DeLonay, and B. M. Greenberg, Eds., American Society for Testing and Materials, 1998
32. Dizer H., Wittekindt E., Fischer B, Hansen P-D., *The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence umu-assays and selected biomarkers*, Chemosphere 46, 225-233, (2002)
33. Du Y., Lv X., Wu, Q., Zhang, D., Zhou, Y., Peng, L., & Hu, H, *Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: A review*, Journal of environmental sciences 58, 51-63, (2017).
34. Ellis S.G., Booij K., Kaputa M., *Comparison of semipermeable membrane device (SPMD) and large-volume solid-phase extraction techniques to measure water concentrations of 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, and 4,4'-DDD in Lake Chelan, Washington*, Chemosphere 72, 1112-1117, (2008)
35. Emelogu E. S., Pollard P., Robinson C.D., Smedes F., Webster L., Pliver I.W., McKenzie C., Seiler T.B., Holler H., Moffat C. F., *Investigating the significance of dissolved organic contaminants in aquatic environments: Coupling passive sampling with in vitro bioassays*, Chemosphere 90, 210-219 (2013)
36. Esteve-Turrillas F.A., Yusà V., Pastor A., de la Guardia M., *New perspectives in the use of semipermeable membrane devices as passive samplers*, Talanta 74, 443-457, (2008)
37. Fan Z., Gong S., Xu X., Zhang X., Zhang Y., Yu X., *Characterization, DBPs formation, and mutagenicity of different organic matter fractions in two source waters*, International Journal of Hygiene and Environmental Health 217, 300-306, (2014)

38. Farré M.J., Day S., Neale P.A., Stalter D., Tang J.Y.M., Escher B.I., *Bioanalytical and chemical assessment of the disinfection by-products formation potential: Role of organic matter*, Water Research 47, 5409-5421, (2013)
39. Fawell J., Nieuwenhuijsen M. J., *Contaminants in drinking water*, British Medical Bulletin 68, 199-208 (2003)
40. Franco S.S., Nardocci A.C., Günther W.M.D., *PAH biomarkers for human health risk assessment: a review of the state-of-the-art*, Cadernos de Saúde Pública, 24(4), 569-580 (2008)
41. Frankart C, Eullaff roy P, Vernet G. *Comparative effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in Lemna minor*, Environmental and Experimental Botany 49, 159–68, (2003)
42. Gaudet I.D., *Standard Procedure for MICROTOX Analysis*. WCMUC (1994)
43. Gilli G., Schiliro T., Pignata C., Traversi D., Carraro E., Baiocchi C., Aigotti R., Giacosa D., Fea E., *Application of semipermeable membrane devices. for assessing toxicity in drinking water*, Chemosphere 61, 1691-1699 (2005)
44. Girotti S., Ferri E.N., Fumo M.G., Maiolini E., *Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria*, Analytica Chimica Acta 608, 2-29, (2008)
45. Goodbred S.L., Bryant M.R., Alvarez D., Spencer T., *How useful are the “other” semipermeable membrane devices (SPMDs); the mini-unit (15.2 cm long)?*, Science of the Total Environment 407, 4149-4156, (2009)
46. Górecki T., Namieśnik J., *Passive sampling*, Trends in Analytical Chemistry 21,276-291 (2002)
47. Gourlay-Francé C., Lorgeoux C. Tusseau-Vuillemin M-H., *Polycyclic aromatic hydrocarbon sampling in wastewaters using semipermeable membrane devices: Accuracy of time-weighted average concentration estimations of truly dissolved compounds*, Chemosphere 73, 1194-1200 (2008)
48. Gourounti K., Lykeridou K., Protopapa E., Lazaris A., *Mechanisms of actions and health effects of organochlorine substances: a review*, Health Science Journal 2(2), 89-98, (2008)
49. Graindorge V., *Link Between Luminescence And Toxicity in Vibrio harveyi*, The Advocate, 9-10, (2001)
50. Grande M, Andersen S, Berge D., *Effects of pesticides on fish*, Norwegian Journal of Agricultural Sciences 13, 195–209, (1994)
51. Gromiec M., Sadurski A., Zalewski M., Rowiński P., *Zagrożenie związane z jakością wody*, Nuka 1, 99-122 (2014)
52. Guan Y., Wang X., Wong M., Sun G., An T., Guo J., Zhang G., *Evaluation of genotoxic and mutagenic activity of organic extracts from drinking water sources*, PLoS ONE 12(1): e0170454. doi: 10.1371/journal.pone.0170454 (2017)
53. Guilford J. P., *Fundamental Statistics in Psychology and Education*, New York, McGraw-Hill Book Company, (1965)
54. Gupta PK., *Pesticide exposure—Indian scene*, Toxicology 198, 83– 90, (2004)
55. Guzella L., Caterino F.D., Monarca S., Zani C., Feretti D., Zerbini I., Nardi G., Buschini A., Poli P, Rossi C., *Detection of mutagens in water-distribution systems after disinfection*, Mutation Research 608, 72-81, (2006)
56. Guzella L., Monarca S., Zani C., Feretti D., Zerbini I., Buschini A., Poli P, Rossi C., Richardson S.D., *In vitro potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants*, Mutation Research 564, 179-193, (2004)
57. Halmi I.E.H., Kai I.P.R., Johari W.L.W., Shoukor M.Y., *Toxicity assessment of bioluminescent rapid bioassays (Vibrio fischeri) on selected DBPs*, Journal of Environmental Microbiology and Toxicology 2(2), 47-52, (2014)
58. Han Y., Li N., Oda Y., Ma M., Rao K., Wang Z., Jin W., Hong G., Li Z., Luo Y., *Evaluation of genotoxic effects of surface water using a battery of bioassays indicating different mode of action*, Ecotoxicology and Environmental Safety 133, 448-456, (2016)
59. Huckins J.N., Lebo J.A., Tubergen M.W., Manuweera G.K, Gibson V.L., Perry J.D., *Binary concentration and recovery process*, United States Patent, Patent Number 5,098,573 (1992)
60. Huckins J.N., Manuweera G.K., Petty J.D., Mackay D., Lebo J.A., *Lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organic contaminants in water*, Environmental Science & Technology 27, 2489-2496 (1993)
61. Huckins J.N., Petty J.D., Booij K., *Monitors of organic chemicals in the environment*, Springer, (2006)
62. Huckins J.N., Petty J.D., Orazio C.E., Lebo J.A., Clark R.C., Gibson V.L., Gala W.R., Echols K.R., *Determination of Uptake Kinetics (Sampling Rates) by Lipid-Containing Semipermeable Membrane Devices*

- (SPMDs) for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Water, *Environmental Science & Technology* 33, 3918-3923 (1999)
63. Huckins J.N., Petty J.D., Zajicek J.A., Gibson V.L., *Device for the removal and concentration of organic compounds from the atmosphere*, United States Patent, Patent Number 5,395,426 (1995)
 64. IARC (International Agency for Research on Cancer), *Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures*, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 92, 765-771 (2010)
 65. Ibrahim I., Togola A., Gonzalez C., *Polar-Organic-Integrative Sampler (POCIS) uptake rates for 17 polar pesticides and degradation products: laboratory calibration*, *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9, (2012)
 66. Igwe J.C., Ukaogo P.O., *Environmental Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, *Journal of Natural Sciences Research* 5(7), 117-132 (2015)
 67. Jayaraj R., Megha P., Sreedev P., *Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment*, *Interdisciplinary Toxicology* 9 (3-4), 90-100, (2016)
 68. Jin A., Feng L., Zhang L., Liu Y., *Changes of the toxic potential of drinking water containing aminopyrine before and after chlorine disinfection as determined by the algal toxicity assay and the SOS/umu assay*, *International Biodeterioration & Biodegradation* 113, 269-275, (2016)
 69. Kafilzadeh F., *Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments of the Soltan Abad River, Iran*, *Egyptian Journal of Aquatic Research* 41, 227-231, (2015)
 70. Karacak B., Okay O.S., Henkelmann B., Pfister G., Schramm K.-W., "Water concentrations of PAH, PCB and OCP by using semipermeable membrane devices and sediments", *Marine Pollution Bulletin* 70, 258-265 (2013)
 71. Karyab H., Yunesian M., Nasserli S., Mahvi A.H., Ahmadkhaniha R., Rastkari N., Nabizadeh R., *Polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water of Teheran, Iran*, *Journal of Environmental Health Sciences & Engineering* 11:25, 1-7 (2013)
 72. Ke R., Li J., Qiao M., Xu Y., Wang Z., *Using Semipermeable Membrane Devices, Bioassays, and Chemical Analysis for Evaluation of Bioavailable Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water*, *Archives in Environmental Contamination and Toxicology* 53, 313-320 (2007)
 73. Kenneth P., *Carcinogens in Drinking Water: The Epidemiologic Evidence*, *Reviews on Environmental Health*, Vol. 25, No. 1, 9-16; (2010);
 74. Kim U.-J., Kim H.Y., Alvarez D.A., Lee I.-S., Oh J.-E., *Using SPMDs for monitoring hydrophobic organic compound in urban river in Korea compared with using conventional water grab samples*, *Science of Total Environment* 470-471, 1537-1544 (2014)
 75. Klučarova V., Benicka E., Vrana B., *Development of method of isolation and purification of PAHs from exposed semipermeable membrane devices (SPMDs) prior to GC-MS analysis*, *Acta Chimica Slovaca* 6, 281-287 (2013)
 76. Kocak E., Yetilmezsoy K., Gonullu M.T., Petek M., *A statistical evaluation of the potential genotoxic activity in the surface waters of the Golden Horn Estuary*, *Marine Pollution Bulletin* 60, 1708-1717, (2010)
 77. Koči V., Ocelka T., Grabic R., *Background level of POPs in ground water assessed on chemical and toxicity analysis of exposed semipermeable membrane devices*, *Air, Soil and Water Research* 2, 1-14, (2009)
 78. Kočí, V., Mlejnek, M., Kochánková, L., *Toxicological evaluation of exposed SPMD membranes* *Open Chemistry*, vol. 1, no. 1, 28-34, (2003)
 79. Koivusalo M.T., *Drinking water mutagenicity and cancer*, Publications of the National Public Health Institute, ISBN 951-740-083-7, A8, (1998)
 80. Kong Y., Kang J., Chen Z., Shen J., Zhao G., Fan L., Wu X., *Occurrence of organochlorine pesticides from typical water sources in YiXing City, Taihu Upper-River Basin, East China*, *RSC Advances* 6, 114159-114170, (2016)
 81. Kowal L., Świdorska-Bróz M., *Oczyszczanie wody* (PWN, Warszawa, 2007)
 82. Kusamran W.R., Tanthasri N., Meesiripan N., Tepsuwan A., *Mutagenicity of the drinking water supply in Bangkok*, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 4, 31-38, (2003)

83. Lah B., Žinko B., Narat M., Marinšek-Logar R., *Monitoring of genotoxicity in drinking water using in vitro Comet assay and Ames test*, Food Technology and Biotechnology 43(2), 139-146, (2005)
84. Lah B., Žinko B., Tišler T., Marinšek-Logar R., *Genotoxicity detection in drinking water by Ames test, Zimmermann test and Comet Assay*, Acta Chimica Slovenica 52, 341-348, (2005)
85. Lallas P., *Reproductive Effects in Birds Exposed to Pesticides and Industrial Chemicals. The Stockholm Convention on persistent organic pollutants*, American Journal of International Law 95, 692–708, (2001)
86. Li J., Li F., Liu Q., *Sources, concentrations and risk factors of organochlorines pesticides in soil, water and sediment in the Yellow River estuary*, Marine Pollution Bulletin 100, 516-522, (2015)
87. Li J., Shang X., Zhao Z., Tanguay R.L., Dong Q., Huang C., *Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment, soil, and plants of the Aojiang River waterway in Wenzhou, China*, Journal of Hazardous Materials 173(1-3), 75–81 (2010)
88. Liao L.B., Xiao X.M., *Accumulation of organochlorine pesticides by semipermeable membrane devices using composite complex*, Chemosphere 64, 1592-1600, (2006)
89. Liess M, Brown C, Dohmen P, Duquesne S, Heimbach F, Kreuger J., *Effects of Pesticides in the Field—EPIF. Brussels, Belgium*, SETAC Press, (2005)
90. Liu Z., Zheng G., Liu Z., *Organochlorine Pesticides in Surface Water of Jiuxi Valley, China: Distribution, Source Analysis, and Risk Evaluation*, Journal of Chemistry, Volume 2020, Article ID 5101936, 1-8 (2020)
91. Lu Y., Wang Z., Huckins J., *Review of the background and application of triolein-containing semipermeable membrane devices in aquatic environmental study*, Aquatic Toxicology 60, 139-153 (2002)
92. Luellen D.R., Shea D., *Calibration and Field Verification of Semipermeable Membrane Devices for Measuring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water*, Environmental Sciences & Technology 36, 1791-1797 (2002)
93. Lv X., Lu Y., Yang X., Dong X., Ma K., Xiao S., Wang Y., Tang F., *Mutagenicity of drinking water sampled from the Yangtze River and Hanushi River (Wuhan section) and correlations with water quality parameters*, Scientific Reports, 5: 9572, 1-8, (2015)
94. Macova M., Toze S., Hodgers L., Mueller J.F., Bartkow M., Escher B.I., *Bioanalytical tools for the evaluation of organic micropollutants during sewage treatment, water recycling and drinking water generation*, Water Research 45, 4238-4247 (2011)
95. Madill R.E.A., Brownlee G.D., Josephy P.D., Brunce N.J., *Comparison of the Ames Salmonella assay and Mutatox genotoxicity assay for assessing the mutagenicity of polycyclic aromatic compounds in pore water from Athabasca oil sands mature fine tailings*, Environmental Science & Technology 33, 2510-2516, (1999)
96. Marrucci A., Marras B., Campisi S.S., Schintu M., *Using SPMDs to monitor the seawater concentrations of PAHs and PCBs in marine protected areas (Western Mediterranean)*, Marine Pollution Bulletin 75, 69-75 (2013)
97. McGregor D.B., *Genotoxic Chemicals in the Human Environmental: Their Identification and Interaction*, Methods for Assessing the Effects of Mixtures of Chemicals, 523-542 (1987)
98. Mersch-Sundermann V., Klopman G., Rosenkranz H., *Chemical structure and genotoxicity: studies of the SOS chromotest*, Mutation Research 340, 81-91, (1996)
99. Metcalfe C., Hoque M.E., Sultana T., Murray C., Helm P., Kleywegt S., *Monitoring for contaminants of emerging concern in drinking water using POCIS passive samplers*, Environmental Science Processes & Impact, (2014)
100. Miège C., Mazzella N., Allan I., Dulio V., Smedes F., Tixier C., Vermeirssen E., Brant J., O'Toole S., Budzinski H., Ghestem J.-P., Staub P.-F., Lardy-Fontan S., Gonzalez J.-L., Coquery M., Vrana B., *Position paper on passive sampling techniques for the monitoring of contaminants in the aquatic environment – Achievements to date and perspectives*, Trends in Environmental Analytical Chemistry 8, 20-26, (2015)
101. Miège C., Mazzella N., Schiavone S., Dabrin A., Berho C., Ghestem J.-P., Gonzalez C., Gonzalez J.-L., Lalere B., Lardy-Fontan S., Lepot B., Munaron D., Tixier C., Togola A., Coquery M., *An in situ intercomparison exercise on passive samplers for monitoring metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and pesticides in surface water*, Trends in Analytical Chemistry 36, 128-143 (2012)
102. Montuori P., De Rosa E., Sarnacchiaro P., Di Duca F., Provisiero D.P., Nardone A., Triassi M., *Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in water and sediment from Volturno River, Southern Italy: occurrence, distribution and risk assessment*, Environmental Sciences Europe 32: 123, 1-22, (2020)

103. Morin N., Miège, Randon J., Coquery M., *Chemical calibration, performance, validation and applications of the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) in aquatic environments*, Trends in Analytical Chemistry 36, 144-175, (2012)
104. Moring J.B., *Occurrence and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in semipermeable membrane devices and clams in three urban streams of the Dallas-Fort Worth Metropolitan area, Texas*, Chemosphere 34, 551-566 (1997)
105. Mueller J.F., Mortimer M.R., O'Brein J., Komarova T., Carter S., *A cleaner river: Long term use of semipermeable membrane devices demonstrate that concentrations of selected organochlorines and PAHs in the Brisbane River estuary, Queensland have reduced substantially over the past decade*, Marine Pollution Bulletin 63, 73-76 (2011)
106. Nawrocki J., *Ubozyczne produkty utleniaania i dezynfekcji wody – doświadczenia ostatnich 30 lat*, Ochrona Środowiska 27(4), 3-12, (2005)
107. Nie X., Liu W., Zhang L., Liu Q., *Genotoxicity of drinking water treated with different disinfectants and effects of disinfection conditions detected by umu-test*, Journal of Environmental Sciences (China) 56, 36-44, (2017)
108. NIOSH 5506 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by HPLC, dostępny w Internecie: <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5506.pdf> (1998)
109. Nowacka A., Włodarczyk-Makula M., *Effectiveness of priority PAH removal in water coagulation process*, Water Science & Technology: Water Supply 15.4, 683-692 (2015a)
110. Nowacka A., Włodarczyk-Makula M., *Monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water during Preparation Processes*, Polycyclic Aromatic Compounds 33:5, 430-450 (2013)
111. Nowacka A., Włodarczyk-Makula M., Tchórzewska-Cieślak B., Rak J., *The ability to remove the priority PAHs from water during coagulation process including risk assessment*, Desalination and Water Treatment, 1-13 (2015b)
112. Nowacka A., Włodarczyk-Makula M., *The coagulant type influence on removal efficiency of 5- and 6-ring PAHs during water coagulation proces*, Civil and Environmental Engineering Reports, 13(2), 63-73 (2014)
113. Ohe T., Watanabe T., Wakabayashi K., *Mutagens in surface waters: a review*, Mutation Research 567, 109-149 (2004)
114. Opracowanie zbiorowe, *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy*, zeszyt nr 3 (25), dostępny w Internecie: https://www.ciop.pl/CIOPPortalWAR/appmanager/ciop/pl?_nfpb=true&_pageLabel=P15600349351347547316936&magazineEditionId=337 (2000)
115. Pan E., Sun H., Xu Q., Zhang Q., Liu L., Chen X., Xu Y., *Polycyclic Aromatic Hydrocarbones Concentartions in Drinking Water in Villages along the Huain River in China and Their Association with High Cancer Incidence in Local Population*, BioMed Research International, 1-10 (2015)
116. Pathak N., Tran W.H., Merenda A., Johir M.A.H., Phuntsho S, Shon H., *Removal of Organic Micro-Pollutants by Conventional Membrane Bioreactors and High-Retention Membrane Bioreactors*, Applied Sciences 10, 2969, 1-32, doi:10.3390/app10082969 (2020)
117. Paulik L.B., Smith B.W., Bergmann A.J., Sower G.J., Forsberg N.D., Teeguarden J.G., Anderson K.A., *Passive samplers accurately predict PAH levels in resident crayfish*, Science of the Total Environment 544, 782-791 (2016)
118. Pazdro K., *An approach for assessment of waterborne bioavailable organic contaminants using semipermeable membrane devices (SPMDs)*, Rocznik Ochrona Środowiska 4, 189-205 (2002)
119. Petty J.D., Huckins J.N., Jones S.B., Boyle T.P., *An approach for assessment of water quality using semipermeable membrane devices (SPMDs) and bioindicator tests*, Chemosphere 41, 311-321 (2000)
120. Pimentel D., *Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics*, Journal of Agricultural and Environmental Ethics 8(1), 17-29, (1995)
121. PN-Z-04240-5:2006 Ochrona czystości powietrza: Badania zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych -- Część 5. (2006)
122. Podgórska B, Węgrzyn G., *A modified Vibrio harveyi mutagenicity assay based on bioluminescence induction*, Letters in Applied Microbiology 42, 578-582, (2006)
123. Podgórska B, Węgrzyn G., *The use of marine bacteria in mutagenicity assay*, Polish Journal of Microbiology 56 (4), 227-231, (2007a)

124. Podgórska B., Pazdro K., Pempkowiak J., Węgrzyn G., *The use of a novel Vibrio harveyi luminescence assay in testing marine water for the presence of mutagenic pollution*, Marine Pollution Bulletin 54, 808-814 (2007b)
125. Podsiadły T., *Genotoksyczność wody do picia w wybranych wodociągach*, Ochrona Środowiska 74(3), 45-48, (1999)
126. Pogorzelec M., Piekarska K., *Application of semipermeable membrane devices for long-term monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons at various stages of drinking water treatment*, Science of The Total Environment., 631-632, 1431-1439, (2018)
127. Prest H.F., Richardson B.J., Jacobson L.A., Vedder J., Martin M., *Monitoring organochlorines with semi-permeable membrane devices (SPMDs) and mussels (Mytilus edulis) in Corio Bay, Victoria, Australia*, Marine Pollution Bulletin 30(8), 543-554, (1995)
128. Quijano R., *Endosulfan poisoning in Kasaragod, Kerala, India*, Report on a fact finding mission, PAN(2002)
129. Quillardet P., Hofnung M., *The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures*, Mutation Research 147, 65-78, (1985)
130. Quillardet P., Hofnung M., *The SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 79, 5971-5975, (1982)
131. Rad M.H.R., Nazari Z., Behfar A., Reissi G., Amirpoor R., Dadfar A., Majd S.S., *Effect Of Water Treatment Process On Organochlorine Pesticide Residue Levels In Ahvaz Water Treatment Plant 2*, Ukrainian Journal of Ecology, 7(4), 349-352, (2017)
132. Rantalainen A.L., Cretney W.J., Ikononou M.G., *Uptake rates of semipermeable membrane devices (SPMDs) for PCDDs, PCDFs and PCBs in water and sediment*, Chemosphere 40 147-158 (2000)
133. Rengarajan T., Rejendran P., Nanakumar N., Lokeshkumar B., Rajendran P., Nishigaki I., *Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 5(3), 182-190 (2015)
134. Richardoson S. D. *Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water*, Trends in Analytical Chemistry 22, 666-684 (2003)
135. Rincón-Bedoya E., Velásquez N., Quijano J., Bravo-Linares C., *Mutagenicity and genotoxicity of water treated for human consumption induced by chlorination by-products*, Journal of Environmental Health, 1-9, (2013)
136. Rosenmai, A.K., Lundqvist J., le Godec T., Ohlsson Å., Tröger R., Hellman B., Oskarsson A., *In vitro bioanalysis of drinking water from source to tap*, Water Research 139, 272-280, (2018)
137. Ruiz M.J., Marzin D., *Genotoxicity of six pesticides by Salmonella mutagenicity test and SOS chromotest*, Mutation Research 390, 245-255, (1997)
138. Rusin M., Marchwińska-Wyrwał E., *Zagrożenia zdrowotne związane ze środowiskowym narażeniem na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)*, Medycyna Środowiskowa 17, 7-13 (2014)
139. Sabaliūnas D., Lazutka J.R., Sabaliuniene I., *Acute toxicity and genotoxicity of aquatic hydrophobic pollutants sampled with semipermeable membrane devices*, Environmental Pollution 109, 251-265 (2000)
140. Sabaliūnas D., Södergren A., *Use of semipermeable membrane devices to monitor pollutants in water and asses their effects: a laboratory test and field verification*, Environmental Pollution 96, 195-205 (1997)
141. Sadowska A., Obidowska G., Rumowska M., *Ekotoksykologia*, SGGW, Warszawa (2000)
142. Schaefer M., *Pharmaceutical and Personal Care Products in the Sacramento River-Report, Standard Operating Procedure: Preparation of SPMDs for Dialysis*, SOP E-14, SOP E-15 (2009)
143. Sciacca S., Conti G.O., *Mutagens and Carcinogens in drinking water*, Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism 2, 157-162 (2009)
144. Šetková L., Hajšlová J., Bergqvist P.-A., Kocourek V., Kazda R., Suchan P., *Fast isolation of hydrophobic organic environmental contaminants from exposed semipermeable membrane devices (SPMDs) prior to GC analysis*, Journal of Chromatography A 1092, 170-181 (2005)
145. Shen L., Wu J.-Y., Lin G.-F., Shen J.-H., Westendorf J., Huehnerfuss H., *The mutagenic potentials of tap water samples in Shanghai*, Chemosphere 52, 1641-1646, (2003)

146. Shi X., Zhou J.L., Zhao H., Hou L., Yang Y., *Application of passive sampling in assessing the occurrence and risk of antibiotics and endocrine disrupting chemicals in the Yangtze Estuary, China*, *Chemosphere* 111, 344-351, (2014)
147. Singh Z., Kaur J., Kaur R., Hundal S.S., *Toxic effects of organochlorine pesticides: a review*, *American Journal of BioScience. Special Issue: Recent Trends in Experimental Toxicology* 4, 11-18, (2016)
148. Södergren A., *Solvent-filled dialysis membranes simulate uptake of pollutants by aquatic organisms*, *Environmental Science & Technology* 21(9), 855-859, (1987)
149. Srogi K., *Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review*, *Environmental Chemistry Letters* 5, 169-195 (2007)
150. Stuer-Lauritsen F., Kjølhot J., *Identification of selected hydrophobic organic contaminants in wastewater with semipermeable membrane devices (SPMDs)*, *Water Research* 34, 3478-3482, 2000
151. Sun C., Zhang J., Ma Q., Chen Y., Ju H., *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water and sediment from a river basin: sediment–water partitioning, source identification and environmental health risk assessment*, *Environ Geochem Health* 39, 63–74 (2017)
152. Świdarska-Bróż M., *Mikrozanieczyszczenia w środowisku wodnym*, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 1993
153. Takanashi H., Kishida M., Nakajima T., Ohki A., Akiba M., *Surveying the mutagenicity of tap water to elicit the effects of purification processes on Japan tap water*, *Chemosphere* 77, 434-439, (2009)
154. Traczewska T.M., *Biologiczne metody oceny skażenia środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, (2011)
155. Traczewska T.M., *Biomonitoring mutagenności mikrozanieczyszczeń wody do picia*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, (2002)
156. Trusz-Zdybek A., *Prognozowanie potencjalnej mutagenności wody powierzchniowej, po jej oczyszczeniu i dezynfekcji chlorem*, Praca doktorska, Wrocław, dostępne w Internecie: http://www.dbc.wroc.pl/Content/3440/Trusz_Prognozowanie_PhD.pdf, (2009)
157. Uher E., Mirande-Bret C., Gourlay-Francé C., *Assessing the relation between anthropogenic pressure and PAH concentrations in surface water in the Seine River basin using multivariate analysis*, *Science of the Total Environment*, 557-558, 551-561, (2016)
158. Valičková M., Derco J., Šimovičová K., *Removal of selected pesticides by adsorption*, *Acta Chimica Slovaca* 6, 25-28, (2013)
159. Veil F., *Public health impact of pesticides used in agriculture*, Geneva, Switzerland, WHO Report, (1990)
160. Vrana B., Mills G.A., Allan I.J., Dominiak E., Svensson K., Knutsson, Morrison G., Greenwood R., *Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water*, *Trends in Analytical Chemistry* 24(10), 845-868, (2005)
161. Vrana B., Paschke A., Popp P., Schüürmann G., *Use of semipermeable membrane devices (SPMDs), Determination of bioavailable, organic, waterborne contaminants in the industrial region of Bitterfeld, Saxony-Anhalt, Germany*, *Environmental Science and Pollution Research* 8, 27-34 (2001)
162. Vrana B., Schüürmann G., *Calibrating the uptake kinetics of semipermeable membrane devices in water: Impact of hydrodynamics*, *Environmental Science & Technology* 36, 290-296 (2002)
163. Wang D., Xu Z., Zhao Y., Yan X., Shi J., *Change of genotoxicity for raw and finished water: Role of purification processes*, *Chemosphere* 83, 14-20, (2011)
164. Wang J., Bi Y., Henkelmann B., Pfister G., Zhang L., Schramm K-W., *PAHs and PCBs accumulated by SPMD-based virtual organisms and feral fish in Three Gorges Reservoir, China*, *Science of the Total Environment* 542, 899-907 (2016)
165. Wang J., Song G., Li A., Henkelmann B., Pfister G., Tong A.Z., Schramm K-W., *Combined chemical and toxicological long-term monitoring for AhR agonists with SPMD-based virtual organisms in drinking water Danjiangkou Reservoir, China*, *Chemosphere* 108, 306-313 (2014)
166. Węgrzyn G., Czyż A., *Detection of mutagenic pollution of natural environment using microbiological assays*, *Journal of Applied Microbiology* 95, 1175-1181, (2003)
167. Węgrzyn G., Czyż A., *How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bioluminescence in aquatic biotechnology*, *Oceanologia* 44(3), 291-305, (2002)

168. Wenzel K-D., Vrana B., Hubert A., Schüümann G., *Dialysis of persistent organic pollutants and polycyclic aromatic hydrocarbons from semipermeable membranes. A procedure using an accelerated solvent extraction device*, Analytical Chemistry 76, 5503-5509 (2004)
169. WHO (World Health Organization), *Guidelines for drinking-water quality*, Fourth edition, 2011
170. Zani C., Feretti D., Buschini A., Poli P., Rossi C., Guzella L., Di Caterino F., Monarca S., *Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps*, Mutation Research 587, 26-37 (2005)
171. Zbieć E., Dojlido J.R., *Uboczne produkty dezynfekcji wody*, Ochrona Środowiska 74(3), 37-44, (1999)
172. Žegura B., Heath E., Černoša A., Filipič M., *Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples*, Chemosphere 75, 1453-1460, (2009)
173. Zimmerman L.R., Thurman E.M., Bastian K.C., *Detection of persistent organic pollutants in the Mississippi Delta using semipermeable membrane devices*, Science of the Total Environment 248, 169-179 (2000).

WYKAZ RYSUNKÓW

Rys. 1. Źródła i drogi przemieszczania się mikrozanieczyszczeń w środowisku wodnym (Pathak i in., 2020)	9
Rys. 2. Zasada działania urządzenia z membraną półprzepuszczalną (Huckins i in., 2006)	37
Rys. 3. Montaż urządzenia z membraną półprzepuszczalną A: na chwytaku, B: w perforowanym pojemniku	43
Rys. 4. Układ technologiczny stosowany w Zakładzie Uzdatniania Wody "Mokry Dwór", z wybranymi punktami pobierania próbek (A-D)	44
Rys.5. Suma stężeń wszystkich wykrytych WWA [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] w próbkach wody z różnych etapów uzdatniania (A: przepompownia - dopływ wody surowej; B: rurociąg - strumień wody tuż przed ozonowaniem; C: zbiornik czystej wody, D- bieżącą wodą w zlewie laboratoryjnym) w określonych miesiącach	63
Rys. 6. Suma stężeń WWA z grupy 1 i 2B klasyfikacji IARC ($\Sigma 7$ WWA) [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] w próbkach z różnych etapów uzdatniania wody pitnej (A: przepompownia - wejście wody surowej; B: rurociąg - strumień wody tuż przed ozonowaniem; C: zbiornik czystej wody, D- woda bieżąca w zlewie laboratoryjnym) w poszczególnych miesiącach	63
Rys. 7. Stężenie WWA [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] wykrytych w próbkach wody z punktu A (przepompownia - dopływ wody surowej) w określonych miesiącach	64
Rys. 8. Stężenie WWA [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] wykrytych w próbkach wody z punktu D (woda uzdatniona po przejściu przez system dystrybucji), w poszczególnych miesiącach	65
Rys. 9. Porównanie średniej sumy stężeń Σ WWA w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku	66
Rys. 10. Suma stężeń wszystkich wykrytych PCO [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] w próbkach z różnych etapów uzdatniania wody (A: przepompownia - dopływ wody surowej; B: rurociąg - strumień wody tuż przed ozonowaniem; C: zbiornik czystej wody, D- bieżącą wodą w zlewie laboratoryjnym) w określonych miesiącach	72
Rys. 11. Stężenie poszczególnych PCO [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$] wykrytych w próbkach wody z punktu A (przepompownia - dopływ wody surowej) w określonych miesiącach	72
Rys. 12. Porównanie średniej sumy stężeń Σ PCO w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku	75
Rys. 13. Wartości parametrów $1/EC_{50}$ oraz $V_{tox(50)}$ uzyskane w teście Microtox po 5- i 15-minutowej ekspozycji organizmów testowych na działanie związków zawartych w próbkach	81
Rys. 14. Porównanie toksyczności wyrażonej jako $1/EC_{50}$ w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku, dla $t=5$ i $t=15$	82
Rys. 15. Maksymalny współczynnik indukcji (MIF) dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach uzyskanych w teście SOS-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+)	85
Rys. 16 Porównanie genotoksyczności wyrażonej jako Maksymalny współczynnik indukcji (MIF) w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku, uzyskanych w teście SOS-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+)	86
Rys. 17 Maksymalny współczynnik indukcji (MIF) dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach uzyskanych w teście UMU-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+)	89
Rys.18 Porównanie genotoksyczności wyrażonej jako Maksymalny współczynnik indukcji (MIF) w próbkach wody surowej (punkt A) dla różnych pór roku, uzyskanych w teście UMU-Chromotest w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+)	90
Rys. 19. Suma stężeń WWA i wartości współczynnika MIF uzyskane w teście SOS-Chromotest	94
Rys. 20. Suma stężeń WWA i wartości współczynnika MIF uzyskane w teście UMU-Chromotest	95
Rys.21. Suma stężeń PCO i wartości parametru $1/EC_{50}$ uzyskane w teście Microtox	95

WYKAZ TABEL

Tabela 1. Podział krótkoterminowych testów genotoksyczności w zależności od wykrywanego efektu	29
Tabela 2. Zalety i wady próbników pasywnych (Górecki i in., 2002; Shi i in., 2014).....	36
Tabela 3. Przykłady związków zatrzymywanych w membranie SPMD	40
Tabela 4. Charakterystyka punktów pobierania próbek	45
Tabela 5. Stosowane w rozprawie oznaczenia próbek wraz z opisem	46
Tabela 6. Lista analizowanych szesnastu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz ich wybrane właściwości.....	49
Tabela 7. Granica wykrywalności i granica oznaczalności wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oznaczanych na chromatografie cieczowym AT 1200 firmy Agilent Technologies z detektorem fluorescencyjnym	51
Tabela 8. Wybrane pestycydy chloroorganiczne.....	52
Tabela 9. Wybrane lotne związki organiczne.....	53
Tabela 10. Stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oznaczanych ilościowo [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$].....	62
Tabela 11. Stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oznaczanych ilościowo [ng/L].....	69
Tabela 12. Stężenia wybranych pestycydów chloroorganicznych oznaczanych ilościowo [$\mu\text{g}/\text{SPMD}$].....	70
Tabela 13. Stężenia CTWA wybranych pestycydów chloroorganicznych oznaczanych ilościowo [ng/L wody].....	77
Tabela 14. Wartości parametrów EC_{50} , $1/\text{EC}_{50}$, oraz $V_{\text{tox}(50)}$ po czasie ekspozycji 5 i 15 min dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach.....	79
Tabela 15. Podsumowanie ilości próbek w poszczególnych klasach toksyczności	80
Tabela 16. Wartości parametrów MIF (Maximum Induction Factor) dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+) w teście SOS-Chromotest.....	84
Tabela 17. Podsumowanie ilości próbek zaklasyfikowanych jako genotoksyczne w teście SOS-Chromotest	86
Tabela 18. Wartości parametrów MIF (Maximum Induction Factor) dla próbek wody pochodzącej z różnych etapów uzdatniania, w poszczególnych miesiącach w wariancie bez aktywacji metabolicznej (S9-) oraz z aktywacją metaboliczną (S9+) w teście UMU-Chromotest.....	88
Tabela 19. Podsumowanie ilości próbek zaklasyfikowanych jako genotoksyczne w teście UMU-Chromotest	90
Tabela 20. Zestawienie średnich wyników uzyskanych dla poszczególnych analiz w zależności od pory roku, w punkcie A (przepompownia - dopływ wody surowej). Strzałkami zaznaczony wartości największe (\uparrow) i najmniejsze (\downarrow) dla danej analizy	92
Tabela 21. Matryca wartości współczynnika korelacji rang (r) Spearmana pomiędzy wynikami przeprowadzanych analiz chemicznych i biologicznych. Pogrubione wartości są statystycznie istotne z $p < 0,05$	93
Tabela 22. Matryca korelacji pomiędzy stężeniem występujących w próbkach WWA i wynikami analiz biologicznych. Pogrubione wartości są statystycznie istotne z $p < 0,05$	96
Tabela 23. Matryca korelacji pomiędzy stężeniem występujących w próbkach pestycydów chloroorganicznych i wynikami analiz biologicznych. Pogrubione wartości są statystycznie istotne z $p < 0,05$	96

ZAŁACZNIK

