

Politechnika Wrocławska
Instytut Inżynierii Ochrony Środowiska

Praca doktorska
mgr inż. Agnieszka Trusz-Zdybek

Prognozowanie potencjalnej mutagenności
wody powierzchniowej, po jej oczyszczeniu
i dezynfekcji chlorem

Promotor dr hab. Teodora M. Traczewska, prof. nadzw. P.Wr.

Wrocław, 2009 r.

SPIS TREŚCI:

Spis rysunków	4
Spis tabel	4
Spis zdjęć.....	5
Spis wykresów.....	5
Spis skrótów	7
WPROWADZENIE	8
1. <i>Wody powierzchniowe jako surowiec do procesów uzdatniania</i>	11
1.1. Zasoby wodne na terenie Polski	11
1.2. Jakość wód powierzchniowych	13
1.3. Skład chemiczny i mikrobiologiczny wód powierzchniowych i ich wpływ na zdrowie człowieka	14
2. <i>Uzdatnianie wód powierzchniowych - dezynfekcja</i>	17
2.1. Chlor – krótka charakterystyka z uwzględnieniem tworzenia UPD	19
2.2. Dwutlenek chloru – krótka charakterystyka z uwzględnieniem tworzenia UPD.....	22
3. <i>Aktywność biologiczna ubocznych produktów dezynfekcji wody, głównie UPCh z uwzględnieniem powstawania chorób nowotworowych</i>	25
3.1. Mutagenność innych niż UPD mikrozanieczyszczeń wody	32
4. <i>Metody bioindykacyjne oceny aktywności mutagennej mikrozanieczyszczeń wody</i>	34
4.1. Test Ames a i jego zastosowanie w badaniach potencjalnej mutagenności mikrozanieczyszczeń wody do picia	37
4.2. Sposoby przedstawiania i analiza wyników testu Ames a	38
4.2.1. Statystyka opisowa [128-133]	39
4.2.2. Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów	40
4.2.3. Charakter krzywej dawka-odpowiedź	41
4.2.4. Współczynnik mutagenności (MR)	43
4.2.5. Aktywność mutagenna AM [127].....	43
4.2.6. Mutagenność M	44
4.3. Korelacja [132, 133].....	44
4.4. Regresja wieloraka [143, 144].....	45
5. <i>Fiński model przewidywania mutagenności wody do picia</i>	46
CEL PRACY.....	49
TEZA.....	49
II CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	50
1. <i>Materiały i metody</i>	50
1.1. 1.1. Przygotowanie próbek wody do badań.....	50
1.1. 1.1. Przygotowanie próbek wody do badań.....	51
1.2. Dezynfekcja wody	51
1.3. Metody analityczne	52
1.4. Procedura uzyskiwania ekstraktów organicznych z badanych wód	53
1.4.1. Żywice	53
1.4.2. Procedura zateżania i ekstrakcji związków organicznych z wód.....	53
1.5. Badania bioindykacyjne – Test Ames a.....	55
1.5.1. Podłoża stosowane w teście Ames a.....	56
1.5.2. Przygotowanie frakcji.....	58
1.5.3. Procedura testu Ames a [4, 5, 120, 121].....	58
1.6. Metody przedstawiania i analizy wyników testu Ames a	59
1.6.1. Opisywanie danych wyników własnych.....	59
1.6.2. Rozkład prawdopodobieństwa rezultatów testów Ames a.....	60
1.6.3. Charakter krzywej zależności dawka-odpowiedź wyników testów Ames a.....	60
1.6.4. Obliczanie współczynnika mutagenności (MR)	61
1.6.5. Wyznaczanie mutagenności M wody (l. rew/dm ³)	61

1.7.	Fiński model do prognozowania potencjalnej mutagenności mikrozanieczyszczeń wody – założenia [21]	62
1.8.	Korelacja wyników własnych.....	63
1.9.	Dopasowywanie modelu regresji wielorakiej do danych rzeczywistych.....	63

III WYNIKI I OMÓWIENIE..... 65

1.	<i>Woda modelowa – etap I badań</i>	65
1.1.	Woda modelowa dezynfekowana chlorem – etap IA.....	67
1.1.1.	Uboczne produkty dezynfekcji wody modelowej chlorem.....	68
1.1.2.	Badania bioindykacyjne – test Ames – woda modelowa dezynfekowana chlorem.....	70
1.1.2.1.	Wyniki testu Ames wraz z podstawową statystyką opisową – etap IA.....	71
1.1.2.2.	Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody modelowej - IA.....	72
1.1.2.3.	Krzywa zależności dawka–odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem.....	74
1.1.2.4.	Współczynnik mutagenności (MR) wody modelowej dezynfekowanej chlorem.....	78
1.1.2.5.	Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem.....	83
1.2.	Woda modelowa dezynfekowana chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – etap IB.....	85
1.2.1.	Uboczne produkty dezynfekcji wody modelowej – etap IB.....	85
1.2.2.	Badania bioindykacyjne – test Ames – etap IB.....	88
1.2.2.1.	Wyniki testu Ames wraz z podstawową statystyką opisową – etap IB.....	88
1.2.2.2.	Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody modelowej - IB.....	90
1.2.2.3.	Krzywa zależności dawka–odpowiedź dla wody modelowej – etap IB.....	92
1.2.2.4.	Współczynnik mutagenności (MR) wody modelowej – etap IB.....	95
1.2.2.5.	Mutagenność M wody modelowej – etap IB.....	100
1.3.	Próba weryfikacji modelu fińskiego na podstawie badań na wodzie modelowej.....	101
1.3.1.	Zastosowanie fińskiego modelu do obliczenia mutagenności wody modelowej.....	101
1.4.	Korelacja wyników uzyskanych dla wody modelowej.....	103
1.5.	Propozycja wstępnego modelu prognozowania mutagenności wody do picia na podstawie wyników z wody modelowej.....	107
1.5.1.	Dopasowanie modelu regresji wielorakiej do danych z wody modelowej dezynfekowanej chlorem	108
1.5.2.	Dopasowanie modelu regresji wielorakiej do danych z wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem.....	109
2.	<i>Woda rzeczywista – etap II badań</i>	110
2.1.	Woda rzeczywista dezynfekowana chlorem – etap IIA.....	111
2.1.1.	Uboczne produkty dezynfekcji wody rzeczywistej chlorem.....	112
2.1.2.	Badania bioindykacyjne – test Ames – woda rzeczywista - etap IIA.....	114
2.1.2.1.	Wyniki testu Ames wraz ze statystyką opisową – etap IIA.....	115
2.1.2.2.	Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody rzeczywistej - IIA.....	117
2.1.2.3.	Krzywa zależności dawka – odpowiedź dla wody rzeczywistej - IIA.....	119
2.1.2.4.	Współczynnik mutagenności (MR) wody rzeczywistej - IIA.....	124
2.1.2.5.	Mutagenność M wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem.....	129
2.2.	Woda rzeczywista po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem – etap IIB.....	131
2.2.1.	Uboczne produkty dezynfekcji wody rzeczywistej - etap IIB.....	131
2.2.2.	Badania bioindykacyjne – test Ames – etap IIB.....	133
2.2.2.1.	Wyniki testu Ames wraz z podstawową statystyką opisową – etap IIB.....	134
2.2.2.2.	Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody rzeczywistej - IIB.....	136
2.2.2.3.	Krzywa zależności dawka–odpowiedź dla wody rzeczywistej – etap IIB.....	138
2.2.2.4.	Współczynnik mutagenności (MR) wody rzeczywistej – etap IIB.....	143
2.2.2.5.	Mutagenność M wody rzeczywistej – etap IIB.....	148
2.3.	Próba weryfikacji modelu fińskiego na podstawie badań na wodzie rzeczywistej.....	150
2.3.1.	Zastosowanie fińskiego modelu do obliczenia mutagenności wody rzeczywistej.....	150
2.4.	Korelacja wyników uzyskanych dla wody rzeczywistej.....	151
2.5.	Propozycja wstępnego modelu prognozowania mutagenności wody do picia na podstawie wyników z wody rzeczywistej.....	156
2.5.1.	Dopasowanie modelu regresji liniowej do danych z wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem	156
2.5.2.	Dopasowanie modelu regresji wielorakiej do danych z wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru.....	157

2.6. Weryfikacja wstępnych modeli regresji wielorakiej do prognozowania potencjalnej mutagenności wody do picia	157
---	-----

PODSUMOWANIE I Dyskusja Wyników	161
--	------------

WNIOski	180
----------------------	------------

LITERATURA	182
-------------------------	------------

Spis rysunków

<i>Rysunek 1 i 1a. Opady i odpływy wód na terenie Polski oraz rozkład sum opadów atmosferycznych [24]</i>	11
<i>Rysunek 2. Zasoby wody do picia w przeliczeniu na mieszkańca [25]</i>	12
<i>Rysunek 3. Dobowy pobór wody na potrzeby ludności na osobę [25]</i>	12
<i>Rysunek 4. Klasyfikacja jakości wód w rzekach Polski</i>	13
<i>Rysunek 5 i 5a. Zmiany liczb zarejestrowanych zachorowań na nowotwory złośliwe; ogółem i układu moczowo - pęciowego (u mężczyzn)</i>	31
<i>Rysunek 6. Schemat układu do zateżania i ekstrakcji próbek wody z zaznaczoną kolejnością żywic</i>	54
<i>Rysunek 7. Schemat testu Ames</i>	59
<i>Rysunek 8. Schemat przedstawiania i analizy uzyskanych wyników testów Ames</i>	164

Spis tabel

<i>Tabela 1. Klasyfikacja jakości wód w monitoringu diagnostycznym, Ochrona Środowiska 2007</i>	14
<i>Tabela 2. Klasy zanieczyszczeń identyfikowanych w wodzie do picia [4, 30, 34]</i>	15
<i>Tabela 3. Uboczne produkty chlorowania wody dwutlenkiem chloru [52]</i>	23
<i>Tabela 4. Dopuszczalne stężenia dwutlenku chloru, chlorynów i chloranów w wodzie do picia [80-83]</i>	24
<i>Tabela 5. Najważniejsze uboczne produkty dezynfekcji wody do picia i ich aktywność biologiczna [8, 51, 101, 102]</i>	29
<i>Tabela 6. Wybrane UPD i ich oddziaływanie na organizm człowieka [99, 103]</i>	30
<i>Tabela 7. Podział związków chemicznych wg IARC w zależności od ich potencjalnych właściwości kancerogennych</i>	32
<i>Tabela 8. Skład fizyczno-chemiczny wód modelowych</i>	66
<i>Tabela 9. Statystyka opisowa - woda modelowa IA - TA100-S9 mix</i>	71
<i>Tabela 10. Statystyka opisowa - woda modelowa IA - TA100+S9 mix</i>	71
<i>Tabela 11. Statystyka testowa - woda modelowa IA - TA100-S9 mix</i>	73
<i>Tabela 12. Statystyka testowa - woda modelowa IA - TA100+S9 mix</i>	73
<i>Tabela 13. Statystyka opisowa - woda modelowa IB- TA100-S9 mix</i>	89
<i>Tabela 14. Statystyka opisowa - woda modelowa IB - TA100+S9 mix</i>	89
<i>Tabela 15. Statystyka testowa - woda modelowa IB - TA100-S9 mix</i>	90
<i>Tabela 16. Statystyka testowa - woda modelowa IB - TA100+S9 mix</i>	90
<i>Tabela 17. Statystyka testowa wyników dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem</i>	103
<i>Tabela 18. Statystyka testowa wyników dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru</i>	104
<i>Tabela 19. Korelacja wyników dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem</i>	105
<i>Tabela 20. Korelacja wyników dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru</i>	106
<i>Tabela 21. Wyniki regresji wielorakiej dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem</i>	108
<i>Tabela 22. Wyniki regresji wielorakiej dla wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed chlorowaniem</i>	109
<i>Tabela 23. Skład fizyczno-chemiczny wody rzeczywistej</i>	110
<i>Tabela 24. Statystyka opisowa - woda rzeczywista IIA - TA100-S9 mix</i>	116
<i>Tabela 25. Statystyka opisowa- woda rzeczywista IIA - TA100+S9 mix</i>	116
<i>Tabela 26. Statystyka opisowa - woda rzeczywista IIA - TA98-S9 mix</i>	116
<i>Tabela 27. Statystyka opisowa - woda rzeczywista IIA - TA98+S9 mix</i>	116
<i>Tabela 28. Statystyka testowa - woda rzeczywista IIA - TA100 ±S9 mix</i>	118
<i>Tabela 29. Statystyka testowa - woda rzeczywista IIA - TA98 ±S9 mix</i>	118
<i>Tabela 30. Statystyka opisowa - woda rzeczywista IIB - TA100-S9 mix</i>	134
<i>Tabela 31. Statystyka opisowa - woda rzeczywista IIB - TA100 +S9 mix</i>	134
<i>Tabela 32. Statystyka opisowa - woda rzeczywista IIB - TA98-S9 mix</i>	135

Tabela 33. Statystyka opisowa – woda rzeczywista IIB - TA98+S9 mix	135
Tabela 34. Statystyka testowa – woda rzeczywista IIB - TA100 ±S9 mix	136
Tabela 35. Statystyka testowa – woda rzeczywista IIB - TA98 ±S9 mix	137
Tabela 36. Statystyka testowa wyników dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem.....	152
Tabela 37. Statystyka testowa wyników dla wody rzeczywistej po zastosowaniu jako utleniacza dwutlenku chloru	153
Tabela 38. Korelacja wyników dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem	154
Tabela 39. Korelacja wyników dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym dawkowaniu dwutlenku chloru.....	155
Tabela 40. Statystyka testowa wyników mutagenności M dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem	159
Tabela 41. Statystyka testowa wyników mutagenności M dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru	159
Tabela 42. Korelacja wyników pomiędzy mutagennością M wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem obserwowaną w teście Ames a przewidywaną modelami.....	160
Tabela 43. Korelacja wyników pomiędzy mutagennością M wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym zastosowaniu dwutlenku chloru obserwowaną w teście Ames a przewidywaną modelami	160

Spis zdjęć

Zdjęcie 1. Stacja zatężania i ekstrakcji badanych prób wody.....	54
--	----

Spis wykresów

Wykres 1. Woda modelowa – zawartość OWO i stężenie azotu amonowego	65
Wykres 2. MR wody wodociągowej filtrowanej na węglu aktywnym	66
Wykres 3. Dawka normalna chloru zastosowana do chlorowania wody modelowej.....	67
Wykres 4. AOX powstałe po dezynfekcji wody modelowej chlorem	68
Wykres 5 a i b. HAA powstałe po dezynfekcji wody modelowej chlorem.....	69
Wykres 6. Zależność dawka-odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem - OWO=2,0 mgC/dm ³ ...	74
Wykres 7. Zależność dawka-odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem - OWO=4,0 mgC/dm ³ ...	75
Wykres 8. Zależność dawka-odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem - OWO=6,0 mgC/dm ³ ...	76
Wykres 9 a ,b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla OWO = 2,0 mgC/dm ³	79
Wykres 10 a ,b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem OWO = 4,0 mgC/dm ³	80
Wykres 11 a, b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla OWO = 6,0 mgC/dm ³	81
Wykres 12. Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem.....	84
Wykres 13. Dawka normalna chloru zastosowana do dezynfekcji wody modelowej po wcześniejszym wprowadzeniu dwutlenku chloru	85
Wykres 14. AOX powstałe w wodzie modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed chlorowaniem	86
Wykres 15 a i b. HAA powstałe w chlorowanej wodzie modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru	87
Wykres 16. Zależność dawka- odpowiedź dla wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru dla OWO=2,0 mgC/dm ³	92
Wykres 17. Zależność dawka- odpowiedź dla wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru dla OWO=4,0 mgC/dm ³	93
Wykres 18. Zależność dawka- odpowiedź dla wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru dla OWO=6,0 mgC/dm ³	94
Wykres 19 a ,b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru dla OWO=2,0 mgC/dm ³	96
Wykres 20 a, b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru dla OWO = 4,0 mgC/dm ³	97
Wykres 21 a ,b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru dla OWO = 6,0 mgC/dm ³	98
Wykres 22. Obserwowana mutagenność M dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru.....	100
Wykres 23. Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem.....	102
Wykres 24. Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru ..	102
Wykres 25 a i b. Zawartość OWO i stężenie azotu amonowego w wodzie rzeczywistej	111
Wykres 26. Dawka normalna chloru zastosowana do chlorowania wody rzeczywistej.....	112
Wykres 27. AOX powstałe po dezynfekcji chlorem wody rzeczywistej	112
Wykres 28 a i b. HAA powstałe po dezynfekcji chlorem wody rzeczywistej.....	113
Wykres 29 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - październik	119
Wykres 30 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - grudzień ...	119

Wykres 31 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - styczeń.....	120
Wykres 32 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - luty	120
Wykres 33 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - marzec.....	121
Wykres 34 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - kwiecień ..	121
Wykres 35 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – maj.....	122
Wykres 36 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – czerwiec..	122
Wykres 37 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – lipiec	123
Wykres 38 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – sierpień...	123
Wykres 39. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – październik.....	125
Wykres 40. MR wody powierzchniowej rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – grudzień.....	125
Wykres 41. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – styczeń.....	125
Wykres 42. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – luty	126
Wykres 43. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – marzec	126
Wykres 44. MR wody powierzchniowej rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – kwiecień.....	127
Wykres 45. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – maj	127
Wykres 46. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – czerwiec.....	128
Wykres 47. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – lipiec.....	128
Wykres 48. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – sierpień.....	128
Wykres 49. Obserwowana mutagenność M wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem	130
Wykres 50. Dawka normalna chloru zastosowana do chlorowania wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru.....	131
Wykres 51. AOX powstałe w wodzie rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed chlorowaniem.....	132
Wykres 52 a i b. HAA powstałe w wodzie rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed chlorowaniem	133
Wykres 53. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru –październik	138
Wykres 54. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – grudzień	138
Wykres 55. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – styczeń	139
Wykres 56. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – luty	139
Wykres 57. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – marzec	140
Wykres 58. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – kwiecień	140
Wykres 59. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – maj.....	141
Wykres 60. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – czerwiec	141
Wykres 61. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – lipiec ...	142
Wykres 62. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru– sierpień	142
Wykres 63. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru –październik	144
Wykres 64. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru- grudzień ...	144
Wykres 65. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru– styczeń	145
Wykres 66. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru– luty.....	145
Wykres 67. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru– marzec	145
Wykres 68. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – kwiecień .	146
Wykres 69. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru– maj.....	146
Wykres 70. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – czerwiec ..	147
Wykres 71. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – lipiec	147
Wykres 72. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru– sierpień....	147
Wykres 73. Obserwowana mutagenność M chlorowanej wody rzeczywistej po wcześniejszym wprowadzeniu dwutlenku chloru.....	149
Wykres 74. Mutagenność M wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem	150
Wykres 75. Mutagenność M chlorowanej wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru	151

Spis skrótów

Abs	- absorbancja
AOX	- adsorbowane halogenowe związki organiczne
ChZO	- chlorowane związki organiczne
d	- dawka próbki, zateżenie, stężenie
DCAA	- kwas dichlorooctowy
DMSO	- dimetylo sulfotlenek
HAA	- kwasy chlorooctowe
IARC	- Międzynarodowa Organizacja Badań nad Rakiem
LOAEL	- najniższy poziom wywołujący działanie
MCL	- Najwyższy poziom zanieczyszczenia dopuszczalny w wodzie do picia
MCIAA	- kwas monochlorooctowy
MCLG	Maximum Contaminant Level Goal .
MR	- wskaźnik mutagenności
MRDL	Maximum Residual Disinfectant Level
MRDLG	Maximum Residual Disinfectant Level - max poziom środka dezynfekującego w wodzie do picia poniżej którego nie jest znane i oczekiwane ryzyko zdrowia
MX	- 3-chloro-4(dichlorometylo)-5-hydroksy-2(5H)furan
NOAEL	- poziom nie obserwowanego szkodliwego wpływu
NOEL	- poziom nie wywołujący działania
NVOX	- nietlne związki halogenoorganiczne
NZO	- naturalne związki organiczne
OWO	- ogólny węgiel organiczny
TCAA	- kwas trichlorooctowy
THM	- trihalometany
TOX	- całkowity chlor organiczny-miara całkowitej ilości związków halogenoorganicznych po chlorowaniu
UPD	- uboczne produkty dezynfekcji
USEPA	- Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych
VOX	- lotne związki haologenoorganiczne
WHO	(World Health Organisation) - Światowa Organizacja Zdrowia
WTB	- Wielkie Torfowisko Batorowe
WWA	- wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
ZOW	- Zakład Oczyszczania Wody

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich lat obserwuje się stałe zwiększenie zachorowalności na choroby nowotworowe. Obecnie wiadomo, że w procesach tych odgrywają rolę zmiany zachodzące w materiale genetycznym oraz to, iż wiele substancji rakotwórczych ma, w odpowiednich warunkach, zdolność indukowania tego typu zmian. Niektóre związki chemiczne mogą wywoływać niekorzystne zmiany w komórkach płciowych. Narażenie na ich działanie stwarza zatem poważne ryzyko genetyczne [1].

Dane epidemiologiczne, wskazują, że 70-90% wszystkich przypadków chorób nowotworowych jest uwarunkowana środowiskowo. Jest to związane głównie z wytwarzaniem przez współczesną gospodarkę światową ogromnych ilości organicznych związków chemicznych, charakteryzujących się często niekorzystnym oddziaływaniem na człowieka [2]. Dlatego też podejmowane są w skali międzynarodowej badania epidemiologiczne i doświadczalne w celu wykrycia czynników ryzyka chorób nowotworowych [3, 4, 5].

Woda jest jednym z najważniejszych elementów biosfery. Jak ogromne znaczenia ma dla ludzi, stanowi fakt, iż w organizmie człowieka znajduje się jej od ok. 60 do ok. 80%, w zależności od wieku [6]. Dlatego też woda jako element abiotyczny środowiska należy do czynników, poprzez które organizm człowieka jest narażony na działanie ksenobiotyków, substancji szkodliwych dla zdrowia zarówno pochodzenia naturalnego jak również czynników zakaźnych oraz inwazyjnych, wnoszonych do ustroju głównie drogą pokarmową [4, 7]. W badaniach ryzyka zdrowotnego przyjmuje się codzienne spożycie wody do picia dla średniej masy człowieka (70 kg) na poziomie 2 dm^3 , co jest równoznaczne z 10% jej udziałem w stosunku do pozostałych składników diety. Jednakże ryzyko zdrowotne związane z obecnością w wodzie do picia toksycznych związków chemicznych różni się od zagrożenia spowodowanego zanieczyszczeniem mikrobiologicznym, przede wszystkim czasem wywołania niepożądanych reakcji i skutkami zdrowotnymi. Szczególne zagrożenie stwarzają zanieczyszczenia wykazujące zdolności do kumulowania się jak metale ciężkie oraz substancje rakotwórcze [4, 8].

[...] Ujmowanie zanieczyszczonych wód do celów wodociągowych wymaga stosowania rozbudowanych technologii oczyszczania, włącznie z procesami utleniania, a stosowanie środków utleniających powoduje powstawanie ubocznych produktów utleniania, wpływających niekorzystnie na organizm człowieka i z tego powodu nieporządanych w wodzie przeznaczonej do spożycia [9-11].

Dezynfekcja wody powierzchniowej, zawierającej naturalne i antropogeniczne związki organiczne, utleniaczami chemicznymi, generuje powstawanie licznych, nie do końca poznanych ubocznych produktów, które cechuje aktywność biologiczna, w tym rakotwórcza. Największa ich ilość powstaje w wyniku chlorowania [10, 12, 13].

Badania epidemiologiczne sugerują wzrost ryzyka zachorowania na raka związany z pićm wody, w tych rejonach geograficznych, w których na cele wodociągowe ujmowana jest woda powierzchniowa dezynfekowana chlorem [14]. Badania prowadzone w Finlandii od połowy lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku, dowiodły związku pomiędzy aktywnością mutagenną chlorowanej wody do picia a przypadkami zachorowań ludzi na pewne odmiany nowotworów (nerek i pęcherza moczowego) [15, 16]. Związek między spożyciem wody zawierającej te substancje a szkodliwym działaniem na zdrowie człowieka został uznany przez IARC za wystarczająco wykazany [17].

Wydaje się, że choć podstawowym kryterium oceny jakości elementów środowiska są rodzaje i stężenia substancji toksycznych i mutagennych, jednakże dopiero monitoring toksykologiczny, poparty monitoringiem biologicznym zanieczyszczeń wszystkich elementów środowiska, pozwala na rzeczywistą ocenę narażenia i zagrożenia populacji ludzkiej [2, 4, 18, 19].

Trudności w identyfikacji substancji znajdujących się w wodzie, a w szczególności chloropochodnych związków organicznych potencjalnie mutagennych, spowodowało przyjęcie nowych zasad dotyczących rutynowego monitoringu związków rakotwórczych i/lub teratogennych w wodzie do picia. W badaniach tych kluczową pozycję zajmują bakteryjne testy krótkoterminowe *in vitro*. Testem bakteryjnym o najszerszym zastosowaniu, odznaczającym się znaczną czułością jest test *Salmonella*, proponowany w Standard Methods for Examination of Water and Wastewater US EPA do oceny jakości zdrowotnej wody do picia [20].

Na świecie prowadzone są liczne badania mające na celu wykazanie mutagenności wody do picia oraz wielu substancji stanowiących jej zanieczyszczenie. Stosowane są różnorodne techniki przy ekstrakcji i zateżaniu zanieczyszczeń oraz szeroka gama testów bioindykacyjnych. Nadal poszukuje się coraz dokładniejszych i doskonalszych modeli badawczych. Jednakże już na poziomie obecnej wiedzy w dziedzinie biomonitoringu i co bardzo istotne świadomości społecznej o zagrożeniach środowiskowych chorobami nowotworowymi należy podjąć próbę unifikacji oceny narażenia na czynniki mutagenne związanego z pićm wody. Podstawowym celem powinno być podanie propozycji możliwie szybkiej i nie wymagającej wysublimowanych i zbyt pracochłonnych technik metody oceny jakości zdrowotnej wody do picia do zastosowania w rutynowej kontroli.

Stosowanie monitoringu genotoksyczności wody do picia, testem Ames, wymaga przeszkolonego personelu oraz zapewnienia odpowiednich warunków do jego wykonania, co związane jest ze znacznymi kosztami a za pomocą znanych metod analitycznych nie można oznaczyć nawet części znajdujących się w wodzie mikrozanieczyszczeń. Dlatego też uzasadniona byłaby możliwość zastosowania, po uprzednim dostosowaniu do warunków polskich, modelu prognozowania mutagenności wody do picia, dzięki któremu w oparciu o podstawowe parametry chemiczne wody takie jak: OWO, azot amonowy i dawka chloru można szybko określić potencjalnie mutageny charakter uzdatnionej wody. Przeprowadzone w Finlandii badania stały się podstawą do opracowania tego modelu, a stworzony przez Vartiainen model [21] potwierdzony został mutagennością wody określoną za pomocą testu Ames, przy użyciu szczepu *Salmonella typhimurium* TA100, bez aktywacji metabolicznej [21, 22].

I CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Wody powierzchniowe jako surowiec do procesów uzdatniania

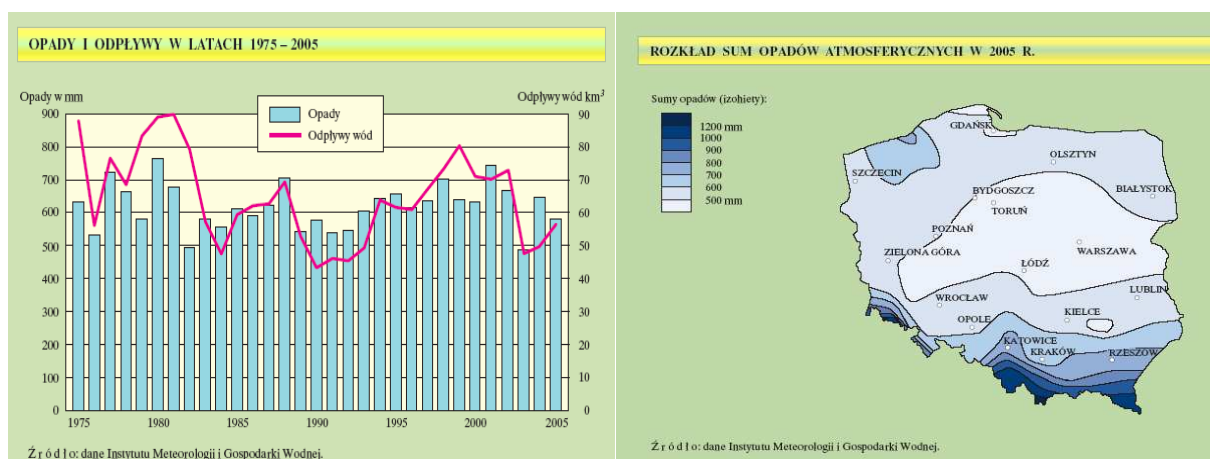
Cała woda uzdatniana przez przedsiębiorstwa komunalne pochodzi z dwóch głównych źródeł:

- woda powierzchniowa – z jezior, rzek i zbiorników wodnych,
- woda podziemna – z formacji wodonośnych, które są naturalnymi zbiornikami wody.

Na cele wodociągowe ujmowana jest również woda infiltracyjna, która jest mieszaniną wody powierzchniowej oczyszczonej w gruncie i wody podziemnej [23].

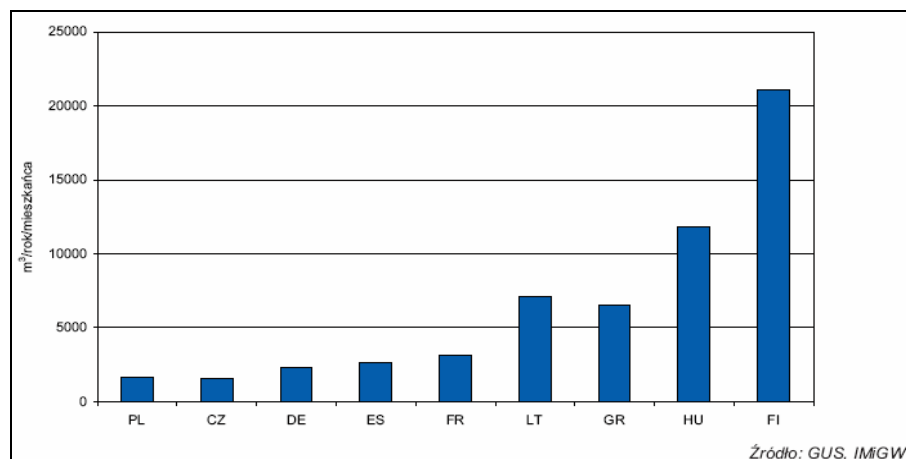
1.1. Zasoby wodne na terenie Polski

W porównaniu z innymi krajami europejskimi - Polska jest krajem o małych zasobach wody i dużych wahaniami jej rocznego odpływu [24].



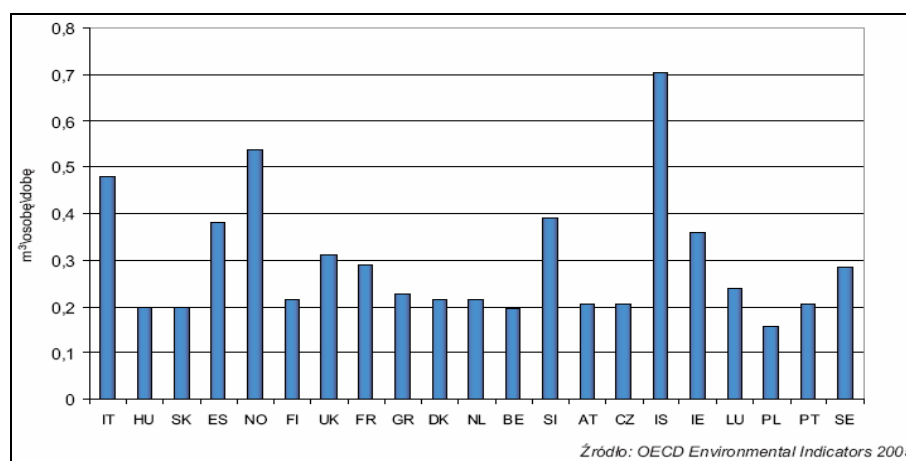
Rysunek 1 i 1a. Opady i odpływy wód na terenie Polski oraz rozkład sum opadów atmosferycznych [24]

W roku, średnia suma opadów, na terenie Polski, wynosi około 600 mm i waha się od 500-550 mm w pasie nizin do około 1200 w rejonach górskich i podgórszych. Natomiast stan zasobów wodnych określony jako średni odpływ roczny (po odjęciu ilości wody spożytkowanej na roślinność i parowanie oraz uwzględnieniu dopływów z zagranicy) wynosi około 62 km³ (średnia dla lat 1951–2000) i waha się w granicach 37,5 – 90 km³ (Rys. 1 i 1a). Ilość zasobów wodnych przypadająca na jednego mieszkańca, czyli wskaźnik dostępności wody dla ludności i gospodarki wodnej, wynosi w Polsce około 1 600 m³ wody na rok, co stanowi zaledwie około 36% średniej europejskiej (Rys. 2). Efektem tak niskiego stanu zasobów wodnych jest występowanie w części obszaru Polski okresowych lub trwałych trudności w zaopatrzeniu w wodę [24].



Rysunek 2. Zasoby wody do picia w przeliczeniu na mieszkańca [25]

Z ogólnej sumy zasobów wodnych ponad 70% stanowią zasoby wód powierzchniowych, natomiast niecałe 30% to wody podziemne, dlatego też podstawowym źródłem zaopatrzenia w wodę na cele gospodarki narodowej są wody powierzchniowe. Polska należy do krajów o najniższym w Europie zużyciu wody (pod względem ilości pobieranej w przeliczeniu na mieszkańca) - Rys.3. [25, 26].

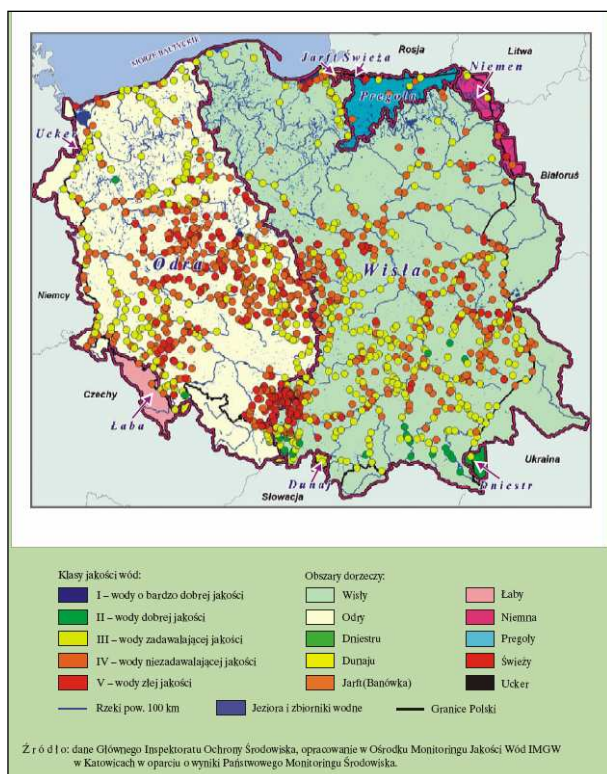


Rysunek 3. Dobowy pobór wody na potrzeby ludności na osobę [25]

[...] Podstawowym problemem w zakresie zaopatrzenia w wodę ludności jest mała dostępność wody o dobrej jakości. Ponadto perspektywicznym zagrożeniem mogą stać się zjawiska o charakterze globalnym, związane z przewidywanym wpływem zmian klimatu na zasoby wód, ich rozmiary i rozkład w czasie [25].

1.2. Jakość wód powierzchniowych

Do roku 2004 podstawę prawną do oceny jakości wód w rzekach stanowiło Rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa z dnia 5 listopada 1991 r. w sprawie klasyfikacji wód oraz warunków, jakim powinny odpowiadać ścieki wprowadzane do wód lub do ziemi (Dz.U. 1991 Nr 116 poz. 503) [27]. Na tej podstawie wyróżniano trzy klasy czystości wód (I, II, III) i wody pozaklasowe (NON). Według Rozporządzenia Ministra Ochrony Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu



wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód (Dz.U. 2004 Nr 32, poz. 284) [28] nowa klasyfikacja wód obejmuje pięć klas czystości - I, II, III, IV oraz V. Od tego roku raporty WIOŚ, za zgodą Głównego Inspektora Ochrony Środowiska, są opracowywane w oparciu o tę klasyfikację choć Rozporządzenie to zostało uchylone z dniem 1 stycznia 2005 roku, uaktualnieniem Prawa Wodnego i nadal trwają prace nad przystosowaniem polskiego prawa do przepisów unijnych [23].

Rysunek 4. Klasyfikacja jakości wód w rzekach Polski

W 2006 roku na terenie Polski klasyfikacji jakości wód powierzchniowych dokonano w 1544 punktach pomiarowo-kontrolnych. Klasyfikacje jakości wód w rzekach w przekrojach monitoringu diagnostycznego w roku 2005 [24] przedstawiono na Rys. 4. Wyniki klasyfikacji jakości wód w monitoringu diagnostycznym według Regionalnych Zarządów Gospodarki Wodnej w 2006 r., na podstawie Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód (Dz.U.Nr 32, poz.284) przedstawiono w Tabeli 1. A jakość wód na terenie Polski przedstawiała się następująco:

– brak wód bardzo dobrej jakości (I klasa),

- wody dobrej jakości (II klasa) wystąpiły w 34 punktach pomiarowo-kontrolnych,
- wody zadowalającej jakości (III klasa) stwierdzono w 548 punktach,
- wody niezadowalającej jakości (IV klasa) wystąpiły w 662 punktach,
- wody złej jakości (V klasa) odnotowano w 300 punktach pomiarowo-kontrolnych.

Tabela 1. Klasyfikacja jakości wód w monitoringu diagnostycznym, Ochrona Środowiska 2007

Regionalne Zarządy Gospodarki Wodnej	ogółem	Ilość punktów pomiaru jakości wód				
		W tym w klasach jakości wody				
		I	II	III	IV	V
Polska	1 544	-	34	548	662	300
Gdańsk	105	-	6	43	45	11
Gliwice	101	-	3	34	32	32
Kraków	227	-	19	119	61	28
Poznań	335	-	2	93	148	92
Szczecin	60	-	1	45	12	2
Warszawa	523	-	3	145	289	86
Wrocław	193	-	-	69	75	49

1.3. Skład chemiczny i mikrobiologiczny wód powierzchniowych i ich wpływ na zdrowie człowieka

W przyrodzie nie występuje woda chemicznie czysta, a jedynie mieszanina wody wraz z obecnymi w niej domieszkami (substancjami trafiającymi do wód jako efekt działania uwarunkowań naturalnych) oraz zanieczyszczeniami organicznymi i nieorganicznymi [23].

W wodach powierzchniowych zidentyfikowano 2211 związków organicznych, z tego 765 w wodach do picia, co stanowi około 20% ogólnej liczby związków organicznych występujących w wodach, głównie związków sztucznie syntetyzowanych [29]. Naturalne związki organiczne (NZO) w wodach stanowią pozostałości przemian chemicznych i biologicznych związków zawartych w biomase organismów wodnych oraz ich metabolitów. Są to przede wszystkim substancje humusowe oraz białka, węglowodany, oleje, woski, celuloza, skrobia, barwniki roślinne oraz związki syntetyzowane w czasie rozwoju organismów wodnych i magazynowane w komórkach lub wydzielone przyżyciowo i wiele innych. Proporcje pomiędzy składnikami NZO w wodach zależą od rodzaju gleby w zlewni, biocenozy wodnej, warunków klimatycznych, rodzaju gospodarki na terenie zlewni, charakteru wody, tj. rzecznej, infiltracyjnej, podziemnej, zbiorników wodnych [30, 31].

Poza naturalnymi związkami organicznymi w wodach stwierdza się obecność związków organicznych pochodzenia antropogenicznego. Rodzaj substancji organicznych obcych zależy od źródła zanieczyszczenia wody powierzchniowej, i tak:

- wraz z opadami atmosferycznymi transportowane są: WWA, PCB, ChZO,

- spływy powierzchniowe z terenów upraw rolnych wnoszą pestycydy,
- z dróg i terenów zurbanizowanych pochodzą węglowodory aromatyczne i alifatyczne, produkty przeróbki ropy naftowej i inne,
- ze ściekami bytowo-gospodarczymi trafiają do wód m.in.: SPC, fenole, alkohole, ChZO,
- ze ściekami przemysłowymi w zależności od rodzaju surowców i wytwarzanych produktów oraz stosowanych technologii – rozmaite substancje organiczne [23].

Duża grupa związków chemicznych znajdujących się w wodzie powierzchniowej stanowi zanieczyszczenia szczególnie uciążliwe dla środowiska (persistent organic pollutants- POPs). Są to związki organiczne odporne na biodegradację, a zatem powodujące jego długotrwałe skażenie o negatywnych skutkach. Do grupy tej należą: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), chlorowane pestycydy (CL-PEST), polichlorowane bifenyle (PCB), dibenzofurany (PCDFs) i dibenzo-p-dioksyny (PCDDs). Szczególne znaczenia nabiera to w aspekcie jakości wody jako środowiska życia organizmów oraz jako źródła wody do picia [4, 32]. Niebezpieczeństwo pochodzące od niektórych związków chemicznych zawartych w wodzie do picia jest związane z długim spożywaniem zanieczyszczonej wody [11]. Tylko nieduża grupa składników chemicznych wody, wywołuje ostre objawy chorobowe poza przypadkowym, wyjątkowo dużym skażeniem chemicznym, kiedy i tak nie nadaje się taka woda do konsumpcji z uwagi na cechy organoleptyczne takie jak: smak, zapach czy wygląd [8].

Dodatkowo znajdujące się w wodzie powierzchniowej związki organiczne pochodzenia naturalnego i antropogenicznego, w procesie dezynfekcji wody tworzą tzw. produkty uboczne (UPD), które stanowią jeden z czynników odpowiedzialnych za choroby nowotworowe u ludzi (gł. nowotwory nerek i pęcherza moczowego) [8, 21, 33].

W Tabeli 2 przedstawiono zidentyfikowane w wodzie do picia związki chemiczne (wraz z ich klasyfikacją zgodną ze wzrostem ich właściwości toksykologicznych).

Tabela 2. Klasy zanieczyszczeń identyfikowanych w wodzie do picia [4, 30, 34]

Rodzaje toksycznych zanieczyszczeń wody			
A-Węglowodory 1A-Nasycone/ nienasycone alifatyczne 2A-Alicykliczne 3A-Aromatyczne 4A-Wielopierścieniowe aromatyczne	B- Halogenowe związki 1B- alifatyczne 2B- aromatyczne 3B- etery 4B-Różnorodne halogenowe	C-Karboksyłowe kwasy i estry 1C-Kwasy 2C-Estry kwasów karboksylowych	D-Związki utlenione 1D-Ketony 2D-Aldehydy 3D-Etery 4D-Różnorodne związki utlenione

W skład wody wchodzi oprócz czynników abiotycznych również czynniki biotyczne, do których należą:

- formy bezkomórkowe – wirusy i priony;

- organizmy autotroficzne:
 - fotoautotrofy – bakterie i sinice, glony i rośliny naczyniowe,
 - chemoautotrofy – bakterie;
- organizmy heterotroficzne:
 - saprofity – bakterie, grzyby, zwierzęta,
 - pasożyty - bakterie, grzyby, pierwotniaki, robaki płaskie i obleńce.

Czynniki biotyczne tj. organizmy występujące w zbiornikach naturalnych czy sztucznych stanowiących źródło zaopatrzenia są jednym z czynników wpływających na jakości wód oraz powodujących zaburzenia w ich uzdatnianiu i przesyłaniu. Wpływają one na wiele cech jakości wody w tym m. in. na: zapach, barwę, odczyn, zawartość materii organicznej i obecność toksycznych związków organicznych, zawiesin, zawartości rozpuszczonego tlenu i dwutlenku węgla. Woda do picia zawierająca organizmy patogenne może być główną przyczyną rozprzestrzeniania chorób zakaźnych, których źródłem w pierwszej kolejności są wydaliny i wydzieliny ludzkie i zwierzęce, głównie kał [8, 23, 33].

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) oszacowała, że 20 % światowej populacji ludzi nie ma dostępu do bezpiecznej mikrobiologicznie wody do picia [35-43]. Choroby zakaźne wywoływane przez wirusy, bakterie chorobotwórcze, pierwotniaki i pasożyty są najbardziej powszechnym zagrożeniem zdrowia związanym ze spożywaniem wody do picia [8, 33, 44] i są one głównym źródłem zakażenia mikroorganizmami chorobotwórczymi w regionach rozwijających się [45]. Według L'aszl'ó Sujbert i in. spożywanie wody do picia wpływa na zdrowie 1,2 biliona ludzi na całym świecie i każdego roku przyczynia się do śmierci 15 milionów dzieci poniżej 5 roku życia [46]. Natomiast Asbolth N.J. uważa, iż zła jakość wody, warunków sanitarnych i higieny jest odpowiedzialna za zgon 17 milionów ludzi na świecie rocznie, głównie przez zakaźne biegunki (dziewięć na dziesięć przypadków dotyczy dzieci i wszystkie te przypadki występują w regionach rozwijających się). Odpowiedzialne za ten stan rzeczy są patogeny jelitowe takie jak: rotawirusy, *Campylobacter jejuni*, enterotoksyczne *Escherichia coli*, *Shigella sp.*, *Vibrio cholerae* O1 i prawdopodobnie enteropatogenne *E. coli*, *Aeromonas sp.*, *V. cholerae* O139, enterotoksyczne *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile* oraz *Cryptosporidium parvum*. Wszystkie, wymienione organizmy z wyjątkiem ostatniego są łatwo niszczone poprzez chlorowanie w procesie uzdatniania wody [45]. Wirusy i bakterie chorobotwórcze ze względu na długą przeżywalność mogą przedostawać się od źródeł zakażenia do ujęć wody do picia. Głównie może do tego dojść w okresie jesienno-wiosennym, gdy dominują niskie temperatury i występuje mała liczba bakterii saprofitycznych (naturalnych przeciwników bakterii chorobotwórczych). Dezynfekcja wody do picia jest procesem

stosowanym m.in. w celu zapobiegania przed infekcjami. Niestety w wodzie powierzchniowej znajdują się organizmy nadzwyczaj odporne na standardowe dawki środków dezynfekujących (cysty *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* oraz prątki *Mycobacterium sp.* i in.) stąd wymagają stosowania dużo wyższych dawek [47], co z kolei prowadzi do wzrostu stężeń ubocznych produktów dezynfekcji [46].

[...] Od lat 80. ubiegłego wieku na świecie potwierdzono wiele wodnopochoдных epidemii wywołanych przez pasożytniczego pierwotniaka *Cryptosporidium*, głównie związanych z wodą do picia lub korzystaniem ze zbiorników rekreacyjnych i basenów pływackich [48]. Ostatnie wielkie epidemie w Europie, przenoszone drogą wodną, odnotowano w XX w., w latach 1854-1989 wystąpiło ich aż 70, z czego 39 było epidemiami tyfusu [49] [...]. Obecnie w wyniku zakażenia wody częściej niż epidemie występują zachorowania typu zakażeń żołądkowo-jelitowych [50].

Ponadto [...] istnieje duża liczba doniesień o niekorzystnym wpływie na zdrowie toksyn wytwarzanych przez glony zawarte w wodzie do picia. Doniesienia te obejmują epidemiologiczne badania łagodnych, odwracalnych uszkodzeń wątroby u pacjentów szpitalnych otrzymujących wodę do picia ze zbiornika, w którym wystąpił bardzo intensywny zakwit toksycznych sinic *Microcystic aeruginosa* [4, 8].

2. Uzdatnianie wód powierzchniowych - dezynfekcja

Rodzaj i postać w jakiej występują wody powierzchniowe ma wpływ nie tylko na szereg cech fizycznych, chemicznych czy też biologicznych, ale również na dobór metod uzdatniania [23].

Oczyszczanie wody powinno eliminować z niej zawiesiny, mętność i związki, które wykazują zapotrzebowanie na utleniacze oraz wchodzi z nimi w reakcje, powodując powstawanie ubocznych produktów dezynfekcji, a układ oczyszczania wody powinien być skonstruowany tak, aby woda na końcu procesu oczyszczania nie zawierała ponadnormatywnych ilości bakterii oraz pozbawiona była patogenów i spełniała wszystkie wymagania przepisów sanitarnych [50]. Jednym z głównych problemów w technologii oczyszczania wód przeznaczonych do picia i na potrzeby gospodarcze jest usuwanie związków organicznych (zarówno naturalnych, jak również pochodzenia antropogenicznego). W wodzie po układzie oczyszczania: koagulacja, filtracja, ozonowanie, sorpcja na węglu aktywnym według Kowal [50] usuwanych jest 99,0÷99,9 % wirusów, bakterii, glonów oraz pasożytów, a woda taka wymaga

jedynie profilaktycznej dezynfekcji – jednak wszystko zależy od właściwej eksploatacji układu oczyszczania wody.

Zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia [8, 33] nadrzędnym celem uzdatniania wody jest otrzymanie czystości mikrobiologicznej wody nie zagrażającej zdrowiu czy życiu konsumentów i jest to związane z eliminacją ryzyka wybuchu epidemii chorób przewodu pokarmowego, jak również i innych chorób zakaźnych. Natomiast czystość chemiczna wody jest czynnikiem drugorzędym, dlatego, że na ogół zanieczyszczenia chemiczne nie powodują tak nagłych i rozległych skutków jak w przypadku zanieczyszczeń mikrobiologicznych [8].

Celem dezynfekcji wody do picia jest zniszczenie żywych i przetrwalnikowych form mikroorganizmów patogennych oraz zapobieganie ich wtórnemu rozwojowi w sieci wodociągowej [23, 51]. [...] Dezynfekcja wody wodociągowej metodami chemicznymi polega na dawkowaniu do niej silnych utleniaczy, takich jak: chlor, podchloryn sodu, dwutlenek chloru, chloraminy, ozon, brom i jod [52]. Ponieważ środki te charakteryzują się równocześnie silnymi właściwościami dezynfekcyjnymi jak również i utleniającymi, dlatego też podczas dezynfekcji wód zawierających związki organiczne i nieorganiczne równoległe przebiegają procesy niszczenia mikroorganizmów, w tym patogennych, jak również przemiany związków organicznych i nieorganicznych. W większości przypadków produkty utleniania związków nieorganicznych znajdujących się w wodzie z reguły nie pogarszają jakości zdrowotnej wody. Inaczej jest ze związkami organicznymi, które wchodząc w reakcje ze środkami dezynfekcyjnymi powodują powstawanie UPD, które wykazują właściwości toksyczne, mutagenne i teratogenne przez co stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia a nawet życia człowieka [52, 53]. Według Kowal [50] po bardzo skutecznym oczyszczaniu woda nie powinna zawierać związków reagujących z chlorem lub innymi utleniaczami. Wówczas najlepszym środkiem do dezynfekcji są chlor bądź chloramina, natomiast dwutlenek chloru stosowany jest, gdy z wody nie udało się usunąć prekursorów UPD. W praktyce w oczyszczaniu wody stosuje się chlor i jego związki oraz ozon, jednak w celu zmniejszenia ilości UPD, zamiast wody chlorowej stosuje się dwutlenek chloru, lub chloraminy powstające w chlorowanej wodzie zawierającej azot amonowy [13, 52].

Skład fizyko-chemiczny wody głównie: pH, temperatura, ilość zawieszin, związków zredukowanych (takich jak: Fe^{2+} , Mn^{2+} , S^{2-} , NO^{2-} , NH_4^+) oraz ilość i rodzaj zredukowanych substancji organicznych, jak również ilość mikroorganizmów decydują o rodzaju i wymaganej dawce dezynfektanta jak i o powstających ubocznych produktach dezynfekcji. Ilość reakcji ubocznych na ogół rośnie ze wzrostem zanieczyszczenia uzdatnianej wody [9].

Przy doborze dawki dezynfektanta brane są pod uwagę następujące kryteria:

- zapewnienie skutecznej dezynfekcji wody, a więc zniszczenie żywych i przetrwalnikowych form mikroorganizmów,
- zapewnienie odpowiedniego stężenia pozostałego dezynfektanta w celu zabezpieczenia sieci wodociągowej,
- minimalizacja ilości powstających, szkodliwych dla zdrowia konsumenta, ubocznych produktów dezynfekcji,
- dostarczenie odbiorcom wody o odpowiednich właściwościach organoleptycznych.

Ze względu na dwa pierwsze warunki dawka dezynfektanta powinna być odpowiednio duża, spełnienie dwóch pozostałych wymaga jednak minimalizacji ilości dodawanego do wody czynnika chemicznego.

Dla zapewnienia właściwej dezynfekcji wody US EPA wprowadziła współczynnik CT będący iloczynem stężenia pozostałego środka dezynfekującego (mg/dm^3) i czasu kontaktu (min) zapewniającego usunięcie 99,9 % cyst *Giardia sp.* i 99,99 % wirusów. Wartość współczynnika CT zależy od temperatury i pH wody oraz stosowanych procesów jej uzdatniania. W temperaturze 10^0 C i $\text{pH} = 7$ wynosi on dla poszczególnych dezynfektantów: $1,43 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{dm}^3$ dla ozonu, $23 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{dm}^3$ dla ClO_2 , $124 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{dm}^3$ dla Cl_2 , $1850 \text{ mg}\cdot\text{min}/\text{dm}^3$ dla chloramin. Spełnienie warunków otrzymania wymaganej wartości CT zapewnia właściwą dezynfekcję i równocześnie decyduje o ilości powstających halogenowych pochodnych związków organicznych [4].

2.1. Chlor – krótka charakterystyka z uwzględnieniem tworzenia UPD

Chlor jest historycznie pierwszym (choć dopiero w XX w. wprowadzonym) utleniaczem zastosowanym do dezynfekcji wody do picia. Jego zastosowanie obniżyło liczbę zachorowań na choroby przenoszące się wraz ze skażoną wodą, jak np.: tyfus, cholera czy czerwonka [54]. Popularność chloru jako środka dezynfekującego związana jest z dużą zdolnością bakteriobójczą, relatywnie niską ceną i możliwością przygotowania go w miejscu wykorzystania. Z tych też względów dezynfekcja wody do picia chlorem jest szeroko praktykowana na całym świecie [55-57]. Jakkolwiek wiele produktów ubocznych tego procesu szczególnie jeśli o produkty reakcji pomiędzy chlorem a naturalnie występującą w wodzie materią organiczną stanowi poważne ryzyko zdrowotne [57, 58]. Podstawowym problemem jest tworzenie się trihalometanów tzw. THM jak również innych chlorowcopochodnych organicznych (jak

choćby kwasy halogenoocetowe i wiele innych), co jest związane głównie z obecnością w wodzie związków humusowych i fulwowych oraz mikroflory [58, 59].

Jak wykazały badania przeprowadzone przez Woodruff i in. UPCh są mutagenne dla komórek ludzkich [57]. Chlorowanie prowadzi do podwyższenia aktywności mutagennej wody, co zostało wykazane m. in. przy zastosowaniu testu Ames [60], stąd współczesne technologie odchodzą od stosowania tego środka dezynfekującego [54, 58].

W technologii oczyszczania wody i ścieków chlor stosowany jest głównie pod postacią wody chlorowej. Wprowadzony do wody występuje w niej, zależnie od pH, jako rozpuszczony gaz Cl_2 , kwas podchlorawy HClO oraz jon podchlorynowy ClO^- [54]. Istotnym problemem jest efektywność chlorowania przy podwyższonym pH wody. Kwas podchlorawy oraz chlor mają wysoką zdolność do utleniania i dezynfekcji, natomiast jon podchlorynowy ma 10÷20 – krotnie mniejszy od nich potencjał utleniający, czyli jest prawie nieskuteczny. Wartość potencjału redox, który ma bezpośredni związek z kinetyką dezaktywacji przetrwalników, podczas chlorowania przy podwyższonym pH gwałtownie spada. Powszechnie znanym problemem jest zanik aktywnego chloru w sieciach wodociągowych, co grozi wtórnym skażeniem mikrobiologicznym wody wodociągowej [58].

Celem chlorowania dezynfekcyjnego jest takie przeprowadzenie procesu, aby dezynfektant pozostawał w wodzie, chroniąc ją przed zakażeniem w sieci dystrybucyjnej. Ze względu jednak na swą reaktywność chlor wchodzi również w reakcje ze składnikami wody np.: przereagowuje z nieorganicznymi reduktorami (Fe^{2+} , Mn^{2+} , S^{2-} , NO_2^-) oraz z substancjami organicznymi tworząc UPCh. Jeżeli w wodzie znajdują się bromki część chloru utlenia je do HBrO , który może dalej reagować z materią organiczną, dając w efekcie produkty bromo- i chlorobromoorganiczne, czyli bromopochodne UPCh, takie jak kwasy halogenoocetowe i halogenoacetonitryle oraz bromowe trihalonitrometany [52, 54, 61]. Chlor reaguje także z fenolem, który w wodzie powierzchniowej może występować jako zanieczyszczenie naturalne lub przemysłowe, a w wyniku tej reakcji tworzą się chlorofenole [58]. Dopiero pozostała część chloru ma istotne znaczenie dezynfekcyjne [54]. [...] Ponadto podczas chlorowania wody następuje szybka reakcja chloru z obecnymi w wodzie jonami amonowymi oraz grupami aminowymi. Tworzenie się chloramin można wykorzystać jako środek dezynfekcyjny o dużej trwałości, przez co dłużej są aktywne w sieci wodociągowej zabezpieczając wodę przed jej wtórnym skażeniem [30]. Według Mielczarek [58] w tym przypadku nawet duża dawka chloru, wobec jego szybkiego zużycia i tworzenia się związków chlorowcopochodnych, może nie gwarantować osiągnięcia wymaganej pozostałej zawartości wolnego chloru.

Reakcje z pestycydami powodują 10 % ubytek chloru aktywnego i powstaje duża ilość związków chloroorganicznych [62].

Chlor reaguje również z azotem organicznym. W reakcji powstają chloraminy organiczne [54] zwane także związkami chloroazotowymi [30]. Związki chloroazotowe są niebezpieczne dla zdrowia z uwagi na ich właściwości mutagenne, a ponadto działają drażniąco na oczy, nos i błony śluzowe oraz nadają wodzie silny drażniący zapach. W wodzie do picia zawartość chloramin jest limitowana [30]. Przy dużym nadmiarze chloru w stosunku do azotu amonowego zachodzi reakcja całkowitego utlenienia N^{3-} do azotu cząsteczkowego [54]. Poprzez chlorowanie można, więc całkowicie wyeliminować azot amonowy z wody (95-98 %). Wówczas konieczne jest zastosowanie dużych dawek chloru, co prowadzi zwykle do generowania dużych ilości produktów ubocznych, niepożądanych w wodzie przeznaczonej do celów konsumpcyjnych.

[...]Podczas reakcji chloru ze związkami organicznymi chlor może być przyłączony do cząsteczki związku organicznego, a także może działać utleniająco. Dlatego też w czasie chlorowania powstają liczne uboczne produkty dezynfekcji, do których należą [52]:

- Trihalometany (THM) - najlepiej poznana dotychczas grupa UPCh, ich prekursorami są głównie kwasy humusowe, chlorofil „a”, metabolity organizmów wodnych, alifatyczne hydroksykwasy, kwasy mono-, di- i trikarboksylowe oraz aromatyczne kwasy karboksylowe [63]. Trihalometany zawierają głównie chloroform ($CHCl_3$) - 83,7 %, bromodichlorometan ($CHCl_2Br$) - 15,4 %, dibromochlorometan ($CHClBr_2$) - 0,9 %, natomiast tribromometan ($CHBr_3$) albo w ogóle nie występuje albo występuje w ilościach zbliżonych do granicy wykrywalności ($\gg 1,0$ %) [52, 64].
- Kwasy halogenooctowe (*haloacetic acid* - HAA) to druga istotna grupa związków powstających podczas chlorowania wody do picia i są to głównie kwasy chlorooctowe takie jak kwas: chlorooctowy MCAA ($CH_2ClCOOH$), bromooctowy MBAA ($CH_2BrCOOH$), dichlorooctowy DCAA ($CHCl_2COOH$), trichlorooctowy TCAA (CCl_3COOH), dibromooctowy DBAA ($CHBr_2COOH$), jak również kwas tribromooctowy TBAA (CBr_3COOH), bromochlorooctowy BCAA ($CHBrClCOOH$), dibromochlorooctowy DBCAA ($CBr_2ClCOOH$), dichlorobromooctowy DCBAA ($CCl_2BrCOOH$). Prekursorami HAA są głównie substancje humusowe [52, 64, 65].
- Chlorofenole, halogenoketony, halogenonitryle, trichlorobenzeny, hydroksyfurany [52],
- MX, czyli 3-chloro-4(dichlorometylo)-5-hydroksy-2(5H)-furanon.

Według Zbieć i Dojlido [52] podczas chlorowania powstają olbrzymie ilości halogenowych związków organicznych (sumarycznie ich stężenie określane jest jako AOX, czyli adsorbowane halogenowe związki organiczne) i są to:

- o LAOX (lotne AOX) – dichlorometan, chloroform, dichlorobromometan, dibromochlorometan, bromoform, tetrachlorometan i in.
- o NAOX (nielotne AOX) – halo ketony, haloacetonitryle, halopochodne kwasów karboksylowych (najczęściej kwasu octowego – HAA), haloaldehydy, ftalany, aminy i wiele związków aromatycznych.

Również uboczne produkty chlorowania podzielić można na dwie grupy:

- nielotne związki halogenoorganiczne (NVOX) – ilość ich stanowi około 70-80 % TOX,
- lotne związki halogenoorganiczne (VOX) – ilość ich stanowi zwykle tylko 20-30 % TOX (tzw. całkowity/ogólny chlor organiczny; jest miarą całkowitej ilości związków halogenoorganicznych po chlorowaniu) [54].

2.2. Dwutlenek chloru – krótka charakterystyka z uwzględnieniem tworzenia UPD

Alternatywą chloru – do wstępnego utleniania oraz do dezynfekcji wody - jest dwutlenek chloru, odkryty w roku 1811. Po raz pierwszy użyty został na skalę techniczną do uzdatniania wody w Stanach Zjednoczonych dopiero w 1944 r., w Europie zaś w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku. Obecnie jest stosowany w tysiącach stacji wodociągowych, głównie w Europie, Stanach Zjednoczonych i Kanadzie [66, 67].

Dwutlenek chloru jest szeroko stosowanym jako dezynfektant wody do picia, ponieważ ma wiele zalet, do których można zaliczyć słabą reaktywność w stosunku do materii organicznej obecnej w wodzie, bez tendencji do tworzenia chlorowcopochodnych, w tym THM-ów [13, 52, 53, 58, 66, 68- 72]. A według Mielczarek [58] nie generuje ich wcale.

Jak pisze Mossakowska [69] dwutlenek chloru reaguje z potencjalnymi prekursorami THM-ów powodując ich dezaktywację. Począwszy od 20 % udziału ClO_2 stwierdzono obniżenie stężenia THM-ów o 50-100 %. Jednakże stosowany w wodociągach techniczny ClO_2 zawsze zawiera pewne ilości wolnego chloru, stąd w wodzie powstają pewne ilości związków halogenoorganicznych [73]. Natomiast badania laboratoryjne opisane przez Jun Wen Li i in. [74] wykazały, iż w wodzie zawierającej kwasy humusowe i bromki po dezynfekcji ClO_2 powstawały THM, w tym głównie bromoform. W reakcjach dwutlenku chloru z substancjami organicznymi przeważają reakcje utleniania, które w niektórych przypadkach kończą się przyłączeniem chloru. ClO_2 reaguje głównie z wysokomolekularnymi cząsteczkami naturalnej materii organicznej,

takiej jak kwasy fulwowe i humusowe, które są skutecznie usuwane podczas filtracji na węglu aktywnym [75, 76]. Stężenie związków karbonylowych może znacząco wzrastać z czasem reakcji ClO₂ z prekursorami karbonylowymi w oczyszczonej wodzie [53].

Dwutlenek chloru generuje tworzenie się ubocznych produktów dezynfekcji, głównie nieorganicznych: chlorynów i chloranów [53, 70-72, 77]. W przypadku, kiedy w wodzie zawierającej ClO₂ i chloryny (będące produktami jego redukcji w reakcji z domieszkami wody) obecny jest chlor, będą zachodzić reakcje wtórne. Reakcja dwutlenku chloru z chlorem – w postaci kwasu podchlorawego – prowadzi do powstawania chloranów [30]. Niezbyt dużo jest informacji o organicznych produktach tworzących się po dezynfekcji ClO₂ [53]. Według Zbieć i in. [52] niemal wszystkie zidentyfikowane uboczne produkty dezynfekcji wody dwutlenkiem chloru zawierały w swoich strukturach tlen (kwasy karboksylowe, ketony, estry), jedynie znaleziono dwa związki chlorowane i kilka związków aromatycznych. Dla porównania w przypadku chlorowania stwierdzono 3-5 razy wyższą liczbę półproduktów a w literaturze opisano ponad 300 UPCh (w tym 200, które zawierają chlor i brom). Zgadając się z Masschelein [78] kwasy di- i tri- karboksylowe są stałe i są produktami utleniania fenolu przez ClO₂. Kwasy karboksylowe i aldehydy są produktami reakcji ClO₂ z substancją humusową. Richardson i in. [79] uważa, że długołańcuchowe kwasy karboksylowe są głównym organicznym ubocznym produktem dezynfekcji przez ClO₂.

W Tabeli 3 zgodnie z Dojlido [52] przedstawiono zidentyfikowane główne uboczne produkty chlorowania wody dwutlenkiem chloru.

Tabela 3. Uboczne produkty chlorowania wody dwutlenkiem chloru [52]

Kwasy karboksylowe	Związki zawierające chlor	Inne związki
butanokarboksylowy	1,1,3,3-tetrachloro-2-propanon(1-chloroetylo)dimetylobenzen	Ketony: 2,3,4-trimetylocyklopent-2-en-1-on 2,6,6-trimetylo-2-cykloheksen-1,4-dion
pentanokarboksylowy		
heksanokarboksylowy		Estry: Ester dioktylowy kwasu heksenedikarboksylowego
heptanokarboksylowy		
2-etyloheksanokarboksylowy		Związki aromatyczne 3-etylostyren 2-etylostyren etylobenzaldehyd naftalen 2-metylnaftalen 1-metylnaftalen
oktanokarboksylowy		
nonanokarboksylowy		
dekanokarboksylowy		
undekanokarboksylowy		
tridekanokarboksylowy		
tetradekanokarboksylowy		
heksanokarboksylowy		
2-tert-butylomaleinowy		
2-etylo-3-metylomaleinowy		
benzoesowy		

W Polsce dwutlenek chloru w procesach uzdatniania wody jest technologią nową, stosowaną od roku 1992. Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej oraz Państwowy Zakład Higieny wydały 19 listopada 2002 pozytywne opinie dla stosowania dwutlenku chloru w technologii uzdatniania wody do picia [30], lecz dopiero Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [80] określa sumę stężenia chlorynów i chloranów w punkcie czerpalnym u konsumenta, w przypadku gdy woda jest dezynfekowana dwutlenkiem chloru. Do tego roku wykorzystywane były unormowania zagraniczne, najczęściej niemieckie. W Tabeli 4 zamieszczono przykłady przepisów przedstawiających dopuszczalne stężenie dwutlenku chloru i jego pochodnych w wodzie do picia.

Tabela 4. Dopuszczalne stężenia dwutlenku chloru, chlorynów i chloranów w wodzie do picia [80-83]

	dwutlenek chloru mg/dm³	chloryny mg/dm³	chlorany mg/dm³
Światowa Organizacja Zdrowia (WHO)	-	0,7	0,7
Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (USEPA)	MRDLG = 0,8 MRDL = 0,8	MCLG = 0,8 MCL/TT = 1,0	-
Komisja do Spraw Higieny i Bezpieczeństwa Pracy (HSC) - Wielka Brytania	Max \sum ClO ₂ , chloryny, chlorany = 0,5		
Wytyczne dotyczące wody przeznaczonej do spożycia - Niemcy	max.dawka = 0,4 max. pozostał. = 0,2 min. pozostał. = 0,05	max. pozostałość = 0,2	-
Rozporządzenie obowiązujące w Polsce Dz.U. 2007 nr 61 poz. 417	-	Σ chloranów i chlorynów = 0,7	

Dwutlenek chloru najczęściej jest wytwarzany z chlorynu sodu (NaClO₂) i kwasów solnego lub siarkowego (VI), można go również otrzymywać w reakcji chlorynu sodu z chlorem [52]. Stosuje się go nie tylko do utleniania wielu związków organicznych i nieorganicznych, ale również do obniżenia intensywności barwy wody, poprawy jej smaku i zapachu, jak również obniżenia liczebności glonów, co ułatwia proces koagulacji [52].

Dwutlenek chloru ma wiele zalet, do których można zaliczyć to, że:

- praktycznie nie reaguje z nienasyconymi związkami organicznymi, związkami aromatycznymi z nieaktywnymi lub słabo aktywnymi grupami funkcyjnymi, aldehydami, ketonami, chinonami i pochodnymi kwasów karboksylowych,
- nie reaguje ze związkami azotu, w tym z amoniakiem (w wodzie zawierającej jon amonowy, do której wprowadzany jest dwutlenek chloru nie tworzą się chloroaminy i nie powoduje to, zwiększonego zapotrzebowania na dezynfektant. ClO₂ nie utlenia azotu amonowego, ale nie dotyczy to azotynów utlenianych do azotanów z wytworzeniem chlorynów), a także z aminami pierwszorzędowymi, mocznikiem i większością aminokwasów, jak również

bromkami obecnym w uzdatnianej wodzie co zapobiega powstawaniu bromowych pochodnych trihalometanów [52, 53, 58, 84],

- powoduje znacznie zmniejszone formowanie się chlorowanych węglowodorów oraz brak tworzenia się chlorofenoli a produktem reakcji są substancje neutralne bez smaku i zapachu [58],
- ma bardzo dobre działanie dezynfekcyjne w podwyższonym zakresie pH wody [58, 66],
- ma wysoką efektywność bakteriobójczą (zdolność bakteriobójcza około 2,5-krotnie większa od kwasu podchlorawego), silne właściwości wirusobójcze (jest efektywniejszy niż chlor, czy chloraminy do inaktywacji wirusów), wykazuje skuteczne niszczenie form przetrwalnych bakterii oraz dobre właściwości przeciw zarodnikowe i przeciw glonowe [30, 58, 69] jak również powoduje długo utrzymującą się ochronę bakteriobójczą i bakteriostatyczną w sieciach wodociągowych i przyczyniając się do rozkładu osadów mikrobiologicznych w sieciach wodociągowych [58],
- poprawia właściwości organoleptycznych wody uzdatnionej [58, 69], gdyż nie powstaje przykry zapach i smak wody, jaki może powstawać przy stosowaniu chloru,
- nie oddziałuje mutagennie, ani nie jest promotorem takiego działania,
- powoduje utlenianie: siarczków, organicznych kompleksów żelaza i manganu jodków i cyjanków, azotynów[30 ,58].

Według EPA [81] do głównych wad dwutlenku chloru należą wysokie koszty chlorku sodu oraz jego transportu, jak również oznaczeń chlorynów i chloranów oraz fakt, że dwutlenek chloru jest gazem wybuchowym i ulega rozkładowi pod wpływem promieni słonecznych, dlatego też musi być wytwarzany *in situ*.

Jak pisze Zbieć i Dojlido [52] w przypadku gdy chlor był stosowany do drugiego chlorowania po dwutlenku chloru, wówczas pojawiało się znacznie więcej chlorowych i bromowych pochodnych organicznych, w tym halometany, halopropany, halo ketony, haloacetonitryle, haloaldehydy i inne związki halogenoorganiczne, oprócz wykrytych kwasów karboksylowych.

3. Aktywność biologiczna ubocznych produktów dezynfekcji wody, głównie UPCh z uwzględnieniem powstawanie chorób nowotworowych

Do głównych mikrozanieczyszczeń wody do picia o właściwościach mutagennych należą uboczne produkty dezynfekcji wody, a przede wszystkim uboczne produkty jej chlorowania [68].

Badania prowadzone przez wiele lat wykazały, że znacząca ilość UPD, które są potencjalnie szkodliwe dla zdrowia człowieka, jest wynikiem reakcji pomiędzy naturalnie występującymi w wodzie powierzchniowej kwasami humusowymi i fulwowymi a środkami dezynfekującymi takimi jak: chlor, chloraminy, dwutlenek chloru i ozon. Związki te powstają w niewielkich ilościach, mogą zmieniać się w zależności od zastosowanej metody oczyszczania wody [46, 55, 68] i mogą charakteryzować się właściwościami toksycznymi, mutagennymi jak również kancerogennymi [52]. Tworzenie się UPD zależy od typu i jakości wody poddawanej procesowi dezynfekcji (głównie od bogatej struktury i właściwości związków humusowych w wodach naturalnych) oraz od czynników takich jak: stężenie i rodzaj prekursorów, stężenie OWO, rodzaj i/lub dawka dezynfektanta, ilość pozostałego dezynfektanta, czas kontaktu, pH i temperatura [68].

Udowodniono także, że chlorowanie prowadzi do formowania ubocznych produktów, które wykazują mutagenną i/lub karcenogenną aktywność jak również długoterminową implikację na zdrowie człowieka. Wielokrotnie wykazywano wzrost mutagenności wody po procesach chlorowania [85, 86] a im gorsza była jakość wody poddawanej chlorowaniu, tym więcej powstawało szkodliwych ChZO [52, 87].

Źródłem węgla organicznego dla reakcji tworzenia ubocznych produktów chlorowania mogą być zarówno naturalnie obecne w wodzie substancje organiczne, takie jak substancje humusowe, jak i związki o typowo antropogennym rodowodzie, takie jak np. fenole. Chlorowane związki organiczne mogą również trafić do wód ze ściekami oraz opadami atmosferycznymi [23].

W 1974 odkryto, że chlorowanie wody do picia powoduje tworzenie chloroformu i innych trihalometanów z kwasów humusowych. Jak pisze Christian i in. [88] kwasy chlorooctowe (HAA) były pierwszymi odkrytymi w chlorowanej wodzie do picia, a dopiero 9 lat później odkryto trichlorometan [89]. Natomiast w 1986 roku po raz pierwszy wykazano obecność w wodzie do picia w Finlandii 3-chloro-4-(dichlorometyl)-5-hydroksy-2(5H)-furanu nazwanego w skrócie MX [90] i potwierdzano w dalszych badaniach we Finlandii, jak również w innych krajach np.: w Wielkiej Brytanii, Kanadzie, Japonii, Chińskiej Republice Ludowej [4].

Według Zbieć i Dojlido [52] tylko produkty uboczne chlorowania to setki, a być może tysiące związków powstających podczas tego procesu. Większość z nich to związki chloroorganiczne, choć powstają także substancje nie zawierające chloru w cząsteczce, np. aldehydy czy kwasy karboksylowe. Odrębną grupę ubocznych produktów chlorowania stanowią związki, bromo- i chlorobromoorganiczne, które powstają w wyniku utleniania bromków obecnych w wodzie surowej [11, 54, 91].

Wyjątkowo wysoki poziom THM-ów i wysoką aktywność mutagenną określoną przy użyciu testu Ames, zmierzono w chlorowanej wodzie wodociągowej [21, 92]. Następnie zaobserwowano liniową zależność pomiędzy ujawnieniem mutagenności w wodzie wodociągowej a rakiem pęcherza moczowego, nerek, żołądka, trzustki jak również białaczki [93-96]. Oszacowano, że jeden silny mutagen 3-chloro-4-(dichlorometyl)-5-hydroxy-2(5H)-furan (MX) razem z kilkoma innymi chlorowanymi hydroksyfuranami był przyczyną aż do 71% obserwowanej mutagenności [97]. Oprócz MX w chlorowanej wodzie wodociągowej zaobserwowano też wiele innych związków chemicznych, które mogą wykazywać niższą mutagenność, niemniej jednak mogą stanowić potencjalne ryzyko nowotworowe [64]. Z kolei [57] prowadząc badania, w których MX był obecny w chlorowanej wodzie bogatej w kwasy humusowe w zakresie zgodnym z tym, który został zarejestrowany w literaturze dla podobnych prób wody stwierdzili, że MX mógł być odpowiedzialnym za 1-3 % mutagenności próbek wody. Natomiast w przypadku poddania takiej wody działaniu enzymów AHH-1 TK+/- i cytochromu P450 wyrażających linię komórkową h1A1v2 i MCL-5 następowała nieznaczna dezaktywacja tego związku. Jednocześnie chlorowana woda wzbogacona kwasami humusowymi i MX była mniej mutagenna dla komórek ludzkich niż spodziewano się prowadząc podobne badania na bakteriach.

W puli związków o udowodnionej aktywności mutagennej znajdują się obok MX: bromoetan, dibromoetan, bromochloroacetonitryl, dichloroacetonitryl, 1-bromobutan, bromochlorometan, bromodichlorometan, 1,2-dichloroetan, bromoform, dichloropropen, 1-bromopropan, jodoetan, chloral, chlorodibromoetan [98]. Jest, zatem prawdopodobne, że pozostała aktywność jest wynikiem działania większej liczby różnorodnych lub o słabszej mutagenności produktów, których zidentyfikowanie jest bardzo trudne.

Chlor przyjmowany doustnie wraz z wodą do picia jest jedną z przyczyn raka pęcherza moczowego i jelita prostego, natomiast przy kontakcie ze skórą, wywołuje jej podrażnienia, suchość, pękanie i obniżenie odporności na dodatkowe zakażenia grzybicze. Chlor (jak również i jego pochodne) obniżają wchłanianie jodu oraz zwiększają szybkość utleniania niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego nienasyconych kwasów tłuszczowych. Około połowa ludności w Polsce korzysta z wody dezynfekowanej chlorem mimo wielu negatywnych skutków [99].

Główne oddziaływanie toksykologiczne wody dezynfekowanej dwutlenkiem chloru nie jest związane z samym dwutlenkiem chloru, a z produktami reakcji ClO_2 ze związkami organicznymi. Utlenianie 4-rzędowych amin i aminokwasów prowadzi do wytworzenia acetaldehydu i formaldehydu, które wykazują kancerogenne oddziaływanie na zwierzęta.

Chinony i benzochinony powstałe ze związków aromatycznych i fenoli, mogą również oddziaływać kancerogennie. Nie stwierdza się również wzrostu aktywności mutagennej i/lub kancerogennej wody w wyniku stosowania dwutlenku chloru. Sumaryczna ilość chlorowanych związków organicznych powstających w przypadku stosowania ClO_2 do dezynfekcji jest około 10-krotnie, a haloformów kilkudziesięciokrotnie mniejsza niż w przypadku stosowania chloru [100].

Nie stwierdzono wpływu dwutlenku chloru na krwinki. Powoduje on jednak zmniejszenie poziomu tyrozyny (hormonu tarczycy) w surowicy. Podwyższone stężenie ClO_2 , ClO_2^- , i ClO_3^- wpływa na zmianę w surowicy krwi u osób, u których stwierdzono niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej [30].

W Tabeli 5 przedstawiono główne uboczne produkty procesu dezynfekcji wody do picia powstające przy zastosowaniu chloru, dwutlenku chloru jak również chloru po zastosowaniu dwutlenku chloru.

Określenia aktywności biologicznej UPD dokonano według klasyfikacji IARC zamieszczonej w Tabeli 7 jak również na podstawie wytycznych WHO [8] i Dojlido [51].

Tabela 5. Najważniejsze uboczne produkty dezynfekcji wody do picia i ich aktywność biologiczna [8, 51, 101, 102]

UPD powstające po dezynfekcji chlorem	UPD o stwierdzonym (lub prawdopodobnym) działaniu mutagennym, rakotwórczym bądź teratogennym	UPD powstające po dezynfekcji dwutlenkiem chloru	UPD o stwierdzonym (lub prawdopodobnym) działaniu mutagennym, rakotwórczym bądź teratogennym	UPD powstające po dezynfekcji dwutlenkiem chloru a następnie chlorem	UPD o stwierdzonym (lub prawdopodobnym) działaniu mutagennym, rakotwórczym bądź teratogennym
Trihalometany (THM)	-Trichlorometan CHCl ₃ (chloroform) (2B), -Dibromochlorometan CHBr ₂ Cl (3), może wywoływać nowotwór, -Bromodichlorometan (2B)/rakotwórczy - bromoform (CHBr ₃) (3)/uszkodzenia wątroby, nerek	Kwasy karboksylowe	-	Haloalkany	-Dibromochlorometan (3) -Bromodichlorometan (2B)
Kwasy halogenooctowe	-Dichlorooctowy (2B), -Trichlorooctowy (3)/wykazuje działanie rakotwórcze	Aldehydy	-Formaldehyd (2A)	Haloketony	-
Halogenoacetonitryle	-Dichloroacetonitryl (3)/teratogeny -Bromochloroacetonitryl (3)/mutagenny, -Trichloroacetonitryl (3)/ teratogeny, - Dibromoacetonitryl (3)	Ketony	-	Haloacetonitryle	-
Chlorofenole	-2,4,6-trichlorofenol (2B)/słabe działanie mutagenne, -2,4-dichlorofenol, -2-chlorofenol	Związki aromatyczne	-	Haloaldehydy	-
MX	-MX (2B)/mutagenny	Estry	-	Inne związki chlorowane	-
Chloroaldehydy	-Formaldehyd (2A)/rakotwórczy		-chlorany -chloryny (3)	Niehalogenowe związki	-
Halogenoketony					
inne	-Chloropikryna (trichloronitrometan) - mutagenny, - chlorocyjan				
Bromiany	-Bromiany – mutagenne, rakotwórcze				
haloaldehydy	aldehyd dichlorooctowy, aldehyd trichlorooctowy				
haloketony	1,1-dichloropropanon (3), 1,1,1- trichloropropanon (2A), 1,1-dichloro-2-butanon, 1,1,1-trichloro-2-butanon				

W Tabeli 6 przedstawiono podstawowe informacje na temat oddziaływania na organizm ludzki wybranych ubocznych produktów dezynfekcji wody do picia.

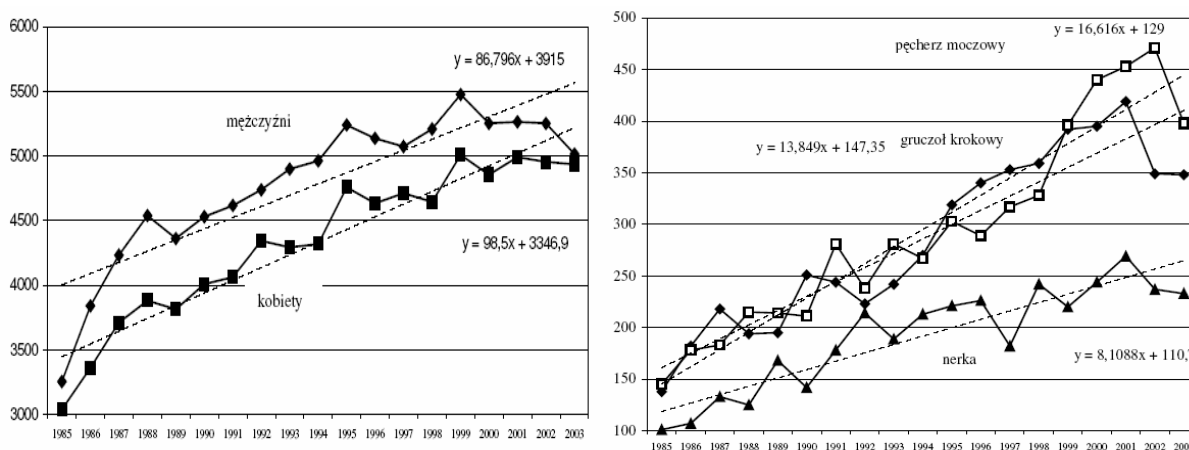
Tabela 6. Wybrane UPD i ich oddziaływanie na organizm człowieka [99, 103]

l.p.	UPD	Oddziaływanie na organizm człowieka
	haloformy	związki o bardzo dużej toksyczności i szerokim wpływie na organizm człowieka; większość z nich charakteryzuje się silnym działaniem mutagennym i kancerogennym
1	chloroform	silne działanie narkotyczne na centralny układ nerwowy, powoduje zaburzenia wzroku, stany oszołomienia i odurzenia, zawroty głowy, nerwobóle, podniecenie, ogólna utratę sił i bóle żołądka, zakłócenia akcji serca, marskość wątroby, rak wątroby i nerek, niekiedy guzy tarczycy, działając na skórę, wywołuje zapalenie i egzemy. Zaliczany do związków o stwierdzonym działaniu rakotwórczym
2	czterochlorek węgla (tetrachlorek węgla)	zaliczany jest do związków o działaniu narkotycznym; atakuje centralny układ nerwowy, powoduje zaburzenia wzroku, uszkodzenia obwodowego układu nerwowego, nerwobóle, stany oszołomienia i odurzenia. Działa na wątrobę, powodując jej zwyrodnienie i powiększenie, uszkadza nerki, a czasami może wywoływać methemoglobinemię – sinicę. Zaliczany do substancji rakotwórczych
3	czterochloroetylen po chlorowaniu	związek o działaniu narkotycznym, silnie toksyczny dla centralnego i obwodowego układu nerwowego; nerwobóle, zaburzenia wzroku, stany oszołomienia i odurzenia. Długotrwałe narażenie na ten związek powoduje zwyrodnienie i uszkodzenie wątroby, nerek i mięśnia sercowego oraz podrażnienia skóry. Zaliczany jest do substancji rakotwórczych
4	1,1,2-trójchloroetan – trójchloroetylen (TRI)	silna trucizna układu nerwowego o działaniu narkotycznym, powodująca również ogólną nerwowość, bóle głowy, rozdrażnienie, złe samopoczucie psychiczne oraz zaburzenia pracy serca, utratę apetytu, uszkodzenia wątroby, uszkodzenia nerek (cukromocz), anemię, działanie na nerw wzrokowy aż do utraty wzroku, uszkodzenia skóry (osuszenie, zapalenie, egzemy); związek o stwierdzonej czynności rakotwórczej
5	kwas dichlorooctowy	powoduje neuropatię, zmniejszenie masy ciała, powstawanie nowotworów wątroby
6	chlorofenole	grupa silnych trucizn powodujących uszkodzenia układu nerwowego, krążenia i oddechowego; mogą wywoływać białaczki, guzy chłoniakowe oraz zmiany alergiczne skóry i błon śluzowych
7	chlorany i nadchlorany	methemoglobinemia- w zależności od ilości tego związku we krwi dochodzi do słabego lub silniejszego niedotlenienia tkanek, czego następstwem są zaburzenia czynności różnych narządów
8	chloronaftaleny	silne trucizny; szczególnie niebezpieczne dla dzieci (do 6 roku życia), powodują hemolizę krwi i zacopowanie kanalików nerkowych, mogą być przyczyną uszkodzenia wątroby i jej bólu, żółtaczki oraz zmian skóry w postaci wysypki, egzemy
9	jon chlorynowy i chloranowy	powodują anemię hemolityczną na skutek utleniania błon komórkowych erytrocytów. W wyższych stężeniach chloryny powodują methemoglobinemię. Jon chlorynowy i chloranowy uważane są za toksyczne.

Badania epidemiologiczne prowadzone na populacji ludzkiej wykorzystującej do picia wodę powierzchniową dezynfekowaną chlorem wykazują zagrożenie chorobami nowotworowymi u ludzi, jak również spontaniczne poronienia i inne reprodukcyjne oraz rozwojowe skutki. Ponadto badania epidemiologiczne wykazały zależność pomiędzy

mutagennością chlorowanej wody do picia a śmiertelnością na raka układu moczowego (głównie pęcherza) i pokarmowego [68]. A Związek pomiędzy spożyciem wody do picia dezynfekowanej chlorem a szkodliwym działaniem na zdrowie człowieka został uznany przez IARC za wystarczająco wykazany [17].

Tylko w województwie Dolnośląskim w roku 2003 stwierdzono ok. 7 000 zgonów z powodu nowotworów złośliwych (25% wszystkich zgonów), co oznacza iż co czwarty mieszkaniec tego województwa będzie chorował w swoim życiu na nowotwór złośliwy (biorąc pod uwagę fakt 35-procentowej wyleczalności). Zmiany liczb zarejestrowanych na Dolnym Śląsku w latach 1985-2003 zachorowań na nowotwory złośliwe przedstawiono na Rys 5 i 5a.



Rysunek 5 i 5a. Zmiany liczb zarejestrowanych zachorowań na nowotwory złośliwe; ogółem i układu moczowo - płciowego (u mężczyzn)

Najczęściej występujące umiejscowienia nowotworów zarejestrowanych na Dolnym Śląsku w 2003 r. były:

l.p.	mężczyźni	%	kobiety	%
1	płuco	26,8	pierś	20,1
2	jelito grube (okrężnica i odbytnica)	12,2	jelito grube (okrężnica i odbytnica)	11,6
3	pęcherz moczowy	7,9	płuco	10,7
4	gruczoł krokowy	6,9	jajnik	6,5
5	żołądek	5,3	trzon macicy	5,9
6	-	-	pęcherz moczowy	2,5

Dane o nowotworach złośliwych na Dolnym Śląsku są porównywane przez WHO z danymi innych krajów świata [104]. Jak widać dość spora część ludności Dolnego Śląska wykazuje zachorowalność na nowotwory jelita grubego (okrężnica i odbytnica), pęcherza

moczowego i żołądka, na co niestety wpływ może mieć spożywanie wody do picia dezynfekowanej chlorem.

3.1. Mutagenność innych niż UPD mikrozanieczyszczeń wody

Jak już wspomniano wyżej woda do picia może zawierać niezwykle różnorodne substancje organiczne pochodzenia naturalnego i antropogenicznego stanowiące jej zanieczyszczenie albo o charakterze pierwotnym, tzn. te których nie udało się usunąć w procesie uzdatniania albo wtórnym tzn. takie które są pozostałością stosowanych reagentów lub produktami ubocznymi zwłaszcza zabiegów dezynfekcyjnych [105]. Wiele z nich charakteryzuje się działaniem toksycznym, genotoksycznym, mutagennym, rakotwórczym, czy też toksycznością objawiającą się w procesach reprodukcji. Międzynarodowa Organizacja Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer - IARC) dokonała podziału związków chemicznych w zależności od istnienia lub braku przekonujących dowodów kancerogenności w stosunku do ludzi i/lub zwierząt doświadczalnych na pięć grup [17, 101] (Tabela 7).

Tabela 7. Podział związków chemicznych wg IARC w zależności od ich potencjalnych właściwości kancerogennych

Grupa	Charakterystyka grupy	mikrozanieczyszczenia wody
1	czynnik jest rakotwórczy dla człowieka	arsen, chrom VI, benzen i uboczny produkt jej dezynfekcji jakim jest chlorek winylu
2 A	czynnik jest prawdopodobnie rakotwórczy dla człowieka	beryl, kadm, epichlorohydryna, dwubromek etylenu i powstający w procesie dezynfekcji formaldehyd
2 B	czynnik jest potencjalnie rakotwórczy dla człowieka	należy większość pestycydów oraz chlorowane węglowodory, WWA oraz produkty uboczne dezynfekcji wody jak bromiany, bromodichlorometan, chloroform, 2,4,6-trichlorofenol,
3	czynnik nie jest klasyfikowany jako rakotwórczy dla człowieka	-
4	czynnik prawdopodobnie nie jest rakotwórczy dla człowieka	-

Oszacowanie mutagenności i genotoksyczności złożonej mieszaniny jaką jest woda powierzchniowa i woda do picia, używając rozmaitych metod biologicznych wykazało, że zawiera ona wiele niezidentyfikowanych związków chemicznych, które mogą mieć potencjał kancerogeny i mogą stanowić ryzyko zdrowotne o nieznannej wielkości [68, 99].

Niektóre potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia i życia ludzi substancje chemiczne pochodzą bezpośrednio z chemikaliów używanych do uzdatniania wody [8, 33]. Stosowane w procesie dezynfekcji środki dezynfekujące wprowadzane są w takiej ilości, aby

zabezpieczyć sieć przed mikrobiologicznymi zanieczyszczeniami oraz wtórnemu ich wzrostowi w systemie dystrybucji wody. A zatem dezynfektant jest obecny w wodzie wodociągowej razem z UPD. Nawet jeśli poziom narażenia jest niski, obecność tych składników w wodzie do picia może stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzkiego spowodowane codzienną i długoterminową ekspozycją na te związki [68]. Dodatkowo sam chlor stosowany jako środek dezynfekujący zawiera chlorometan, chloroaceton, chloropropan, chloropropanol, chlorofenol i chlorofuran. Kilka z tych produktów (n.p. chloropropan, chloropropanol i chlorohydroksyfuran) wykazuje działanie mutagenne w stosunku do bakterii i toksyczne dla gryzoni *in vivo* jak również *in vitro* [57].

Wiele chemicznych zanieczyszczeń zidentyfikowanych w wodzie powierzchniowej wykazuje właściwości mutagenne [1], wynikające z ich wprowadzenia wraz z działalnością przemysłową i rolniczą. Mutagenne związki chemiczne mogą także pochodzić z materiałów konstrukcyjnych stosowanych w systemach wodociągowych [8, 33] jak również z korozji lub płukania wewnętrznych powierzchni zbiorników z wodą i rurociągów, które są często pokryte np. smołą węglową (coal-tar) lub plastikiem. Inne badania wykazały, że rurociągi pokryte smołą węglową wypłukują związki mutagenne takie jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA), które również zwiększają mutagenność wody do picia [68]. Zanieczyszczenia takie mogą również pochodzić ze stosowanych „*in situ*” wykładzin polimeryzowanych [30]. Stąd też materiały używane do produkcji rur powinny wykluczać możliwość zanieczyszczenia wody do picia substancjami pochodzącymi z tworzyw sztucznych wykorzystywanych do ich produkcji.

Tworzenie się mutagenów podczas dystrybucji wody jest rezultatem reakcji chemicznych np. chloru pozostałego z naturalną materią organiczną lub mogą się one tworzyć w wyniku działalności mikrobiologicznej. Pierwsze badania nad rolą systemów dystrybucyjnych we wzroście mutagenności wody do picia były prowadzone przez Schwartz i in. [106], który do tego celu użył testu Salmonella (testu Ames). Biofilm i pozostały dezynfektant obecne w rurociągach z wolnopłynącą wodą również mogą przyczyniać się do wzrostu mutagenności w sieci dystrybucji wody [68].

Zagadnieniu bezpieczeństwa chemicznego wody do picia nadano rangę międzynarodową. W 1980 roku WHO utworzyła Program Bezpieczeństwa Chemicznego. Dwanaście lat później podczas sesji ONZ w Rio de Janeiro uznano to zagadnienie za jeden z priorytetów w kontekście ochrony środowiska [107]. Identyfikacja kancerogennych związków chemicznych występujących w wodzie do picia dostarczyła podstaw do objęcia kontroli nad tymi związkami w wodzie do picia przez United States Environmental Protection Agency

(U.S.EPA) rozpoczynając od trihalometanu. Początkowe próby dotyczyły THM w systemie dystrybucji wody zaopatrującym więcej niż 10 000 osób. Maksymalny Poziom Zanieczyszczenia (MCL) określono na poziomie 0,1 mg/l. Jakkolwiek U.S. EPA skorygowała wartości MCL w 1998 r do poziomu 0,08 mg/l dla THM i 0,06 mg/l dla kwasów haloctowych (HAA) [55].

4. Metody bioindykacyjne oceny aktywności mutagennej mikrozanieczyszczeń wody

W obecnym stanie wiedzy nie ma możliwości rutynowego oznaczania pełnego spektrum mikrozanieczyszczeń wody do picia, nawet jeśli badania zostaną ograniczone do produktów ubocznych procesu dezynfekcji.

Jak wynika z danych literaturowych, wiele grup ksenobiotyków nie wykazuje jednorodnego typu działania toksykologicznego. Zróżnicowany mechanizm toksykologiczny zależy od rodzaju i formy związku, typu ekspozycji (ostra czy chroniczna), powstawania metabolitów pośrednich, rodzaju organizmu i warunków środowiskowych [108, 109]. Natomiast analizy chemiczne jakościowe i ilościowe nie dają pełnej informacji na temat rzeczywistego narażenia na czynniki mutagenne i rakotwórcze wraz z piciem wody. Stąd ogromne zainteresowanie oceną zagrożenia zdrowia konsumentów metodami biologicznymi, pozwalającymi na ocenę wpływu zanieczyszczeń zarówno toksycznych jak i mutagennych na organizmy żywe z możliwością ich transportowania na organizm człowieka [6].

W celu uzyskania informacji dotyczącej zagrożeń związanych z piciem wody zaproponowany został przez Teodorę M. Traczewską – badawczy model jakości zdrowotnej wody metodą biotestów, przedstawiony jako algorytm badań przesiewowych gwarantujących rzetelną informację o aktywności biologicznej składników zawartych w uzdatnianej wodzie do picia, w aspekcie jej potencjalnych właściwości mutagennych i cytotoksycznych [4].

Równocześnie poszukuje się możliwości prognozowania, do celów utylitarnych, zagrożeń zdrowotnych wynikających z zanieczyszczeń wody do picia, bez konieczności wykonywania kosztownych i wymagających przeszkolonego personelu badań.

Postęp w genetyce pozwolił na opracowanie krótkoterminowych testów z wykorzystaniem komórek prokariotycznych i kariotycznych, umożliwiających wstępną ocenę i wykrywanie potencjalnych kancerogenów i prokancerogenów, które posiadają właściwości mutagenne. Ocena aktywności biologicznej, obok badań epidemiologicznych, może być wykonana metodą testów bioindykacyjnych. Testy te pozwalają na stwierdzenie

rzeczywistego narażenia organizmów żywych bowiem umożliwiają ocenę właściwości toksykodynamicznych i genotoksycznych mieszanin uzyskanych na drodze możliwie szerokiej ekstrakcji. Badanie bioindykacyjne pozwalające na ocenę działania na organizmy żywe szerokiego spektrum mikrozanieczyszczeń w ekstraktach całych grup związków pełniej odzwierciedlają rzeczywistą jakość zdrowotną wody do picia.

Wykazanie, że związek chemiczny ma właściwości mutagenne stanowi przesłankę, iż może on także być rakotwórczy [110].

[...] Badania, na podstawie, których wykrywa się czynniki indukujące proces nowotworowy w wodzie do picia można podzielić na trzy grupy:

1) testy krótkoterminowe:

a) badania na bakteriach:

- test Ames / test *Salmonella*– szczepy *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100– najczęściej stosowane do oceny aktywności mutagennej wody do picia,
- test UMU (odmiana testu SOS-chromotest) - *Salmonella typhimurium* TA 1535/psk10002 – w badaniach złożonych mieszanin wykazuje ich aktywność mutagenną analogiczną jak w teście Ames,
- inne testy z użyciem *Samonella typhimurium* – mutanty *Samonella typhimurium*: test mutacji oporności na 8-azaguanidynę, postępowej mutacji oporności na arabinozę, powrotnej mutacji żywieniowej związanej z wykorzystywaniem antranilatu,
- SOS- chromotest – *Escherichia coli* – zgodność tego testu z testem Ames jest bardzo duża [111, 112], a nawet daje mniej fałszywych wyników niż test *Salmonella*,
- testy z użyciem *Escherichia coli* WP2, WP2uvrA, WP2(KM101), WP2uvrA(KM101),
- test MUTATOX™ – alternatywny w stosunku do testu Ames, należący do grupy mikrobiotestów [5] – w teście tym używane są mutanty morskich bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischerii* [68].
- do testów o niskiej czułości i w związku z tym rzadko stosowanych w badaniach wody zalicza się testy reperacji DNA.

Do najczęściej stosowanych w badaniach mutagenności wody do picia należą testy: Ames, SOS – Chromotest i test Umu [1].

b) testy z użyciem komórek i organizmów eukariotycznych np.:drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, [68] (test drożdżowy bywa także używany jako uzupełnienie testu Ames, w którym nie uzyskuje się wyników dodatnich [5], test SMART–wykorzystujący somatyczne komórki muszki owocowej *Drosophila melanogaster* – stanowi najczęściej uzupełnienie testów bakteryjnych,

- c) testy na komórkach ssaków (*in vitro*), testy mikrojądrowe i badania cytogenetyczne (test aberracji chromosomowych, testy wymiany chromatyd siostrzanych, test mikrojądrowy),
- 2) średnioterminowe badania na zwierzętach – trwające od 2 do 5 lat, są bardzo kosztowne (z powodu rozbieżności między wynikami testów na komórkach pro - eukariotycznych IARC wymaga stosowania, oprócz testów bakteryjnych, również testów na modelach eukariotycznych [4]),
- 3) długoterminowe badania epidemiologiczne – dotyczące bezpośredniej obserwacji populacji ludzkiej, polegające na rejestrowaniu zachorowań i zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi. Ocena wpływu badanych substancji na zapadalność na określony typ nowotworów wymaga ok. 20-30 lat, ze względu na długi okres pomiędzy początkiem ekspozycji a ujawnieniem się nowotworu, a wpływ na ostateczny stan zdrowia może mieć wiele oddziałujących ze sobą, trudnych do zidentyfikowania czynników.

Proste w interpretacji są testy krótkoterminowe, zwłaszcza bakteryjne, czy na liniach komórkowych, każdy z nich, związany jest bowiem z określonym mechanizmem działania na materiał genetyczny. Dzięki bardzo krótkiemu czasowi generacji bakterii, krótkoterminowe testy bakteryjne są szybkie, proste i względnie niedrogie. Wykazują one wysoką korelację między związkami, które są genotoksyczne dla komórki bakteryjnej, ich mutagennością oraz zdolnością do inicjowania nowotworów u ssaków [4, 18].

Wszystkie testy bakteryjne składają się z dwóch elementów:

- specjalnie przygotowanej komórki bakteryjnej – wykazującej zwiększoną wrażliwość na związki chemiczne dzięki obecności wprowadzonych sztucznie plazmidów oraz mutacjizwiększającej przepuszczalność błony komórkowej dla związków o dużej masie cząsteczkowej i uszkodzeniu systemu naprawy DNA,
- enzymatycznego układu metabolizującego testową substancję, czy też mieszaninę - czyli frakcji S9, która składa się z enzymów mikrosomalnych wyizolowanych najczęściej z wątroby szczurów, aktywowanych np. mieszaniną bifenyli (Arochlor, 1254). W treści Amesa stosuje się frakcję S9 w celu stworzenia warunków zbliżonych do tych, które są w organizmach ssaków, a głównie w wątrobie. Wątroba jest podstawowym organem uczestniczącym w aktywacji i detoksykacji związków chemicznych, które w organizmie ulegają różnym przemianom, w wyniku których tworzy się kilka, a nawet kilkanaście metabolitów [4, 5, 111, 113]. Przemiany te mogą prowadzić zarówno do detoksykacji jak również do aktywacji, w wyniku której dochodzi do powstawania aktywnych metabolitów

mogących reagować z materiałem genetycznym, powodując mutacje. Działanie nowotworowe promutagenów jest więc wypadkową procesów aktywacji i detoksykacji, jakim ulegają one w organizmie [5, 114-116].

[...] Odnoszenie wyników badań z modeli bakteryjnych na ludzi jest dużym uproszczeniem, jednak istnieje na ogół duża korelacja między kancerogennością stwierdzoną w bezpośrednich badaniach na zwierzętach a mutagennością wykazaną przez testy bakteryjne [5, 117].

4.1. Test Amesa i jego zastosowanie w badaniach potencjalnej mutagenności mikrozanieczyszczeń wody do picia

Trudności w identyfikacji substancji znajdujących się w wodzie, a w szczególności chloropochodnych związków organicznych potencjalnie mutagennych, spowodowało przyjęcie nowych zasad dotyczących rutynowego monitoringu związków rakotwórczych i/lub teratogennych w wodzie do picia. W badaniach tych kluczową pozycję zajmują bakteryjne testy krótkoterminowe *in vitro*. Testem bakteryjnym o najszerszym zastosowaniu, odznaczającym się znaczną czułością jest test *Salmonella* opracowany przez Amesa i współpracowników. Test ten, wprowadzony został, bardzo szeroko, w połowie lat siedemdziesiątych, stąd testem tym przebadano największą pulę związków chemicznych. Z puli testów bioindykacyjnych to właśnie ten test jest zalecany przez WHO i EPA [4] i uznany został za najbardziej reprezentatywny dla oceny chemicznej mutagenyzy. Prognozowanie potencjalnie rakotwórczych substancji chemicznych w teście *Salmonella* określone jest na ok. 90% [118, 119].

Test *Salmonella* jest proponowany w Standard Methods for Examination of Water and Wastewater US EPA do oceny jakości zdrowotnej wody do picia [20].

W teście tym wykorzystuje się m.in. mutacje w operonie histydynowym bakterii *Salmonella typhimurium* LT₂, a polega on na wykrywaniu rewersji do prototrofii auksotroficznych bakterii pod wpływem działania związków chemicznych lub ich mieszanin, czyli pozwalają określić zmiany w DNA w wyniku indukcyjnego działania badanego związku [120, 121]. Szczepy te mają *rfa* mutacje powodującą zwiększoną przepuszczalność błony.

Porównując wyniki uzyskane po zastosowaniu różnych szczepów *S. typhimurium* można stwierdzić, jakie uszkodzenie w DNA i w jakim natężeniu wywołuje badany związek chemiczny [4, 5]. Do rutynowych badań przesiewowych autorzy zalecają zestaw składający się z czterech szczepów TA97, TA98, TA100 i TA102 ze względu na ich wrażliwość na szerokie spektrum mutagenów. Do badań mutagenności wody do picia stosuje się dwa

szczepu *S. typhimurium* TA98 i TA100. Szczep TA 100 jest wrażliwy na działanie mutagenów wywołujących mutacje typu zmiany zasad lub par zasad G-C czy A-T (ang. base-pair substitution). Z kolei delecja Δ uvrB u szczepu TA98 powoduje zmniejszenie zdolności naprawy uszkodzeń DNA poprzez wycinanie uszkodzonych fragmentów i wstawianie prawidłowych (system reparacji, który działa bezbłędnie). Pozwalają więc na stwierdzenie indukcji uszkodzeń usuwanych przez system naprawy przez wycinanie [5].

Często rezultaty testów Amesa potwierdzane są innymi testami pozwalającymi na ocenę genotoksyczności wody do picia. Równocześnie metodami chemicznymi poszukuje się markerów odpowiedzialnych za mutagenność wody do picia [4].

Wiele badań ujawniło obecność aktywności mutagennej chlorowanej wody do picia przy zastosowaniu bakteriologicznych testów na mutagenność [122-124].

4.2. Sposoby przedstawiania i analiza wyników testu Amesa

Przed wprowadzeniem zintegrowanego monitoringu narażenia na czynniki rakotwórcze konieczne jest ujednoczenie metodyki dotyczącej zarówno procedury przygotowywania próbek do testu Amesa, jak również przedstawiania i analizy uzyskanych wyników. Tylko w takiej sytuacji zagwarantowana będzie prawidłowość oceny jakości wody oraz możliwość porównywania otrzymywanych w różnych laboratoriach wyników [4, 125]. Jednym z problemów z powodu, którego trudno jest porównywać poszczególne badania jest sposób przygotowania próbek, innym jest sposób prezentacji wyników uzyskanych testem Amesa.

Jednym ze sposobów przedstawiania wyników uzyskanych testem Amesa powinno być wykorzystanie formy tabelarycznej lub wykresów rozrzutu, gdzie umieszczone są wszystkie dane (jednak przy dużej ilości wyników ten sposób może być pominięty). Przy tym można określić wartości podstawowych statystyk opisowych tj. średnia, odchylenie standardowe, minimum, maksimum czy współczynnik zmienności dla danej dawki. Natomiast, jeśli w analizie danych uzyskanych testem Amesa potrzebny jest bardziej szczegółowy opis wyników dla konkretnej dawki/konkretnego zateżenia (stężenia) to wówczas można wykorzystać wykres ramka-wąsy, który pozwoli na porównanie wartości podstawowych statystyk opisowych dla poszczególnych dawek/konkretnych zateżeń (stężeń) oraz pozwala określić charakter zależności krzywej dawka-odpowiedź [125, 126].

Przed przystąpieniem do analizy wyników, czyli jeszcze na etapie badań, ocenia się, czy istnieje zależność pomiędzy dawką (zateżeniem/stężeniem) - d - badanej próby a liczbą rewertantów, czyli czy uzyskane dane układają się w postaci charakterystycznej krzywej

zależności dawka-odpowieź o charakterystycznym przebiegu. Jeśli jest spełniony ten warunek - oznacza to, że zakres zateżeń (dawek/stężeń) w jakim wykonywane było doświadczenie, został prawidłowo dobrany. Tylko w przypadkach uzasadnionych metodyką prowadzonych badań można odstąpić od tej reguły [113, 125, 126].

Określona testem Ames mutagenność może być przedstawiona jako:

- MR - współczynnik mutagenności,
- AM - aktywność mutagenna,
- M - mutagenność określona jako liczba rewertantów indukowana przez 1 dm³ badanej próbki (w ostatnich latach najczęstszy a niekiedy jedyny sposób przedstawiania wyników uzyskanych testem Ames).

Wyniki testu Ames powinno przedstawiać się jako mutagenność M i do wyboru jako współczynnik mutagenności MR (jest to prostszy i bardziej czytelny sposób) lub jako aktywność mutagenna AM. Podanie wyników tylko jako liczba rewertantów w 1 dm³ nie informuje czy w próbie znajdują się związki, które wykazują charakter mutagenny jak również nie wiadomo jakie zateżenie/stężenie (dawka) tej próby wykazuje takie właściwości, a o tym właśnie informują wskaźniki MR lub AM. W analizie wyników z testu Ames należy pamiętać również o podaniu średniej wartości rewersji spontanicznej danego szczepu *Salmonella typhimurium* oraz o wartościach pozytywnych uzyskanych po zastosowaniu odpowiednich czynników mutagennych charakterystycznych dla danego szczepu testowego [5, 125, 126].

Według wytycznych OECD (1997) wyniki testu *Salmonella* uważa się za pozytywne, jeżeli występuje zależny od stężenia w badanym zakresie lub powtarzalny w jednej lub kilku badanych dawkach wzrost liczby kolonii rewertantów na płytkę [127].

4.2.1. Statystyka opisowa [128-133]

Statystyka opisowa to dział matematyki zajmujący się metodami opisu danych statystycznych uzyskanych podczas badania statystycznego. Stosowana jest zazwyczaj jako pierwszy i podstawowy krok w analizie zebranych danych. Wykorzystanie statystyki opisowej pozwala na opisanie zbioru danych i wyciągnięcie wstępnych wniosków i uogólnień na temat zbioru. Do technik statystyki opisowej można zaliczyć między innymi opis tabelaryczny (możliwy do zastosowania, jeśli zbiór danych jest mało liczny), wyznaczanie miar rozkładu oraz graficzną prezentację wyników.

Jedną z podstawowych form prezentacji danych w formie graficznej jest wykres box-plot, nazywany również wykresem pudełkowym lub ramka-wąsy. Ogólnie przedstawia on zależności pomiędzy niektórymi statystykami pozycyjnymi. Jednym z przykładów może być umieszczenie wartości statystyk opisowych takich jak: mediana, kwartyle i ranga. Inny przykład, to przedstawienie wartości średniej oraz odchylenia standardowego i przedziału dla danych odstających. Wykres ramka-wąsy służy do porównania wartości poszczególnych statystyk opisowych dla różnych danych.

Do opisu rozkładu prawdopodobieństwa danych wykorzystywane są różnego rodzaju miary rozkładu - wielkości obliczane na podstawie uzyskanych danych. Interpretacja wartości tych miar dostarcza informacji na temat charakteru danych oraz rozkładu badanej cechy. Miary można podzielić na dwie podstawowe kategorie:

- miary położenia - najważniejsza to średnia arytmetyczna i mediana,
- miary zróżnicowania (inaczej miary rozproszenia, dyspersji) - typowe przykłady to odchylenie standardowe, minimum, maksimum, ranga czy współczynnik zmienności (CV).

4.2.2. Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów

W pierwszej fazie analiz statystycznych należy określić jaki rozkład mają uzyskane dane. Niech d oznacza wielkość dawki (zateżenia, stężenia), natomiast N liczbę rewertantów jaka została uzyskana przy danym d . Jeśli próbka jest dostatecznie duża [133] wtedy spełnione są założenia rozkładu normalnego i analizę danych należy rozpocząć właśnie od tego rozkładu. W tym przypadku wszystkie potrzebne narzędzia statystyczne, można znaleźć w większości pakietów statystycznych. Kiedy założenie o normalności próbki nie jest spełnione, należy wybrać jedną z kilku propozycji rozkładów danych [134]. Na podstawie danych literaturowych najbardziej odpowiednim rozkładem używanych testem Amesa wyników będzie rozkład dyskretny, ponieważ dane, opisujące liczbę rewertantów w zależności od dawki próbki są danymi nieciągłymi. Jedną z propozycji jest wykorzystanie rozkładu Poissona [135]. W tym przypadku prawdopodobieństwo, że liczba rewertantów

N jest równa x określone jest następującym wzorem $P(N = x) = \frac{\mu^x}{x!} e^{-\mu}$, gdzie μ jest wartością oczekiwaną rozkładu. W przypadku powyższego rozkładu wariancja zmiennej losowej N jest równa jej wartości oczekiwanej μ . [133]. Zgodnie z literaturą tematu [134] to nie rozkład normalny a rozkład Poissona jest naturalnym rozkładem prawdopodobieństwa służącym do przewidywania liczby rewertantów N , w teście Ames. Jednak zdarzają się

sytuacje kiedy powyższy rozkład nie jest wystarczający. Według Berstain i in. [134] taka sytuacja jest częsta, ponieważ w wielu przypadkach wariancja rozkładu liczby rewertantów nie jest zbliżona do wartości oczekiwanej, a znacznie ją przekracza. Dopiero po pewnej modyfikacji rozkładu Poissona, czyli wprowadzeniu dodatkowego współczynnika, który zmienia zależności pomiędzy wariancją a wartością oczekiwaną, rozkład ten ma lepsze zastosowanie w analizie wyników uzyskanych za pomocą tego testu. Consul i Jain [136] proponują dwa uogólnienie rozkładu Poissona: wariant GP1 i GP2. W uogólnieniu GP1 zostało przyjęte, że wariancja rozkładu jest równa wartości oczekiwanej pomnożonej przez pewną stałą większą od jedności, natomiast uogólnienie GP2 zakłada, że wariancja rozkładu jest funkcją wykładniczą wartości oczekiwanej. Takie podejścia pozwalają na lepsze dopasowanie teoretycznych modeli do danych rzeczywistych.

W trakcie analizy danych uzyskanych testem Amesa może zaistnieć również sytuacja kiedy dane nie mają ani rozkładu normalnego, ani rozkładu Poissona ani też uogólnionego rozkładu Poissona GP1 czy GP2. Przyczyną jest zazwyczaj duża i nieokreślona różnica pomiędzy wartością oczekiwaną a wariancją próby. Dlatego też, w tym przypadku, można rozważyć przekształcenie danych, wykorzystując np. transformację Boxa-Coxa, albo nałożyć logarytm na dane, co może doprowadzić do zmniejszenia wariancji próby i problem z dopasowaniem rozkładu prawdopodobieństwa zniknie [125].

Założenie o rozkładzie normalnym danych pochodzących z testów Amesa według [125, 126] należy weryfikować za pomocą odpowiednich testów normalności: Kołmogorova-Smirnova, Lillieforsa czy Shapiro-Wilka. W celu zweryfikowania hipotezy, że dane pochodzą z rozkładu Poissona lub jego uogólnionych wersji, proponuje się zastosowanie testu zgodności Chi-kwadrat [133].

4.2.3. Charakter krzywej dawka-odpowieź

Uzyskane testem Amesa wyniki przedstawiane są w postaci krzywej zależności dawka-odpowieź, która opisuje zależność funkcyjną - jak wielkość dawki $-d$ (stężenia/zatężenia) wpływa na liczbę rewertantów N . Do przedstawienia charakteru krzywej można wykorzystać wykres ramka-wąsy, który jednocześnie pokazuje wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi, (dodatkowo widać na nim jak zachowuje się odchylenie standardowe w zależności od d).

W wielu opublikowanych pracach opisujących wyniki testu Amesa, autorzy wykorzystują modele matematyczne do badania krzywej zależności dawka -odpowieź

[135, 137]. Wg Haynes i Eckard [138] liczba rewertantów w zależności od dawki d jest dana następującą zależnością funkcyjną:

$$P(d) = (1 - e^{-H_m(d)}) * e^{-H_k(d)}$$

gdzie: $H_m(d)$ - przewidywana ilość mutacji w komórkach bakteryjnych w zależności d , czyli od dawki, stężenia/zatężenia, $H_k(d)$ - przewidywana ilość zniszczonych komórek bakteryjnych w zależności od d .

Przedstawione równanie jest podstawą do analizowania wyników uzyskanych testem Amesza za pomocą różnorodnych modeli matematycznych. W pracach [134, 135, 139-141] proponowane są różne postacie funkcji $H_m(d)$ oraz $H_k(d)$ wraz z uzasadnieniem merytorycznym i przykładami zastosowań. Niezależnie od tego jakimi funkcjami opisywane są $H_m(d)$ i $H_k(d)$ krzywa zależności dawka – odpowiedź ma następujący przebieg:

- przy niskich dawkach (stężeniach/zatężeniach) badanej próby – krzywa dawka-odpowiedź rośnie, czyli wraz ze wzrostem dawki (wraz z wyższym stężeniem/zatężeniem badanej próby) wzrasta mutagenność,

- przy wyższych dawkach (stężeniach/zatężeniach) - w pewnym momencie, wraz ze wzrostem dawki (stężenia/zatężenia), następuje załamanie krzywej i od tego momentu maleje ona wraz ze wzrostem dawki (stężenia/zatężenia) – jest to konsekwencją wpływu toksycznego wyższych dawek badanej próbki.

Bernstein i inni [134] sugerują analizowanie tylko początkowej części krzywej dawka-odpowiedź, czyli dla dawek (stężeń/zatężeń) powodujących mutagenność badanej próbki. Dlatego proponują następujące postacie wspomnianych funkcji, gdzie początkowa część krzywej ma charakter liniowy i nie brane są pod uwagę dawki (stężenia/zatężenia) powodujące efekt toksyczny. Wtedy to charakter krzywej zależności-dawka odpowiedź ma następujący charakter

$$1 - e^{-H_m(d)} = \beta_0 + \beta_1 d, \quad e^{-H_k(d)} = 1,$$

Inny charakter tej krzywej jest u np. Margolin [135] gdzie początkowa część krzywej opisana jest równaniem $1 - e^{-H_m(d)} = 1 - e^{-(\beta_0 + \beta_1 d)}$, natomiast wraz ze wzrostem dawki przybiera postać $e^{-H_k(d)} = e^{-\beta_2 * d}$, lub $e^{-H_k(d)} = 2 - e^{(\beta_2 * d)_+^b}$, A jeszcze inny u np. Breslow [139] gdzie $1 - e^{-H_m(d)} = e^{(\beta_0 * (d_0 + d))_{\beta_1}}$ a krzywa $e^{-H_k(d)} = e^{-\beta_2 * d}$.

4.2.4. Współczynnik mutagenności (MR)

Współczynnik mutagenności MR określany jest jako stosunek średniej liczby rewertantów szczepu testowego *S. typhimurium* indukowanych przez czynniki mutagenne zawarte w dawce (zatręzeniu/stężeniu) d do średniej liczby rewertantów spontanicznych.

W analizie uzyskanych wyników - za wynik pozytywny dla danej próby wody uznaje się każdy przypadek pojawienia się co najmniej dwukrotnie wyższej od spontanicznej rewersji indukowanej do prototrofii mutagenów żywieniowych *Salmonella typhimurium* tzn. gdy współczynnik mutagenności MR jest większy bądź równy 2 [125, 142].

4.2.5. Aktywność mutagenna AM [127]

Względny współczynnik aktywności mutagennej AM oznacza aktywność mutageną indukowaną przez określoną, zależną od rodzaju próby objętość - dla wody jest to 1 dm³. AM/dm³ jest to iloraz różnicy liczby rewertantów w 1 dm³ badanej próby wody, czyli mutagenności M wyrażonej jako lr/dm^3 i liczby rewertantów w kontroli negatywnej (lr_{neg}) do liczby rewertantów w kontroli negatywnej (lr_{neg}), czyli

$$AM = \frac{lr / dm^3 - lr_{neg}}{lr_{neg}}$$

W oparciu o parametry równania wyrażonego funkcją $y = \beta_0 * x + \beta_1$ oblicza się przewidywaną liczbę kolonii rewertantów indukowanych przez 1 dm³ (lr/dm^3) badanej próbki wody. W równaniu tym y - określa oczekiwaną liczbę rewertantów *Salmonella typhimurium* (czyli wartość M), x - to badana objętość próbki wody natomiast β_1 - to liczba rewertantów szczepu testowego w kontroli negatywnej. Ocenę dopasowania otrzymanych wyników do założonego modelu liniowej zależności dawka-odpowiedź według Mielżyński [127] można przeprowadzić metodą najmniejszych kwadratów, wykorzystując analizę regresji oraz analizę wariancji. A do wyboru dawek, dla których otrzymane wyniki liczby rewertantów na płytkę mają charakter liniowy służy metoda odrzucania kolejnych dawek (point rejection).

Efekt mutageny badanej próby klasyfikuje się według następujących kryteriów: próba jest mutagenna jeśli $AM \geq 2$, nie mutagenna gdy $AM \leq 2$ i słabo mutagenna jeśli AM znajduje się w przedziale między wartością 1 a 2.

4.2.6. Mutagenność M

Mutagenność wody M – określana jest jako ilość rewertantów szczepu *S. typhimurium* indukowana przez mikrozanieczyszczenia znajdujące się w 1 dm³ badanej próbki wody. Mutagenność M – to jest ten sam parametr jaki wykorzystywany jest przy określaniu aktywności mutagennej (AM) i oznaczany tam jako lr/dm^3 (oczekiwana liczba rewertantów *Salmonella typhimurium*). Sposób otrzymania tej wartości opisany został w punkcie powyżej. W metodyce tej został podany bardzo uproszczony sposób uzyskiwania tej wartości. Otrzymanie tej wartości jest znacznie bardziej skomplikowane i nie jest tak jednoznaczne jak zostało to podane przy obliczaniu aktywności mutagennej AM.

W pierwszej fazie analiz mutagenności wody do picia, jako liczba rewertantów w 1 dm³ (M), należy określić czy do analiz będą brane wszystkie dane tworzące krzywą zależności dawka-odpowiedź, czy też tylko początkowa część tej krzywej – odcinek liniowy. Według niektórych autorów, do analizy wyników uzyskanych testem Ames, należy brać wszystkie punkty tworzące krzywą. Inni biorą pod uwagę początkową liniową część krzywej i ograniczają obliczenie mutagenności M wyłącznie do małych dawek (niskich zateżeń/stężeń) badanej próbki [134, 135]. Kolejną sprawą jest rozkład danych i zastosowanie funkcji regresji. Jeśli dane mają rozkład normalny wtedy funkcja regresji jest zawsze liniowa i wyraża się wzorem $\beta_0 + \beta_1 * d$, w przypadku gdy dane takiego rozkładu nie mają, a tak bardzo często wyglądają wyniki uzyskane testem Ames, wtedy funkcja regresji nie musi być prostoliniowa. Jednak jeśli do obliczeń mutagenności M jako liczba rewertantów w 1 dm³ wykorzystywana jest metoda Bernstein [134] wtedy niezależnie jaki rozkład mają dane uzyskane testem *Salmonella* funkcja regresji będzie liniowa.

4.3. Korelacja [132, 133]

Jako miara współzależności pomiędzy dwiema lub większą liczbą zmiennych stosowana jest korelacja. Jest to scharakteryzowana tendencja do tego, aby przyrostowi jednej cechy zmiennej towarzyszył przyrost lub ubytek drugiej. W teorii prawdopodobieństwa i statystyce matematycznej jest to zależność liniowa zmiennych losowych. Korelację charakteryzuje współczynnik korelacji oznaczany jako R, który jest liczbą określającą w jakim stopniu zmienne są współzależne i jest miarą korelacji dwu (lub więcej) zmiennych. Współczynniki korelacji mogą przyjmować wartości z zakresu od -1 do +1. W zależności od charakteru danych istnieje kilka sposobów obliczania współczynników korelacji np. dla zmiennych nie wykazujących rozkładu normalnego obliczany jest współczynnik korelacji Spearmana, Tau

Kendalla i Gamma a dla zmiennych o rozkładzie normalnym-współczynnik Pearsona. Dlatego też przed obliczeniem współczynników korelacji dokonywana jest ocena rozkładu zmiennych.

4.4. Regresja wieloraka [143, 144]

Z matematycznego punktu widzenia, regresja jest dowolną metodą statystyczną pozwalającą estymować warunkową wartość oczekiwaną zmiennej losowej, zwanej zmienną objaśnianą, dla zadanych wartości innej zmiennej lub wektora zmiennych losowych (tzw. zmiennych objaśniających).

W praktyce użycie regresji sprowadza się do konstruowania modelu i stosowania go do przewidywania nieznanych wartości zmiennej objaśnianej na podstawie znanych wartości zmiennych objaśniających. W fazie pierwszej ma miejsce budowa modelu regresyjnego, czyli funkcji opisującej, jak zależy wartość oczekiwana zmiennej objaśnianej od zmiennych objaśniających. Funkcja ta może być zadana nie tylko czystym wzorem matematycznym, ale także całym algorytmem, np. w postaci sieci neuronowej czy drzewa regresyjnego. Model konstruowany jest tak, aby jak najlepiej pasował do danych z próby, zawierającej zarówno zmienne objaśniające, jak i objaśniane (tzw. zbiór uczący). W fazie drugiej tzw. stosowania modelu – używa się wyliczonego modelu do danych, w których znane są tylko zmienne objaśniające, w celu wyznaczenia wartości oczekiwanej zmiennej objaśnianej.

W modelach parametrycznych ogólna postać modelu jest założona z góry, a celem procedury regresji jest tylko takie dobranie wartości występujących w nim parametrów, aby powstała funkcja możliwie dobrze odpowiadająca próbie uczącej. Zwykle stosowane są tzw. globalne modele parametryczne, gdzie wartości współczynników są takie same dla dowolnych wartości zmiennych objaśniających, a najpopularniejsze modele parametryczne to regresja liniowa i nieliniowa, modele z interakcjami, uogólnione modele liniowe (GLM) oraz regresja logistyczna. Alternatywną koncepcją regresji parametrycznej jest regresja nieparametryczna. Metody regresji nieparametrycznej nie zakładają, że estymowana funkcja f jest znana z dokładnością do skończenia wielu estymowanych parametrów. Tym samym są często bardziej elastyczne w poszukiwaniu rozwiązań. Z drugiej strony w regresji parametrycznej o wiele prostszy jest matematyczny opis modelu, co pozwala na przykład na łatwe wyznaczanie przedziałów ufności prognozowanej wartości.

Regresja w której występuje więcej niż jedna zmienna objaśniająca zwana jest regresją wieloraką (ang. *multiple regression*) lub wielowymiarową ale istota regresji w obu przypadkach jest taka sama.

W naukach społecznych, przyrodniczych i ekonomicznych analiza regresji jest szeroko stosowana jako narzędzie badawcze pozwalające określić charakter danego zjawiska. W pewnych sytuacjach stworzony model służy do dokonania prognozy (predykcji) wartości zmiennej zależnej dla nowych obiektów lub kolejnych okresów czasowych. Ogólny problem obliczeniowy, jaki należy rozwiązać w analizie regresji wielorakiej, polega na dopasowaniu funkcji do zbioru punktów.

W klasycznej analizie regresji wielokrotnej model ma postać:

$$Y = \beta_0 + x_1\beta_1 + x_2\beta_2 + \dots + x_n\beta_n + \varepsilon$$

Parametr β_0 interpretowany jest jako poziom zmiennej objaśnianej Y, gdy wszystkie zmienne objaśniające przyjmują wartość 0. Wzrost wartości zmiennej objaśniającej x_i o jednostkę powoduje zmianę wielkości zmiennej zależnej o β_i jednostek, przy założeniu, że pozostałe zmienne niezależne zachowują stałe wartości. Algorytmem obliczania współczynników modelu w przypadku wariancji jako miary błędu jest metoda najmniejszych kwadratów, natomiast dla innych miar np. metoda największej wiarygodności. Chociaż natura modelu podlegającego analizie musi być liniowa to za pomocą formuł można wprowadzać także bardziej skomplikowane typy modeli: np.: model kwadratowy, wielomianowy, hiperboliczny lub zastosowany w fińskim modelu do przewidywania mutagenności wody do picia-model wykładniczy. W tym celu należy dodać nową zmienną i nadać jej wartości według interesującej nas formuły – czyli należy sprowadzić model nieliniowy do liniowego.

5. Fiński model przewidywania mutagenności wody do picia

Jedną z trudności występujących w badaniach epidemiologicznych dotyczących spożywania chlorowanej wody do picia jest jak trafnie oszacować narażenie populacji ludzkiej na zawarte w niej substancje. Najczęściej narażenie jest szacowane na podstawie tego, czy ujmowana woda na cele wodociągowe była poddana procesowi chlorowania czy też nie, oraz na podstawie typu wody ujmowanej - powierzchniowa czy gruntowa. Takie podejście nie uwzględnia jednak wszystkich różnorodności typów ujmowanych wód oraz stężeń ubocznych, chlorowych produktów powstających podczas ich dezynfekcji [145, 146]. Z kolei ilościową ocenę ekspozycji opiera się na poziomie stężenia chloroformu i całkowitego stężenia trihalometanów obecnych w badanej wodzie [147]. Jednakże trihalometany stanowią mniej niż 40 % organicznych halogenopochodnych obecnych w wodzie do picia [148]. Metody te nie uwzględniają, więc dużej ilości innych chlorowych produktów dezynfekcji mających ogromne znaczenie epidemiologiczne [145, 146].

Badania epidemiologiczne, prowadzone w Finlandii od połowy lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku [64, 93-96] dowiodły związku pomiędzy aktywnością mutageną chlorowanej wody do picia a przypadkami zachorowań ludzi na pewne odmiany choroby nowotworowej, zwłaszcza raka nerek pęcherza i krwi. Badania te uwzględniały narażenie ludzi w dłuższym okresie czasu i oparte były o dane epidemiologiczne oraz o model rozwinięty przez Vartiainena [21], w którym posłużono się również historycznymi informacjami dotyczącymi jakości wody i parametrów jej uzdatniania w badanym okresie czasu.

Koivusalo i in. [93, 95, 96], uwzględniając narażenie ludzi w dłuższym okresie, oszacowali poziom ekspozycji na poszczególne klasy chlorowych produktów dezynfekcji, niebranych pod uwagę w innych metodach badawczych. Jednakże badania fińskie nie zawierały informacji dotyczącej wpływu wszystkich możliwych produktów ubocznych dezynfekcji, dostarczały bowiem małą ilość informacji na temat ekspozycji na nietlone chlorowe produkty (do tej grupy należy silnie kancerogeny czynnik MX) [149], oraz nic nie mówiły na temat wpływu pH podczas procesu chlorowania wody na jej aktywność mutageną [21, 150]. Mimo wszystko przydatność modelu na gruncie fińskim okazała się tak duża, że powinien on zostać zastosowany w praktyce w innych rejonach geograficznych świata [147].

Model Vartiainena oparty został o badania prób wody do picia pochodzącej z 39 zakładów zlokalizowanych na terenie Finlandii różniących się sposobem jej ujmowania i uzdatniania. W sumie przebadano około 100 prób wody. Mutagenność wody z jednej strony oceniana była na podstawie testu Ames, a z drugiej strony wyliczana była na podstawie parametrów uzdatnianej wody do picia.

Test Ames był wykonywany według standardowej procedury, przy użyciu szczepów testowych *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98 i TA 97, bez aktywacji metabolicznej. Woda do testu w ilości 4,0 dm³ o pH 2 zatężana była na żywicy Amberlite XAD 8 o objętości 50 cm³, z prędkością przepływu przez złożę 0,67 cm³ na minutę. Ekstrakcję związków organicznych ze złoża prowadzono 300 cm³ octanu etylu. Po odparowaniu, próby rozpuszczano w DMSO, rozcieńczano i wprowadzano do testu. Dla każdej próby na podstawie zależności dawka-odpowiedź, obliczano jej mutagenność w postaci ilości rewertantów indukowanych przez 1 dm³ wody. Ocenę dopasowania otrzymanych wyników do założonego modelu liniowej zależności dawka-odpowiedź przeprowadzano metodą najmniejszych kwadratów, wykorzystując analizę regresji liniowej.

W trakcie badań określano także liniową korelację pomiędzy mutagennością, badanej testem Ames, wody a zawartością w niej ogólnego węgla organicznego – OWO

(współczynnik korelacji $r=0,478$; $p<0,001$), chemicznym zapotrzebowaniem na tlen – ChZT (współczynnik korelacji $r=0,495$; $p<0,001$) i barwą (współczynnik korelacji $r=0,465$; $p<0,001$). Badano również wpływ na mutagenność wody, jej odczynu, obecność amoniaku i THM-ów oraz stosowania innych niż chlor dezynfektantów.

Badania wykazały wyraźną zależność pomiędzy zawartością substancji organicznych w wodzie, dawką chloru i stężeniem amoniaku a jej mutagennością badaną przy użyciu szczepu testowego *Salmonella typhimurium* TA 100 bez aktywacji metabolicznej. Zaobserwowano jednocześnie niską korelację pomiędzy zawartością substancji organicznych w wodzie a jej mutagennością badaną przy użyciu szczepów testowych *Salmonella typhimurium* TA 98 i TA 97.

Opracowany dla warunków fińskich model do prognozowania potencjalnych właściwości mutagennych wody do picia dezynfekowanej chlorem, przed zastosowaniem w innych krajach powinien być zweryfikowany. W przypadku badań przeprowadzonych w USA [151] okazało się, że ustalona empirycznie, z zastosowaniem testu Ames, potencjalna mutagenność wody była wyższa od mutagenności prognozowanej modelem. Dlatego też podjęto próbę weryfikacji tego modelu w warunkach polskich.

Matematyczny model Vartiainen [22] przewiduje mutagenność uzdatnianej wody powierzchniowej dezynfekowanej chlorem, określonej w teście Ames przy użyciu szczepu testowego TA 100 bez aktywacji metabolicznej, w oparciu o podstawowe parametry jakości wody i parametry jej uzdatniania. W tym modelu mutagenność jest funkcją stężenia ogólnego węgla organicznego (OWO) zawartego w wodzie, dawki chloru i w mniejszym stopniu stężenia amoniaku.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania modelu Vartiainena do szybkiego określania bezpieczeństwa zdrowotnego (jakości zdrowotnej) wody do picia zawierającej mikrozanieczyszczenia powstające w wyniku jej dezynfekcji chlorem, tzw. uboczne produkty chlorowania wody (UPCh). Model w oparciu o wartości trzech podstawowych parametrów chemicznych wody: ogólnego węgla organicznego (OWO), azotu amonowego i dawki chloru miałby oszacowywać, czy ilość powstających chloropochodnych, będzie wykazywała potencjalną aktywność mutagenną i w związku z tym, czy podawana do sieci wodociągowej woda będzie stwarzać zagrożenie zdrowia konsumentów.

Na cel główny składały się następujące cele jednostkowe:

- 1) Wybór optymalnego zestawu żywic Amberlite wraz z konstrukcją stacji do zateżniania i ekstrakcji próbek wody.
- 2) Ustalenie w badaniach modelowych wpływu zawartości OWO pochodzącego z obecności humusów naturalnych i stężenia azotu amonowego na aktywność mutagenną powstających w rezultacie dezynfekcji pochodnych chlorowych.
- 3) Ocena metodą testu Ames jakości zdrowotnej wrocławskiej wody wodociągowej w cyklu rocznym.
- 4) Wstępna propozycja sposobu przedstawiania i obliczania wyników uzyskanych testem Ames
- 5) Zaproponowanie wstępnego modelu prognozowania mutagenności wody do picia dla warunków polskich.

TEZA

Jeżeli po procesie dezynfekcji wody chlorem powstają produkty uboczne charakteryzujące się aktywnością mutagenną wykazaną testem Ames to istnieje w warunkach polskich możliwość prognozowania jej a priori na podstawie zawartości ogólnego węgla organicznego i jonów amonowych i dawki chloru modelem Vartiainena.

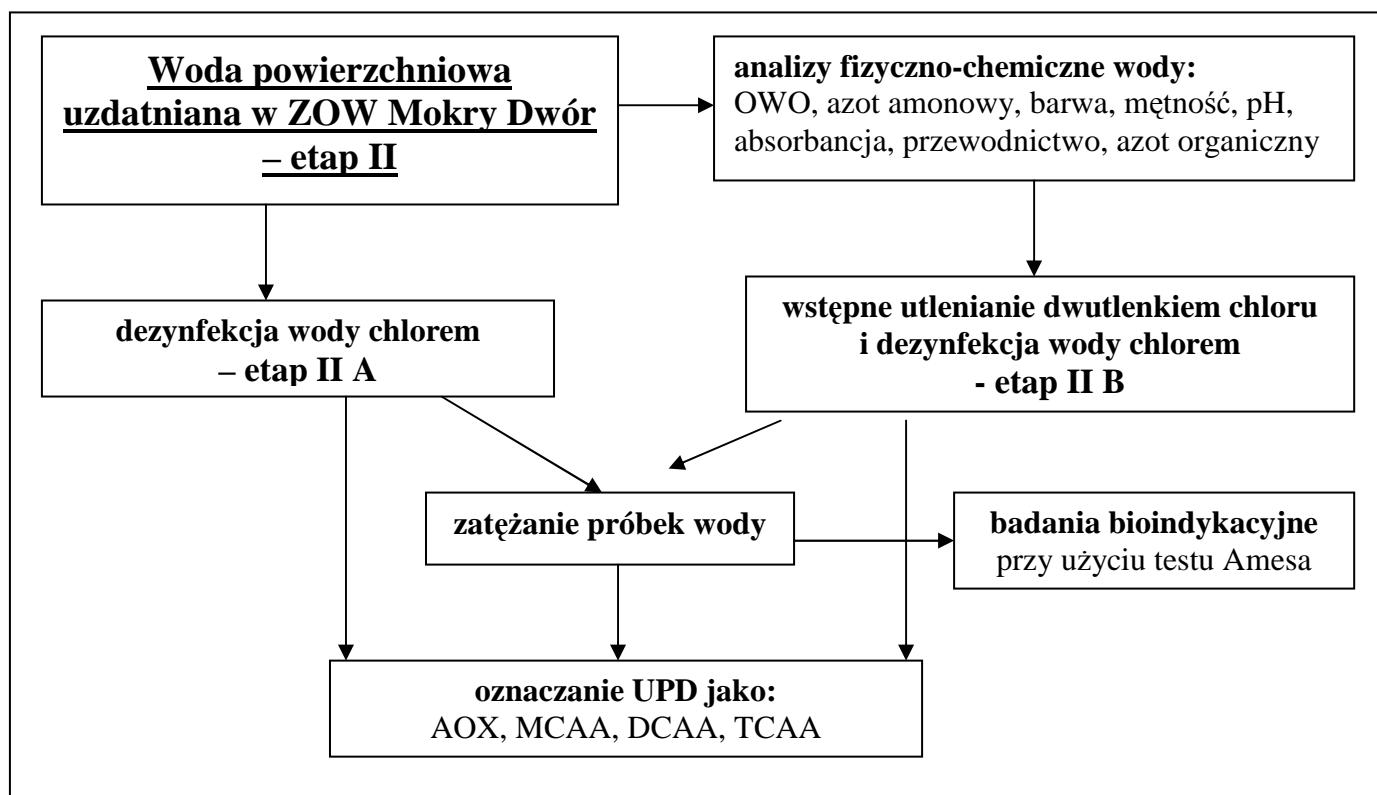
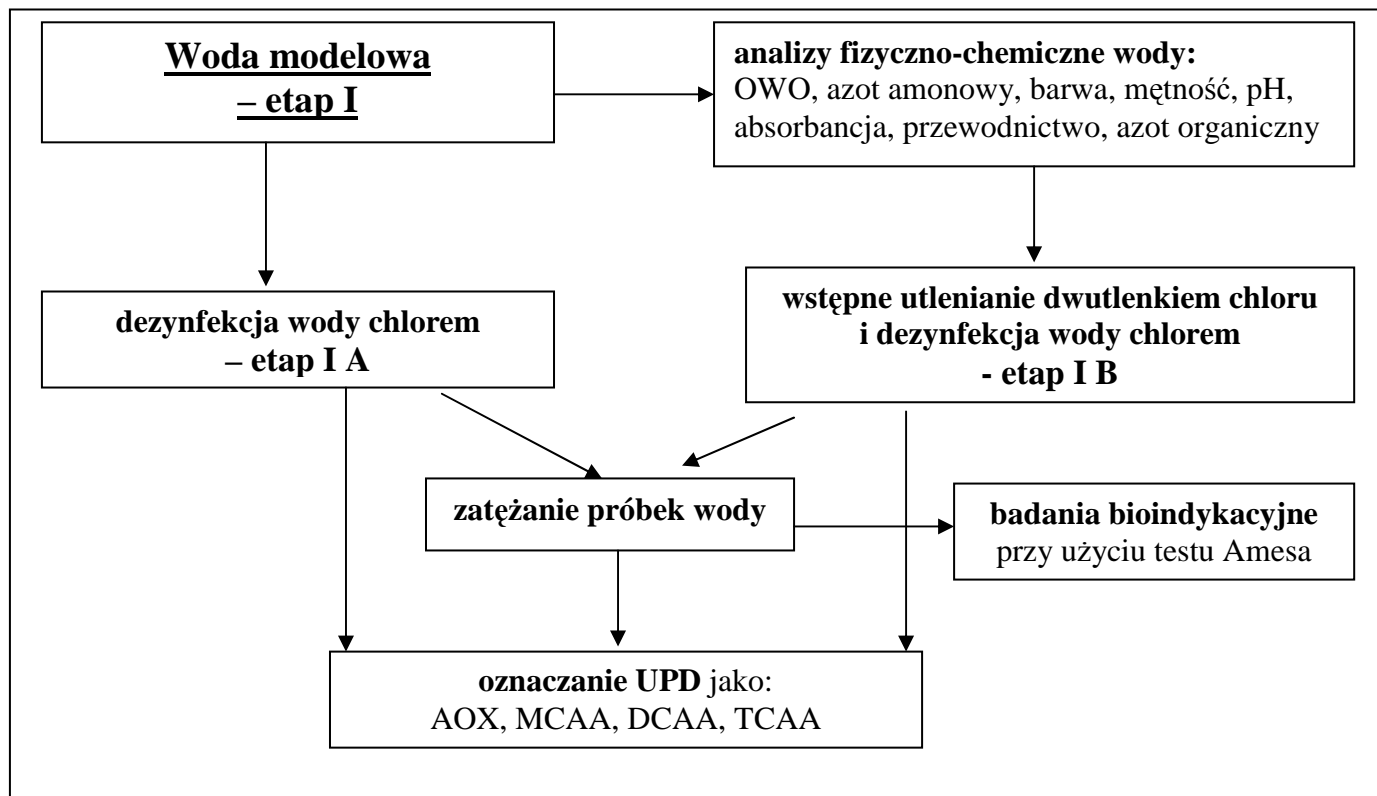
Badania prowadzono w dwóch niezależnych wariantach:

- 1 – z wykorzystaniem wody modelowej,
 - 2 – na rzeczywistej uzdatnionej wodzie powierzchniowej,
- zgodnie z założonym schematem – przedstawionym poniżej.

II CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Materiały i metody

Badania prowadzono zgodnie ze schematem badań podanym niżej:



1.1. Przygotowanie próbek wody do badań

Etap I - Wodę do badań modelowych przygotowano z:

- wody wodociągowej filtrowanej przez złożę z węgla aktywnego WD-extra z prędkością 5m/h;
- i wody WTB bogatej w naturalne związki humusowe. Po przewiezieniu do laboratorium wodę pozostawiono na 2 tygodnie, aby jej skład uległ stabilizacji w rezultacie zsedimentowania dużych agregatów humusowych, a następnie lewarowano.

Wody mieszane były w takich proporcjach, aby zawartość węgla organicznego wynosiła odpowiednio: 2,0; 4,0; 6,0 mgC/dm³. Do wód o ustalonym OWO dodawano roztwór chlorku amonowego, tak aby stężenie azotu amonowego wynosiło: 0,1; 0,5; 1,0 mgNH₄⁺/dm³. Tak przygotowaną wodę modelową dezynfekowano w warunkach laboratoryjnych.

Etap II - Badania prowadzone były w cyklu rocznym w dwóch przedziałach czasowych: zimowo-wiosennym (październik, grudzień, styczeń, luty i marzec) i letnio-jesiennym (kwiecień, maj, czerwiec, lipiec i sierpień). Wodę pobierano bezpośrednio z procesu technologicznego prowadzonego w ZOW „Mokry Dwór” we Wrocławiu. Była to woda powierzchniowa z rzeki Oławy oczyszczana w procesach koagulacji i filtracji na złożach piaskowych. Natomiast proces dezynfekcji prowadzono w warunkach laboratoryjnych.

1.2. Dezynfekcja wody

Wodę modelową i oczyszczoną wodę powierzchniową dezynfekowano w warunkach laboratoryjnych, zgodnie z krzywą zapotrzebowania wody na chlor, na dwa sposoby:

- chlorem – klasyczną metodą dezynfekcji wody - etap I A i II A badań,
- chlorem, po wcześniejszym dawkowaniu dwutlenkiem chloru w ilości 0,4 mgClO₂/dm³ – etap I B i II B badań.

Wstępne utlenianie dwutlenkiem chloru przed właściwą dezynfekcją wody chlorem zastosowano w celu zmniejszenia potencjalnej mutagenności wody do picia. Dawkę dwutlenku chloru - 0,4 mgClO₂/dm³ przyjęto na podstawie niemieckiego Rozporządzenia o jakości wody przeznaczonej na potrzeby człowieka [83] które weszło w życie 1 stycznia 2003 roku i wprowadziło jednocześnie do niemieckiego prawa Wytyczną EG-98/83 Rady Unii Europejskiej z listopada 1998 o jakości wody przeznaczonej do użytku przez człowieka [152].

Roztwór wody chlorowej uzyskiwano z podchlorynu sodu o odczynie korygowanym do pH 7. Dwutlenek chloru otrzymywano w laboratorium, w reakcji chloranu potasowego

z kwasem szczawiowym w środowisku kwaśnym. Powstający gazowy dwutlenek chloru absorbowano w wodzie destylowanej. W testach wyznaczano krzywe zapotrzebowania wody na chlor oraz na chlor zastosowaniu dwutlenku chloru [9, 30].

Zapotrzebowanie wody na chlor jest to najmniejsza dawka wolnego chloru, wyrażona w mg/dm^3 , która dodana do $1,0 \text{ dm}^3$ wody o temperaturze 293 K (20°C), po 30-minutowym kontakcie z wodą daje $0,1 \text{ mgCl}_2/\text{dm}^3$ pozostałego chloru.

Chlor dawkowano do próbek wody 30 minut po dodaniu do wody dwutlenku chloru. Chlor pozostały oznaczano po 0,5 i 16 godzinnym czasie kontaktu. Wybrany 16 godzinny czas kontaktu odpowiadał średniemu czasowi przebywania wody we wrocławskiej sieci wodociągowej.

Za dawkę normalną chloru – D – przyjęto taką największą ilość chloru, dla której po 16 godzinach kontaktu z wodą nie stwierdzono obecności chloru pozostałego. Dawka normalna chloru (D) składa się z ilości chloru potrzebnego do utworzenia i rozłożenia chloramin - D_1 oraz z ilości chloru zużytego jako chlor wolny - D_2 [30].

1.3. Metody analityczne

Metody analityczne stosowane były do badań wody modelowej i powierzchniowej po procesie jej oczyszczania, przed ich zateżnieniem.

Metody obejmowały:

- oznaczenia ogólnego węgla organicznego (OWO) przy użyciu aparatu Shimadzu TOC 5050,
- oznaczenia chloru i dwutlenku chloru metodą jodometryczną - [153],
- oznaczenia chlorowanych związków organicznych jako AOX według metody Nanocolor AOX3, Test 0-07, Macherey-Nagel,
- oznaczanie kwasów chlorooctowych (HAA) według procedury USEPA 522.2 z wykorzystaniem chromatografu gazowego Shimadzu 17 A,
- analizy fizyczno-chemiczne:
 - barwa - oznaczana kolorymetrycznie według PN-EN ISO 7887:2002 - Jakość wody. Badanie i oznaczanie barwy,
 - mętność – oznaczana według PN-79/C-04583,
 - odczyn, pH – Oznaczenie odczynu (pH) wody metodą elektrometryczną (potencjometryczną) [153, 154],
 - absorbancja w 254 nm,

- utlenialność – Oznaczanie utlenialności w środowisku kwaśnym [153, 154],
- przewodnictwo właściwe wody – [154],
- azot amonowy - [153],
- azot organiczny – [153].

W celu oznaczenia ubocznych produktów dezynfekcji wybrano absorbowalne halogenowe związki organiczne AOX, ponieważ podczas chlorowania powstają olbrzymie ich ilości oraz HAA, czyli kwasy halogenooctowe, ponieważ to druga istotna grupa związków powstających podczas chlorowania wody do picia zawierającej naturalne humusy [52, 64, 65]. Analizy związków chloroorganicznych AOX i kwasów chlorooctowych HAA, w tym kwasu mono, di- i tri- chlorooctowego wykonane były w badanych wodach przed i po procesie ich zateżenia.

1.4. Procedura uzyskiwania ekstraktów organicznych z badanych wód

1.4.1. Żywice

W celu wyodrębnienia i zateżenia związków organicznych z wód zastosowano żywice jonowymiennie Amberlite firmy Supelco:

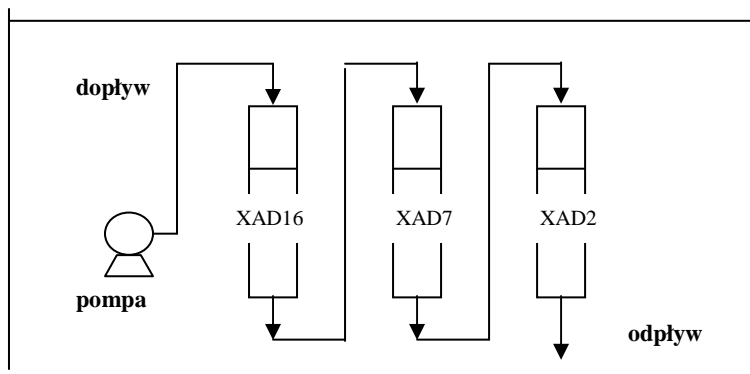
- XAD-2 o szkielecie strukturalnym poliaromatycznym adsorbującym związki hydrofobowe o masie cząsteczkowej do 20 kDa, przeznaczone do usuwania związków organicznych, surfaktantów, związków aromatycznych, fenoli, metali.
- XAD-7 o szkielecie estru akrylowego (umiarkowana polarność), przeznaczone do adsorpcji kwasów fulwowych i huminowych, jonów metali, usuwania i odzyskiwania związków organicznych o masie cząsteczkowej do 60 kDa,
- XAD-16 o szkielecie strukturalnym poliaromatycznym, przeznaczone do separacji dużych cząstek organicznych (zwłaszcza protein), związków hydrofobowych o masie cząsteczkowej do 40 kDa (antybiotyki, surfaktanty).

1.4.2. Procedura zateżenia i ekstrakcji związków organicznych z wód

W celu wyodrębniania, a następnie zateżenia związków organicznych z wód wykorzystano metodę ekstrakcji do fazy stałej (Solid Phase Ekstraktion-SPE) z zastosowaniem żywic Amberlite XAD.

Zateżanie próbek wody prowadzono, w układzie szeregowym o wyznaczonej doświadczalnie kolejności żywic: XAD-16, XAD-7, XAD-2 [30].

Procedurę zateżenia i ekstrakcji związków organicznych zawartych w wodach ustalono podczas wcześniejszych badań (Rys. 6).



Rysunek 6. Schemat układu do zateżenia i ekstrakcji próbek wody z zaznaczoną kolejnością żywic

Przed rozpoczęciem zateżenia próbek wody żywice oczyszczane były, w ośmiogodzinnych cyklach ekstrakcji w aparacie Soxhleta, kolejno: octanem etylu, acetonem i metanolem (czda, Merck), w ilości po 150 cm³ każdy, a następnie przechowywane w metanolu.

Stacja zateżenia i ekstrakcji badanych próbek wody składała się z dwóch równoległych zestawów szklanych kolumn zasilanych dwoma pompami perystaltycznymi Masterflex L/S Cole-Palmer Instr. Company.



Zdjęcie 1. Stacja zateżenia i ekstrakcji badanych próbek wody

Oczyszczone żywice umieszczano pojedynczo w kolumnach szklanych o wysokości 50 cm i średnicy 1,5 cm i starannie, porcjowo wmywano z nich alkohol metylowy wodą destylowaną. Wielkość złoża o wysokości 6,0 cm wynosiła 9,0 cm³.

Próbkę badanej wody zakwaszano przy użyciu HCl (cz.d.a., Merck) do pH 2±0,2 a następnie filtrowano przez kolumny adsorpcyjne z prędkością przepływu 15 objętości złoża/h. We wszystkich testach przez zestaw kolumn filtrowano próbkę wody o objętość 10 dm³.

Po zakończeniu adsorpcji żywice suszono powietrzem i ekstrahowano 150 cm³ rozpuszczalnika organicznego - acetonu. Eluenty sączono przez sączonek bibułowy z warstwą bezwodnego siarczanu sodowego w celu usunięcia resztek wody, łączono a następnie odparowywano do sucha w wyparce próżniowej w temperaturze 40⁰C.

Ekstrakt z pierwszego zestawu służył do badań testem Ames, z drugiego - do oznaczeń fizyczno-chemicznych.

Do badań testem *Salmonella* suchą pozostałość ekstraktów acetonowych rozpuszczano w 5,0 cm³ DMSO przy pomocy łaźni ultradźwiękowej. W ten sposób uzyskiwano próbę wyjściową o zateżeniu 2 000 x - co oznaczało, że w 0,1 cm³ próby wprowadzonej do testu Ames zawarte były zanieczyszczenia organiczne pochodzące z 200 cm³ badanej wody. Następnie z próby wyjściowej, uzyskiwano przez rozcieńczenie jej w DMSO w różnych proporcjach, próbki wody o zateżeniach od 100 do 1 000 x (tj.: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 x) co odpowiadało objętości badanych wód od 10 do 100 cm³.

Zarówno w przypadku wód modelowych jak i wód pochodzących z ZOW Mokry Dwór do badań bioindykacyjnych brane były próbki wody zateżonej zakresie od 100 do 1 000x.

1.5. Badania bioindykacyjne – Test Ames

Ocenę mutagennego działania frakcji organicznej ekstrahowanej z próbek wody przeprowadzono za pomocą testu Ames, z użyciem szczepów *Salmonella typhimurium*:

- TA100 – I etap badań,
- TA98 i TA100 – etap II.

Do badań przesiewowych zaleca się cztery szczepy *Salmonella typhimurium*: TA97, TA98, TA100 i TA102, ze względu na ich wrażliwość na szerokie spektrum mutagenów. W pracy zastosowano dwa z nich - TA98 i TA100, ponieważ są najbardziej czułe na zanieczyszczenia wody [12, 155]. Poza tym uzyskano wysoką korelację pomiędzy

mutagennością M obserwowaną w teście Amesa podczas badań prowadzonych przez Vartiainenę właśnie przy użyciu szczepu TA100 bez aktywacji metabolicznej a mutagennością M przewidywaną modelem do przewidywania potencjalnej mutagenności wody do picia [21].

Liczba kolonii rewertantów spontanicznych szczepów *Salmonella typhimurium* powinna mieścić się w zakresie podanym w piśmiennictwie [120, 121], lub powinna być porównywalna z wynikami uzyskanymi w danym laboratorium przez dłuższy czas [5] a kontrolne związki mutagenne powinny mieć strukturę chemiczną zbliżoną do badanych związków. Liczbę rewertantów spontanicznych i indukowanych dla TA98 i TA100 w badaniach prowadzonych bez i z zastosowaniem frakcji S9-mix zamieszczono poniżej:

Szczep	LR spontanicznych		LR indukowanych (pozytywnych)	
	- S9 – mix	+ S9 - mix	- S9 – mix	+ S9 - mix
TA98	22-36	26-42	3242-4552 dla 2,4,7-TNFon	1645-2886 dla 2-AF
TA100	98-179	121-194	962-1616 dla NQNO	848-869 dla 2-AF

Szczepy *Salmonella typhimurium* TA98 i TA100 zostały zakupione w Stanach Zjednoczonych (San Diego) w firmie Discovery Partners International.

Każdy test wykonywany był w kombinacji z frakcją i bez frakcji mikrosomalnej, pozwoliło to na ocenę potencjalnych właściwości mutagennych mikrozanieczyszczeń wody zarówno o charakterze mutagenów jak i promutagenów [113, 120, 121].

1.5.1. Podłoża stosowane w teście Ames

Zgodnie z procedurą testu Ames w badaniach aktywności mutagennej próbek stosowano:

- a) podłoże testowe Vogel-Bonner z minimalną ilością glukozy

Agar bacteriological (Agar No. 1) – Oxoid	15 g
Woda destylowana	930 cm ³
<u>50XVB sole:</u>	20 cm ³
MgSO ₄ *7H ₂ O	– 10 g/dm ³
K ₂ HPO ₄	– 500 g/dm ³
(1-wodny kwas cytrynowy)	– 100 g/dm ³
NaH ₂ NH ₄ PO ₄ *4H ₂ O	– 175 g/dm ³
40 % glukoza	50 cm ³

b) top agar

Agar bacteriological (Agar No. 1) – Oxoid	6 g
NaCl	5 g
Woda destylowana	1000 cm ³

c) 0,5 mM roztwór histydyny i biotyny

D- Biotyna (F.W. 247,3)	30,9 mg
L- Histydyna*HCl (F.W. 191,6)	24,0 mg
Woda destylowana	250 cm ³

d) 0,2 M sodowo-fosforanowy bufor o pH 7,4

0,2 M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O – 13,8 g/500 cm ³ wody destylowanej	60 cm ³
0,2 M Na ₂ HPO ₄ – 14,2 g/500 cm ³ wody destylowanej	440 cm ³

e) frakcja S9-mix - standardowa

0,2 M NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O – 13,8 g/500 cm ³ wody	60 cm ³
0,2 M Na ₂ HPO ₄ – 14,2 g/500 cm ³	440 cm ³

W celu sprawdzenia cech genetycznych szczepów testowych stosowano:

a) podłoże do sprawdzania testowanych szczepów LT₂ na obecność mutacji his- (Master plates dla szczepów nie posiadających czynnika R)

Agar bacteriological (Agar No. 1) – Oxoid	15 g
Woda destylowana	930 cm ³
50XVB sole:	20 cm ³
40 % glukoza	50 cm ³
0,1 M sterylny roztwór wodny L-Histydyny	0,1 cm ³ /płytkę
0,5 mM sterylny roztwór wodny biotyny	0,1 cm ³ /płytkę

b) podłoże do sprawdzanie testowanych szczepów na obecność plazmidów. Master plates dla rutynowego sprawdzania obecności u szczepów czynnika oporności na ampicylinę (wrażliwości szczepów na antybiotyk)

Agar bacteriological (Agar No. 1) – Oxoid	15 g
Woda destylowana	930 cm ³
50XVB sole:	20 cm ³
40 % glukoza	50 cm ³
0,1 M sterylny roztwór wodny L-Histydyny	0,1 cm ³ /płytkę
0,5 mM sterylny roztwór wodny biotyny	0,1 cm ³ /płytkę
sterylny roztwór ampicyliny – 8 mg/cm ³ 0,02 N NaOH	0,1 cm ³ /płytkę

c) podłoże do sprawdzenia testowanych szczepów na obecność $\Delta uvrB$ mutacji (wrażliwości na promieniowanie UV)

Nutrient broth (No. 2) – Oxoid	25 g
Agar bacteriological (Agar No. 1) – Oxoid	15 g
Woda destylowana	1000 cm ³

d) podłoże do sprawdzenia testowanych szczepów na obecność *rfa* mutacji (wrażliwości na fiolet krystaliczny)

Nutrient broth (No. 2) – Oxoid	25 g
Agar bacteriological (Agar No. 1) – Oxoid	15 g
Woda destylowana	1000 cm ³
0,1 % wodny roztwór fioletu krystalicznego – nie sterylizowany, przetrzymywany oddzielnie	,,, /krażek bibułowy

1.5.2. Przygotowanie frakcji

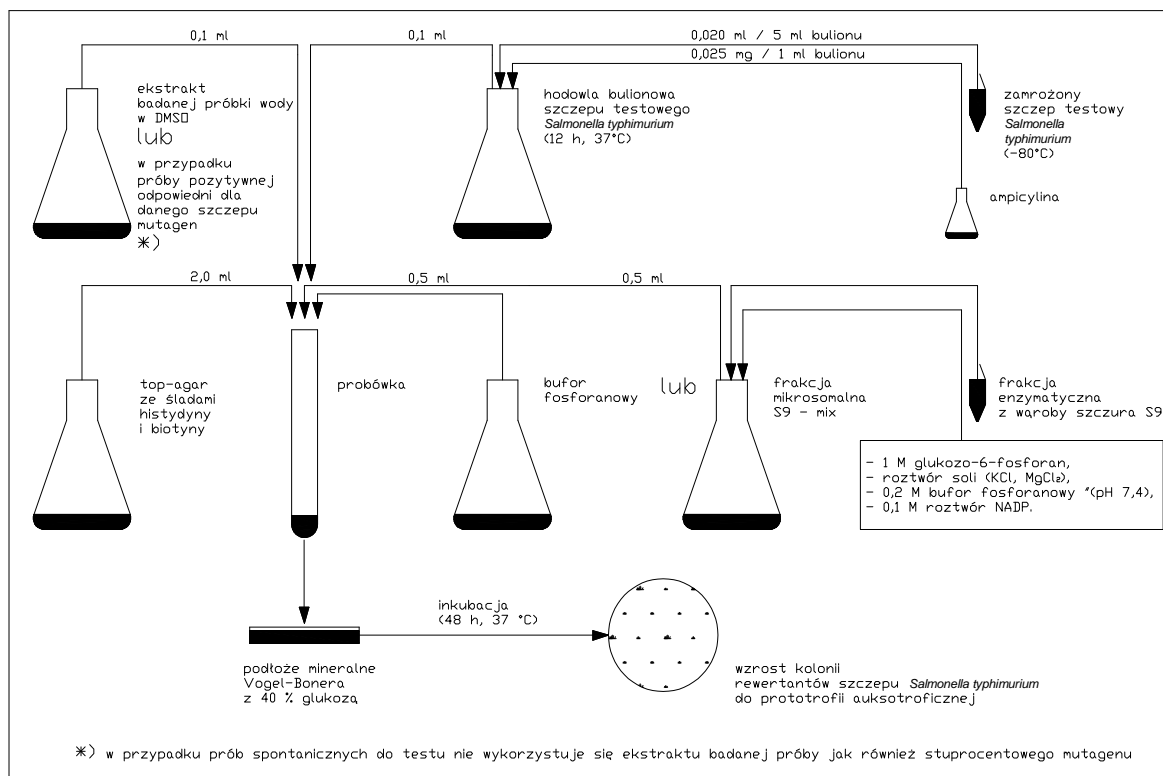
Związki szkodliwe w organizmach ssaków ulegają biotransformacji lub wielokierunkowym przemianom oksydoredukcyjnym w wyniku czego obniża się ich aktywność metaboliczna. Czasami w wyniku biotransformacji, której celem jest detoksykacja część związków chemicznych może ulec przemianom w formy aktywne, które mogą wchodzić w reakcje z materiałem genetycznym. Za tego typu przekształcenia związków szkodliwych odpowiedzialny jest układ cytochromalny, zawierający cytochrom P-450 obecny we frakcji mikrosomalnej narządów ssaków (gł. wątroba, nerki). Dlatego też w testach genotoksyczności jest stosowany aktywator – frakcja S-9 [113].

Stosowana w badaniach frakcja pochodziła z komórek wątroby szczurów rasy Vistar indukowanych Aroclorem 1254.

1.5.3. Procedura testu Ames [4, 5, 120, 121]

Procedurę testu Amesa przedstawiono na Rys. 7. W celu namnożenia odpowiedniej liczności bakterii w inoculum ($1 \cdot 10^8$ komórek/ $0,1 \text{ cm}^3$) bulion Oxoid zaszczipiano zamrożoną hodowlą szczepów testowych *S. typhimurium* i inkubowano przez 12h w temperaturze 37°C . Do sterylnej probówki wlewano – w przypadku badań bez frakcji $0,5 \text{ cm}^3$ 0,2M buforu fosforanowego o pH 7,4, lub $0,5 \text{ cm}^3$ frakcji S9-mix – w przypadku badań z frakcją, następnie dodawano $0,1 \text{ cm}^3$ badanej próbki rozpuszczonej w DMSO oraz $0,1 \text{ cm}^3$ bulionowej hodowli szczepu *S. typhimurium*. Następnie do probówki dodawano $2,0 \text{ cm}^3$ top-agaru o temperaturze 45°C ze śladowymi ilościami histydyny i biotyny. Zawartość probówki po wymieszaniu wylewano na powierzchnię szalki Petriego z wcześniej (24-72h) wylanym podłożem minimalnym Vogel-Bonnera, czyli na agar minimalny z solami mineralnymi i glukozą). Po 48 godzinach inkubacji liczone wyrosłe kolonie.

Każde zateżenie próbki wody badane było w 3-5 powtórzeniach. Przed przystąpieniem do właściwych badań, sprawdzano każdorazowo markery genetyczne szczepów testowych, stopień ich spontanicznej rewersji oraz ich odpowiedź na wzorcowe mutageny.



Rysunek 7. Schemat testu Amesa

1.6. Metody przedstawiania i analizy wyników testu Amesa

Wszystkie analizy statystyczne zostały wykonane za pomocą pakietu statystycznego *Statistica 7.1*, udostępnionego przez Instytut Matematyki i Informatyki Politechniki Wrocławskiej w celu wykorzystania w działalności badawczej.

1.6.1. Opisywanie danych wyników własnych

Do opisanie uzyskanych testem Amesa wyników zastosowano podstawową statystykę opisową. Wyznaczono wartości średnie, medianę, odchylenie standardowe, rangę oraz wartości minimalne, maksymalne i współczynnik zmienności (CV).

Miary położenia, z których najważniejszą jest średnia arytmetyczna oraz mediana, charakteryzują średni lub typowy poziom wartości danej cechy, wokół których skupiają się wszystkie pozostałe wartości analizowanej cechy. Zależność pomiędzy wartością średnią a medianą pozwala nam na stwierdzenie, czy rozkład jest symetryczny (wartość mediany bliska wartości średniej), lewostronnie asymetryczny (wartość mediany większa od wartości średniej) lub prawostronnie asymetryczny (wartość mediany mniejsza od wartości średniej).

Odchylenie standardowe jest to pierwiastek kwadratowy z wariancji. Stanowi miarę zróżnicowania o mianie zgodnym z mianem badanej cechy i określa przeciętne zróżnicowanie poszczególnych wartości cechy od średniej arytmetycznej. Natomiast rozstęp (ranga) jest to różnica pomiędzy wartością maksymalną a minimalną cechy i jest miarą charakteryzującą empiryczny obszar zmienności badanej cechy (nie daje on jednak informacji o zróżnicowaniu poszczególnych wartości cechy w zbiorowości). Współczynnik zmienności - jest ilorazem bezwzględnej miary zmienności cechy i średniej wartości tej cechy (np. odchylenie standardowe do wartości średniej), jest wielkością niemianowaną, najczęściej podawaną w procentach. Współczynnik zmienności stosuje się w porównaniach zróżnicowania kilku próbek pod względem tej samej cechy.

1.6.2. Rozkład prawdopodobieństwa rezultatów testów Amesa

Dane z testu Amesa mogą mieć rozkład normalny, Poissona lub uogólniony rozkład Poissona (GP1, GP2). Czasami żaden z zaproponowanych w literaturze rozkładów nie ma zastosowania do uzyskanych wyników, dlatego też w pracy ograniczono się do analizy założenia o rozkładzie normalnym danych. Założenie o rozkładzie normalnym danych zweryfikowano za pomocą testów normalności: Shapiro-Wilka, Lillieforsa oraz Kołmogorowa-Smirnowa. W przypadku powyższych testów, jeśli obserwowana wartość p jest większa od poziomu istotności $\alpha = 0,05$ wtedy można wnioskować, że nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy o tym, że dane pochodzą z populacji o rozkładzie normalnym. Jeśli natomiast wartość p jest mniejsza od poziomu istotności $\alpha = 0,05$, wówczas na poziomie istotności 0,05 należy odrzucić hipotezę o normalności rozkładu danych.

1.6.3. Charakter krzywej zależności dawka-odpowieź wyników testów Amesa

Uzyskane testem Amesa wyniki przedstawiono w postaci krzywej zależności dawka-odpowieź wykorzystując wykresy ramka-wąsy, które obrazują wartość średnią (środkowy punkt), błąd względny (szerokość „pudełka”) oraz odchylenia standardowego SD (szerokość „wąsów”). Błąd względny, oznaczany zazwyczaj jako SE, to pierwiastek z wariancji podzielonej przez liczebność próbki.

1.6.4. Obliczanie współczynnika mutagenności (MR)

Współczynnik mutagenności MR obliczany jest według poniższego równania [126]:

$$MR_i = \frac{\bar{l}r}{\bar{l}s}, \text{ gdzie:}$$

- $\bar{l}r$ – średnia liczba rewertantów szczepu testowego *S. typhimurium* indukowanych przez czynniki mutagenne zawarte w dawce (zateżeniu/stężeniu) d i osiąga wartość

opisaną wzorem:
$$\bar{l}r = \frac{1}{k} \sum_{i=k}^k l r_i,$$

- $\bar{l}s$ - średnia liczba rewertantów spontanicznych szczepu testowego *S. typhimurium*

i obliczana jest na podstawie wzoru:
$$\bar{l}s = \frac{1}{k} \sum_{i=k}^k l s_i$$

Za wynik pozytywny dla danej próbki wody uznaje się każdy przypadek, gdy współczynnik mutagenności MR jest większy bądź równy 2,0 [125].

1.6.5. Wyznaczanie mutagenności M wody (l. rew/dm³)

Przy obliczaniu mutagenności M określanej jako l.rew. w 1 dm³ badanej próbki ograniczono się do analizowania wyników pochodzących z początkowej części krzywej dawka-odpowiedź. Takie założenie zostało poczynione na podstawie doniesień literaturowych i własnych doświadczeń, ponieważ test Amesa jest testem określającym mutagenność badanej próby, w który pomija się efekt toksyczności.

Na podstawie Bernstein, Mielżyńska [127, 134] i własnych doświadczeń [125, 126] ocenę dopasowania otrzymanych wyników do założonego modelu liniowej zależności dawka-odpowiedź przeprowadzono metodą najmniejszych kwadratów, wykorzystując analizę regresji liniowej. W oparciu o parametry równania obliczano przewidywaną liczbę kolonii rewertantów indukowanych przez zanieczyszczenia znajdujące się w 1 dm³ badanej wody. Badania prowadzono przy użyciu programu komputerowego OriginPro 7,5.

Przy założeniu, że krzywa zależności dawka-odpowiedź jest liniowa i kwestia wykrywania punktu zmiany (momentu, w którym zateżenie/stężenie/dawka zaczyna działać toksycznie) jest nieistotna to oczekiwana liczba rewertantów w zależności od d ma postać:

$$E(N) = \beta_0 + \beta_1 * d.$$

Opierając się na modelu prostej regresji liniowej estymowano wartości współczynników β_0 oraz β_1 . Estymator współczynnika β_0 przybliży liczbę rewertantów spontanicznych,

natomiast wartość estymatora współczynnika β_1 określa o ile wzrośnie liczba rewertantów indukowanych, jeżeli zateżenie/stężenie (dawka) wzrośnie o jeden poziom. Aby była możliwość wyznaczenia wartości powyższych estymatorów należało wyznaczyć jaki rozkład prawdopodobieństwa ma zmienna N , określająca liczbę rewertantów.

W celu wyboru sposobu odrzucania wyników, pochodzących z tych zateżeń/ stężeń (dawek) próbki, które są toksyczne wykorzystano test zaproponowany przez Bernstein i in. [134], oparty na metodzie maksymalnego prawdopodobieństwa (MLEs), która sugeruje schemat postępowania dotyczący dopasowywania prostej regresji do wszystkich dostępnych -d- zateżeń/stężeń (dawek): jeśli współczynnik przy zmiennej d - jest ujemny, wtedy należy odrzucić kolejne wyniki, począwszy od najwyższych zateżeń/stężeń (dawek) aż do momentu kiedy wartość współczynnika b_1 będzie dodatnia. Przy założeniu, że pozostało r poziomów zateżeń należy dopasować prostą regresji do tych danych i określić średnią liczbę rewertantów dla zateżenia/stężenia (dawki) na poziomie r (N_r). Następnie odrzucić pomiary dla zateżenia r ze zbioru danych i dopasować jeszcze raz prostą regresji. Dla tak określonej regresji należy wyznaczyć oczekiwaną liczbę rewertantów dla zateżenia na poziomie r jako N_{r-1} . Jeśli $N_r \geq N_{r-1}$ to wówczas należy przyjąć, że zateżenie na poziomie r nie jest zateżeniem toksycznym i nie należy go wyrzucać ze zbioru danych. W przeciwnym wypadku należy przeprowadzić odpowiedni test, który pozwoli określić, czy zateżenia na poziomie r jest toksyczne czy mutagenne.

1.7. Fiński model do prognozowania potencjalnej mutagenności mikrozanieczyszczeń wody – założenia [21]

Przewidywana modelem mutagenność wody przedstawiona została jako liczba rewertantów indukowanych przez mikrozanieczyszczenia znajdujące się w 1 dm^3 wody. Określana jest przez funkcję zapisaną w następującej postaci:

$$f = A * (1 - e^{-k * c}) \text{ l. rew./dm}^3$$

gdzie:

- f - oznacza mutagenność wody do picia ,
- A i k - stałe wynoszące odpowiednio: 4000 i 0,054,
- c - jest definiowane jako:

$$c = [\text{OWO}] * [\text{Cl}_2] * (1 - \text{NH}_3)^2 \text{ mg/dm}^3$$

gdzie:

- OWO - zawartość ogólnego węgla organicznego, mg/dm^3 ,

- NH_3 (*) - stężenie amoniaku, mg/dm^3 ,
- Cl_2 - dawka chloru, mg/dm^3 .

(*) – stężenie amoniaku użyte w części doświadczalnej i obliczeniowej pracy przeliczono i przedstawiono jako azot amonowy w $\text{mgNH}_4^+/\text{dm}^3$, niezgodnie z weryfikowanym modelem, ale według ogólnie przyjętej nomenklatury.

Założenie dodatkowe do modelu:

Jeżeli w trakcie procesu uzdatniania do wody jest dodawany dwukrotnie chlor to:

$$f = f_R + f_D$$

gdzie:

- R - dotyczy parametrów wody surowej (tzw. wstępne chlorowanie),
- D - dotyczy parametrów wody do picia wody oczyszczonej (tzw. właściwe chlorowanie).

1.8. Korelacja wyników własnych

W celu wykazania współzależności lub jej braku pomiędzy uzyskanymi w trakcie badań wynikami obliczono współczynnik korelacji. Dla danych o rozkładzie normalnym testowano istotność korelacji i pod uwagę wzięto współczynnik korelacji Pearsona. Dla danych dla których hipotezę o normalności rozkładu należy odrzucić badano istotność współczynnika korelacji porządku rang Spearmana.

Wartość współczynnika korelacji równa -1 reprezentuje doskonałą korelację ujemną, natomiast 1 to doskonała korelacja dodatnia. Wartość 0 oznacza brak korelacji. W przypadku korelacji ujemnej współzależność pomiędzy zmiennymi kształtuje się w taki sposób, że gdy wartości jednej zmiennej wykazują tendencję rosnącą, wówczas wartości drugiej zmiennej wykazują tendencję malejącą. Korelacja dodatnia - gdy wartości jednej zmiennej wykazują tendencję wzrastającą, wówczas wartości drugiej zmiennej także wykazują tendencję wzrastającą i na odwrót.

1.9. Dopasowywanie modelu regresji wielorakiej do danych rzeczywistych

Linia prosta w przestrzeni dwuwymiarowej (na płaszczyźnie) zdefiniowana jest przez równanie $Y=a+b \cdot X$. Oznacza ono, że wartość zmiennej Y może być obliczona jako suma wartości stałej a (zwanej również wyrazem wolnym) oraz iloczynu nachylenia -b- tzw. współczynnika B lub współczynnika regresji przez zmienną X. W przypadku

wielowymiarowym a taki ma też miejsce w niniejszej pracy, kiedy jest więcej niż jedna zmienna niezależna, linia regresji nie może już być tak prosto przedstawiona wizualnie i równanie regresji wielorakiej ma postać:

$$Y = a + b_1 * X_1 + b_2 * X_2 + \dots + b_p * X_p$$

W celu skonstruowania prawidłowego modelu regresji wielorakiej należało spełnić kilka warunków. Najważniejszymi, wstępnymi warunkami poprawnej konstrukcji równania modelu było:

- wykazanie związku zmiennych objaśniających ze zmienną, którą będą objaśniały,
- sprawdzenie czy zmienne objaśniające wykazują odpowiednio dużą zmienność; poziom współczynnika zmienności CV (iloraz odchylenia standardowego danej zmiennej oraz średniej arytmetycznej obliczonej dla wartości tej zmiennej) powinien wynosić dla każdej zmiennej pozostającej w dalszym badaniu przynajmniej 0,10.
- sprawdzenie czy zmienne wyróżnione nie są współzależne, czyli czy ich wzajemne wskaźniki korelacji wykazują wartości mniejsze niż wartości korelacji ze zmienną objaśnioną.

Zgodnie ze wcześniejszymi obostrzeniami, dotyczącymi doboru zmiennych objaśniających sprawdzano siłę zachodzącego pomiędzy nimi związku wyznaczając współczynniki korelacji Pearsona (dla danych pochodzących z populacji o rozkładzie normalnym) a w przeciwnym przypadku - aby obliczyć siłę korelacji skorzystano ze wzoru na wyznaczenie współczynnika korelacji Spearmana.

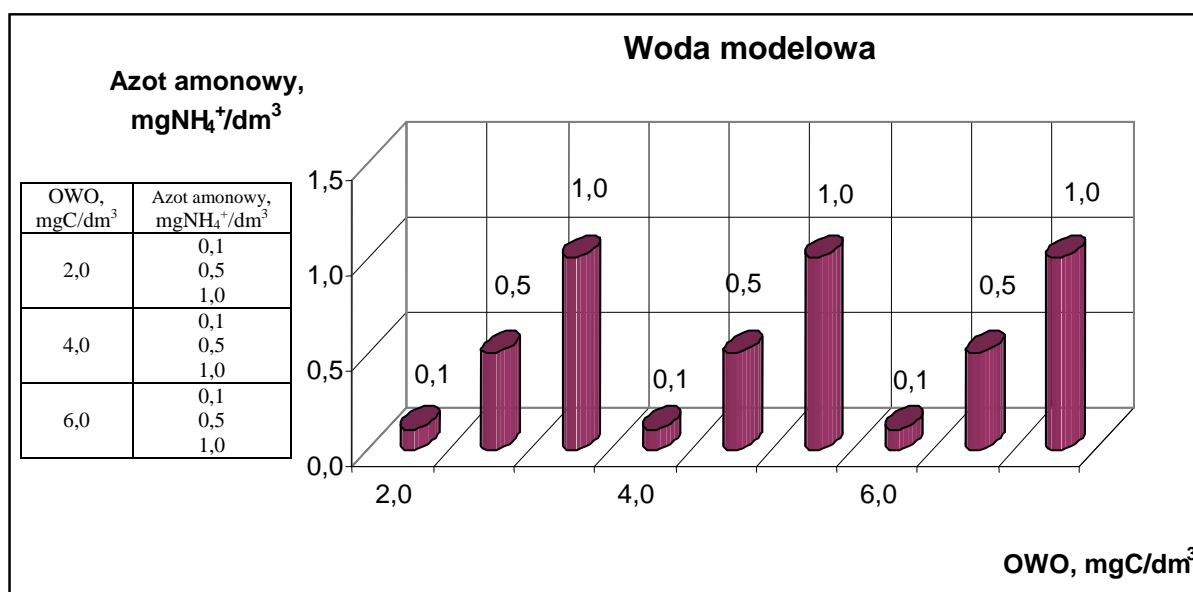
Aby móc wnioskować z oszacowanego równania modelu regresji wielorakiej należy sprawdzić istotność statystyczną parametrów tego równania. Wykorzystano w tym celu test t-Studenta. Aby określić w jakim stopniu model jest dopasowany do danych zbadano współczynnik determinacji R^2 i skorygowany- R^2 . Współczynnika determinacji rośnie (maleje) wraz ze wzrostem liczby zmiennych objaśniających w modelu i liczby obserwacji, dlatego należy liczyć miary skorygowane, czyli skorygowany R^2 .

III WYNIKI I OMÓWIENIE

1. Woda modelowa – etap I badań

Woda modelowa badana była w celu ustalenia wpływu zawartości OWO pochodzącego z obecności humusów naturalnych i stężenia azotu amonowego na aktywność mutageną powstających w rezultacie dezynfekcji pochodnych chlorowych, jak również w celu weryfikacji modelu Vartiainena do prognozowania potencjalnej mutagenności wody do picia.

Schemat przygotowania wody modelowej przedstawiono na Wykresie nr 1.



Wykres 1. Woda modelowa – zawartość OWO i stężenie azotu amonowego

Udział wody WTB nadawał wodzie modelowej barwę, podwyższoną absorbcję i OWO. Woda wodociągowa oczyszczona na węglu aktywnym stanowiła natomiast w głównej mierze o składzie mineralnym wody modelowej.

W rezultacie mieszania wody oczyszczanej na węglu aktywnym z wodą z WTB otrzymano wodę modelową o oczekiwanych parametrach – Tabela 8.

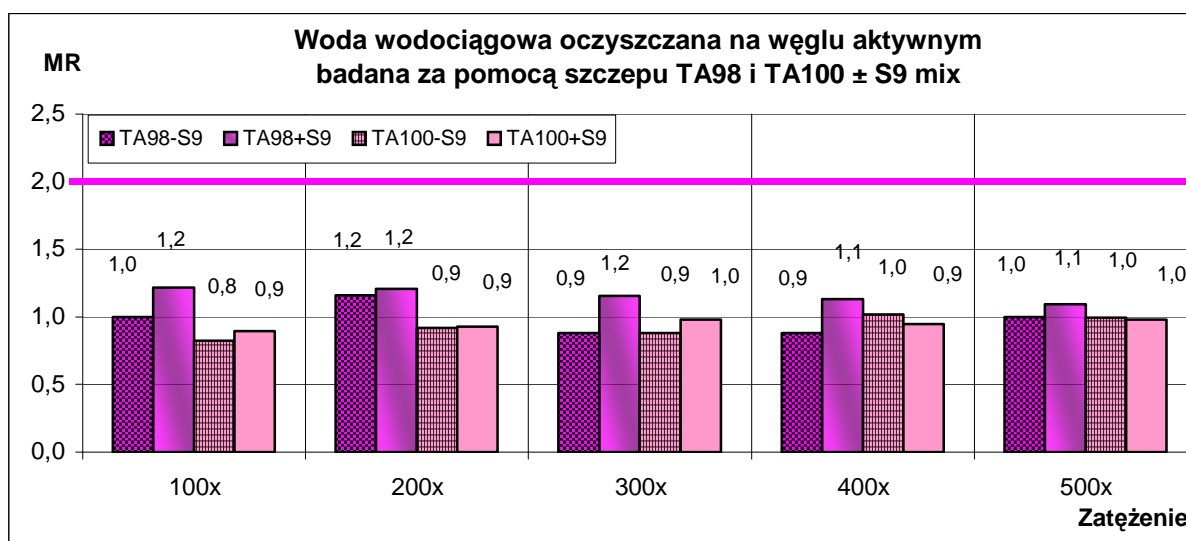
Barwa, mętność i absorbcja w 254 nm posiadała jedną wartość dla danego OWO niezależnie od stężenia azotu amonowego, tak samo kształtowały się wartości azotu organicznego i przewodnictwo.

Tabela 8. Skład fizyczno-chemiczny wód modelowych

OWO mgC/dm ³	Azot amonyowy mgN/dm ³	Barwa mgPt/dm ³	Mętność NTU	pH	Absorbancja (254 nm) m ⁻¹	Przewodnictwo μS/cm	Azot organiczny mgN/dm ³
2,0	0,1 0,5 1,0	6,0	0,8	7,4	7,5	535	0,12
4,0	0,1 0,5 1,0	19,0	0,8	7,5	18	520	0,24
6,0	0,1 0,5 1,0	31,0	1,1	7,4	27	560	0,36

Ze względu na to, iż podstawą wody modelowej była woda wodociągowa filtrowana przez węgiel aktywny, dla określenia warunków początkowych poddano ją, po stosowanej procedurze ekstrakcyjnej, badaniom bioindykacyjnym.

Wyniki badań testu Ames (Wykres 2) pozwalają przyjąć, iż skład chemiczny tej wody nie miał wpływu na uzyskiwane rezultaty badań bioindykacyjnych wód modelowych, ponieważ wskaźnik mutagenności MR w każdym zateżeniu wody był równy lub bliski 1,0.

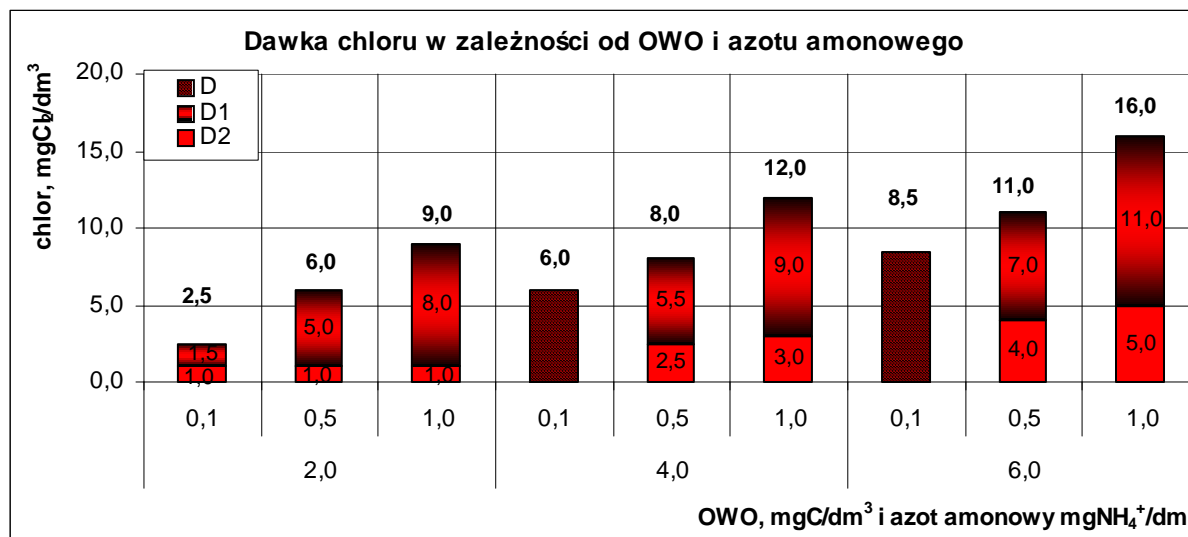


Wykres 2. MR wody wodociągowej filtrowanej na węglu aktywnym

1.1. Woda modelowa dezynfekowana chlorem – etap IA

W celu ustalenia wpływu zawartości OWO, stężenia azotu amonowego i dawki chloru na aktywność mutageną wody, wodę modelową w tym etapie badań dezynfekowano chlorem.

Do chlorowania wody modelowej stosowano dawki chloru w zakresie od 0,5 do 20,0 mgCl₂/dm³ [30]. Wyniki badań przedstawiono na Wykresie 3.



Wykres 3. Dawka normalna chloru zastosowana do chlorowania wody modelowej

Dawki normalne chloru rosły wraz ze wzrostem zawartości OWO i stężeniem azotu amonowego od wartości 2,5 do 16,0 mgCl₂/dm³. Zwiększenie OWO z 2,0 do 4,0 mgC/dm³ powodowało wzrost dawki chloru 2,4 razy dla stężenia azotu amonowego 0,1 mgNH₄⁺/dm³. W pozostałych przypadkach wzrost ten był bliski bądź równy 1,3 razy.

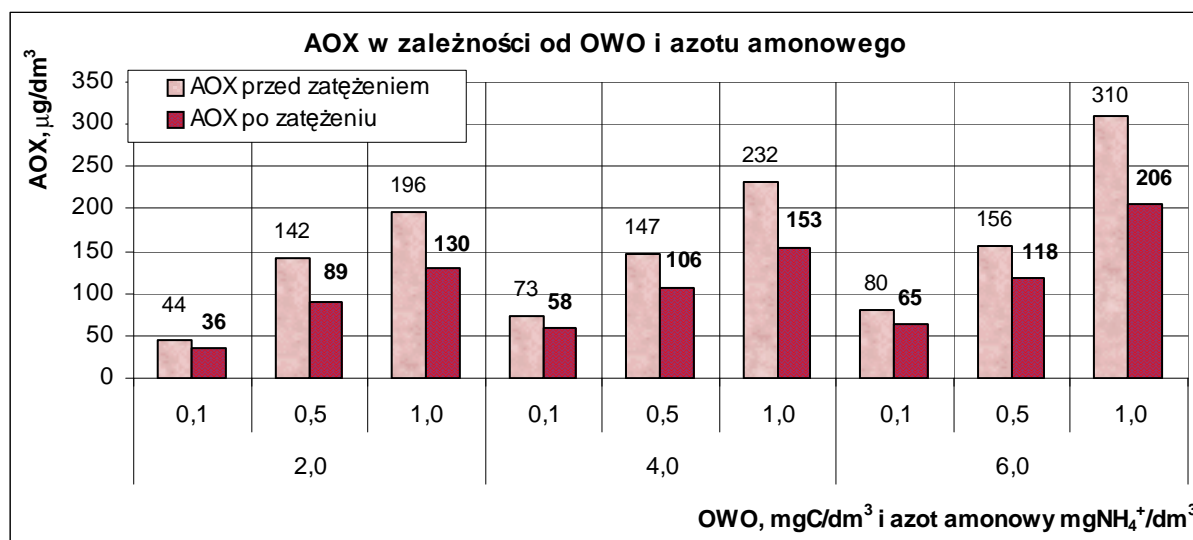
Udział D₁ w całkowitej dawce normalnej chloru wynosił od 60 do 89 %, udział D₂ – od 40 do 11 %. W miarę wzrostu stężenia azotu amonowego dla tej samej zawartości OWO rósł udział D₁.

Przebieg krzywych zapotrzebowania na chlor (po 0,5 h i po 16 h czasie kontaktu) zależał od stężenia azotu amonowego i węgla organicznego. Krzywe zapotrzebowania na chlor przebiegały z wyraźnym maksimum i minimum zwanym punktem przełamania.

Dla wody o najniższym stężeniu azotu amonowego (0,1 mgNH₄⁺/dm³) i zawartości węgla organicznego (4,0 i 6,0 mgC/dm³) powstałe po chlorowaniu chloraminy zostały całkowicie zużyte, dlatego nie można było wyznaczyć ani punktu przełamania ani zapotrzebowania na chlor wolny [30].

1.1.1. Uboczne produkty dezynfekcji wody modelowej chlorem

W rezultacie chlorowania wody zawierającej związki organiczne powstaje szereg produktów ubocznych procesu. Chlorowanie wody modelowej powodowało wytworzenie ubocznych produktów tego procesu i oznaczane było jako AOX (Wykres 4) i HAA (Wykres 5 a, b).



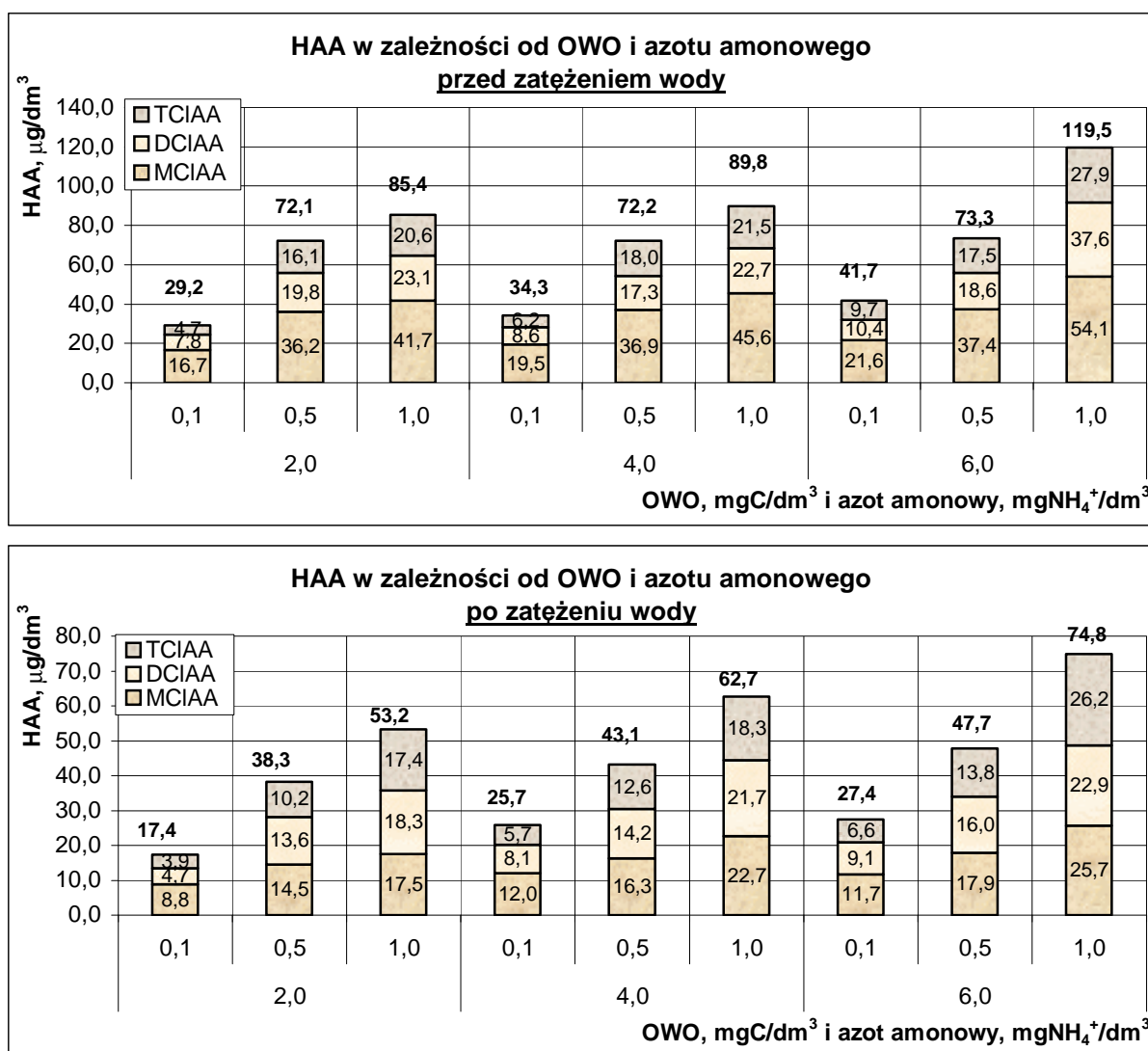
Wykres 4. AOX powstałe po dezynfekcji wody modelowej chlorem

W wodzie modelowej dezynfekowanej chlorem rosnąca wraz ze wzrostem stężenia OWO i azotu amonowego dawka normalna chloru powodowała przyrost AOX (Tabela 4) od 44 μgCl/dm³ do 310 μgCl/dm³. Odzysk AOX w procesie ekstrakcji wynosił średnio 72 % (63-82%). Dla AOX oznaczanych w wodzie modelowej dezynfekowanej chlorem przed i po jej załadowaniu zwiększenie OWO z 2,0 do 4,0 mgC/dm³ powodowało wzrost AOX – średnio 1,7 razy dla stężenia azotu amonowego 0,1 mgNH₄⁺/dm³. W pozostałych przypadkach wzrost ten był równy średnio 1,1 raza.

W grupie chlorowanych związków organicznych znaczący procent stanowiły kwasy chlorooctowe. Przed procesem załadowania udział sumy kwasów chlorooctowych w absorbowalnych halogenowych związkach organicznych wynosił 49 % (39-66 %) a po procesie załadowania zmniejszył się do 43 % (36-48 %). Udział kwasów chlorooctowych w AOX przed załadowaniem wody modelowej wynosił dla: MCAA – 25 % (17-38 %), DCAA – 13 % (10-18 %) a dla TCAA – 11 % (8-12) i po jej załadowaniu był podobny w przypadku kwasów di- i tri-chlorooctowego i wynosił odpowiednio: 14 % (11-15 %) i 12 % (10-13 %) natomiast dla kwasu monochlorooctowego był nieco niższy - 17 % (12-24 %).

Stężenie kwasów mono-, di- i tri-chlorooctowego w wodzie (Wykres 5a) wzrastało wraz ze wzrostem zawartości OWO i stężeniem azotu amonowego od wartości 4,7 μg/dm³ (TCAA)

do 54,1 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (MCAA) a po zateżeniu wody 3,9 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (TCAA) do 26,2 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ (TCAA) –Wykres 5b. Największy udział w sumie kwasów chlorooctowych w wodzie modelowej dezynfekowanej chlorem, przed zateżeniem, miał kwas monochlorooctowy – średnio 52 % (45-58 %), znacznie mniejszy kwasy di- i trichlorooctowy i wynosił odpowiednio: 26 % (24-31 %) i 22 % (16-25 %). Również po zateżeniu wody modelowej największy udział w sumie kwasów chlorooctowych miał MCAA - średnio 40 % (33-51 %), natomiast udział kwasów DCAA i TCAA był wyższy niż w przypadku wody modelowej przed zateżeniem i wynosił odpowiednio: 33 % (27-36 %) i 28 % (22-35%). Średnia skuteczność zateżenia wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla sumy HAA wynosiła 64 % (53-75 %) a dla poszczególnych kwasów chlorooctowych osiągnęła wartości: 49 % (42-62 %) dla MCAA, 79 % (60-96 %) dla DCAA, a dla TCAA – 80 % (63-92).



Wykres 5 a i b. HAA powstałe po dezynfekcji wody modelowej chlorem

Dla HAA oznaczanych w wodzie modelowej dezynfekowanej chlorem przed i po jej zateżeniu zwiększenie OWO z 2,0 do 4,0 mgC/dm³ powodowało wzrost HAA – średnio 1,5 razy dla azotu amonowego 0,1 mgNH₄⁺/dm³. W pozostałych przypadkach wzrost ten był równy średnio 1,1 razy, podobnie jak dla AOX.

1.1.2. Badania bioindykacyjne – test Ames – woda modelowa dezynfekowana chlorem

Celem badań bioindykacyjnych wody modelowej było ustalenie zależności pomiędzy powstającymi po procesie dezynfekcji pochodnymi chlorowymi związków organicznych, wynikających ze stężenia ogólnego węgla organicznego i azotu amonowego a aktywnością mutageną ocenianą testem Ames. Badania prowadzono na 9 wariantach wody modelowej dezynfekowanej chlorem, przy użyciu szczepu testowego *Salmonella typhimurium* TA100 zarówno z frakcją mikrosomalną S9-mix jak i bez jej zastosowania. Badanie testem Ames prowadzono tylko na szczepie TA100, ponieważ prognozowana modelem Vartiainen potencjalna mutagenność wody do picia oparta była o wyniki uzyskane tylko przy zastosowaniu tego szczepu. Liczbę rewertantów spontanicznych i indukowanych dla szczepu TA100, w badaniach prowadzonych bez i z zastosowaniem frakcji S9-mix zamieszczono poniżej:

Szczep	LR spontanicznych		LR indukowanych (pozytywnych)	
	- S9 – mix	+ S9 - mix	- S9 – mix	+ S9 - mix
TA100	98-125	123-170	978-1500 dla NQNO	850-859 dla 2-AF

Przy przedstawianiu i obróbce wyników przy użyciu podstawowej statystyki opisowej jak również testowej w tabelach i na wykresach ramka-wąsy użyto oznaczeń próbek wody według schematów:

1) wm_Cl₂_a_b, gdzie:

wm_Cl₂– oznacza ekstrakt wody modelowej dezynfekowanej chlorem, badanej testem Ames bez zastosowania frakcji mikrosomalnej S9,

a – stężenie OWO, mgC/dm³,

b – stężenie azotu amonowego, mgNH₄⁺/dm³.

np. wm_Cl₂_2_0,1 – oznacza wodę modelową dezynfekowaną chlorem badaną testem Ames bez zastosowania frakcji mikrosomalnej S9, dla wartości OWO = 2,0 mgC/dm³ i stężeniu azotu amonowego 0,1 mgNH₄⁺/dm³

2) wm_f_Cl₂_a_b, gdzie:

wm_f_Cl₂– oznacza ekstrakt wody modelowej dezynfekowanej chlorem, badanej testem Ames z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej S9,

a – stężenie OWO, mgC/dm³,

b – stężenie azotu amonowego, mgNH₄⁺/dm³

np. wm_Cl₂_f_2_0,1 – oznacza wodę modelową dezynfekowaną chlorem badaną testem Amesa z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej S9, dla wartości OWO = 2,0 mgC/dm³ i stężeniu azotu amonowego 0,1 mgNH₄⁺/dm³.

1.1.2.1. Wyniki testu Amesa wraz z podstawową statystyką opisową – etap IA

Poniżej przedstawiono podstawową statystykę opisową wyników testu Amesa dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla wariantów bez (Tabela 9) i z zastosowaniem frakcji S9 mix (Tabela 10), czyli wyliczono średnią liczbę rewertantów dla danej próbki wody wraz z odchyleniem standardowym, jak również określono minimum i maksimum, medianę oraz rangę i współczynnik zmienności CV.

Tabela 9. Statystyka opisowa - woda modelowa IA - TA100-S9 mix

Założenie próby	wm_Cl ₂ _2_0,1	wm_Cl ₂ _2_0,5	wm_Cl ₂ _2_1,0	wm_Cl ₂ _4_0,1	wm_Cl ₂ _4_0,5	wm_Cl ₂ _4_1,0	wm_Cl ₂ _6_0,1	wm_Cl ₂ _6_0,5	wm_Cl ₂ _6_1,0
średnia	139	122	150	100	175	178	203	169	267
odchylenie standardowe	16	23	31	17	43	59	43	63	85
min	111	89	81	45	102	74	132	73	131
max	170	188	216	134	267	315	268	292	480
mediana	142	120	141	101	168	166	212	145	249
ranga	59	99	135	89	165	241	136	219	349
CV	11%	19%	20%	17%	25%	33%	21%	37%	32%

Tabela 10. Statystyka opisowa - woda modelowa IA - TA100+S9 mix

Statystyka opisowa	wm_f_Cl ₂ _2_0,1	wm_f_Cl ₂ _2_0,5	wm_f_Cl ₂ _2_1,0	wm_f_Cl ₂ _4_0,1	wm_f_Cl ₂ _4_0,5	wm_f_Cl ₂ _4_1,0	wm_f_Cl ₂ _6_0,1	wm_f_Cl ₂ _6_0,5	wm_f_Cl ₂ _6_1,0
średnia	129	137	122	120	108	120	136	108	139
odchylenie standardowe	15	15	17	15	10	26	34	16	22
min	89	113	87	90	86	84	52	76	101
max	150	173	148	159	135	198	191	145	198
mediana	130	133	126	122	107	113	144	110	138
ranga	61	60	61	69	49	114	139	69	97
CV	12%	11%	14%	13%	9%	22%	25%	15%	16%

W przypadku wyników testu Amesa w wariancie bez zastosowania frakcji mikrosomalnej średnia liczba rewertantów dla 9 ekstraktów wody modelowej dezynfekowanej chlorem zwiększała się wraz ze wzrastającym stężeniem azotu amonowego (od 0,1 do 1,0 mgNH₄⁺/dm³), przy stałych wartościach OWO, za wyjątkiem próbki wm_Cl₂_2_0,1 czyli gdy OWO=2,0 mg/dm³ a N-NH₄⁺=0,1 mgNH₄⁺/dm³ i wm_Cl₂_6_0,1, czyli gdy OWO=6,0 mg/dm³ a N-NH₄⁺=0,1 mgNH₄⁺/dm³. I mieściła się w przedziale od 100 do 267. Podobny charakter zmian jak dla wartości średniej zaobserwowano dla wartości mediany dla poszczególnych próbek.

W celu sprawdzenia zmienności w danych, przeanalizowano wartości odchylenia standardowego, minimum, maksimum, rangi oraz współczynnika zmienności CV. Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, że wartości wyżej wymienionych statystyk opisowych rosły wraz ze wzrastającym stężeniem azotu amonowego, podobnie jak średnia. Zatem im większa wartość średniej tym większy rozrzut obserwowanych danych, tzn. średnia coraz słabiej opisywała próbę.

Wyjątek stanowiła wartość minimalna, która nie rosła wraz ze wzrostem wartości średniej. Na tej podstawie można wnioskować, że rosnąca zmienność w danych była spowodowana głównie przez zwiększanie się maksymalnej liczby rewertantów w próbce.

W przypadku wody modelowej dezynfekowanej chlorem badanej testem Ames z zastosowaniem frakcji nie zauważono takich zależności jak w przypadku tych samych wód badanych bez zastosowaniem frakcji. Wartości średniej liczby rewertantów mieściły się w przedziale od 108 do 139, czyli górna granica tego przedziału była dużo mniejsza niż w przypadku wód badanych bez frakcji. Podobną zależność obserwowano dla wartości mediany.

Analizując wartości odchylenia standardowego, minimum, maksimum, rangi czy współczynnika zmienności, można stwierdzić, że dla wszystkich próbek, wartości tych statystyk były do siebie zbliżone. Zatem można wnioskować, że zmienność danych we wszystkich badanych próbkach była niewielka i średnia dobrze opisywała dane. Jest to całkiem odmienna sytuacja niż ta, którą obserwowano dla wody badanej bez frakcji.

1.1.2.2. Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody modelowej - IA

W analizie wyników dotyczących rozkładu prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem wzięto pod uwagę głównie wyniki uzyskane testem Shapiro-Wilka, ponieważ pozostałe dwa testy są testami asymptotycznymi, czyli działającymi poprawnie dla próbek o dużej liczebności. Statystyka testowa wyników testu Ames z i bez zastosowania aktywacji metabolicznej została zamieszczona w Tabelach 11 i 12.

Tabela 11. Statystyka testowa - woda modelowa IA - TA100-S9 mix

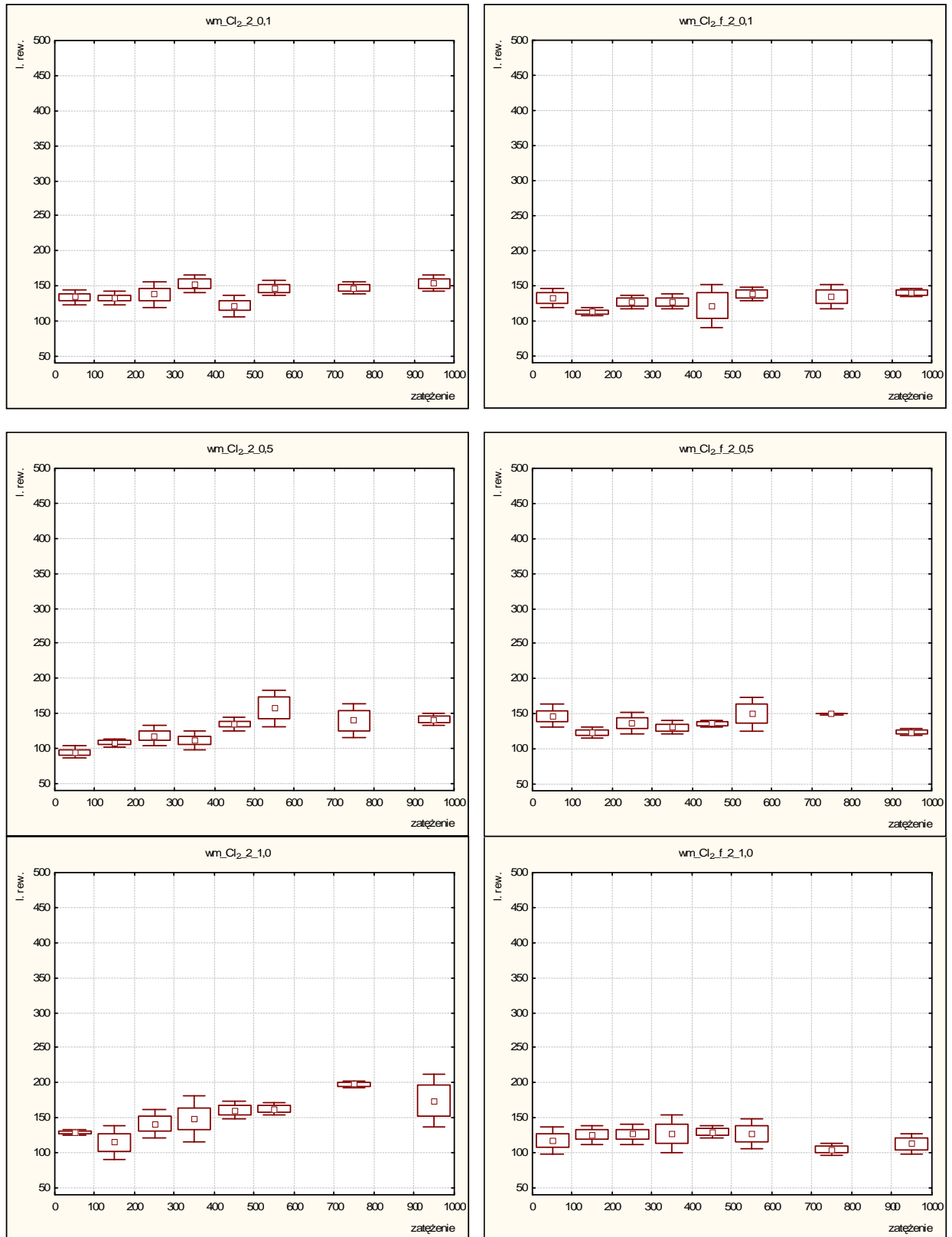
Próba - zmienna	N	Testy normalności – wartości p			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnowa	Lillieforsa	Shapiro-Wilka	
wm_Cl ₂ _2_0,1	31	p > 0,20	p > 0,20	0,740554	normalny
wm_Cl ₂ _2_0,5	31	p > 0,20	p > 0,20	0,176603	normalny
wm_Cl ₂ _2_1,0	31	p > 0,20	p < 0,05	0,066675	normalny
wm_Cl ₂ _4_0,1	34	p < 0,15	p < 0,05	0,013706	brak normalności
wm_Cl ₂ _4_0,5	32	p > 0,20	p > 0,20	0,298618	normalny
wm_Cl ₂ _4_1,0	34	p > 0,20	p < 0,10	0,033478	brak normalności
wm_Cl ₂ _6_0,1	34	p > 0,20	p > 0,20	0,053851	normalny
wm_Cl ₂ _6_0,5	34	p < 0,20	p < 0,01	0,034218	brak normalności
wm_Cl ₂ _6_1,0	34	p > 0,20	p > 0,20	0,169752	normalny

Tabela 12. Statystyka testowa - woda modelowa IA - TA100+S9 mix

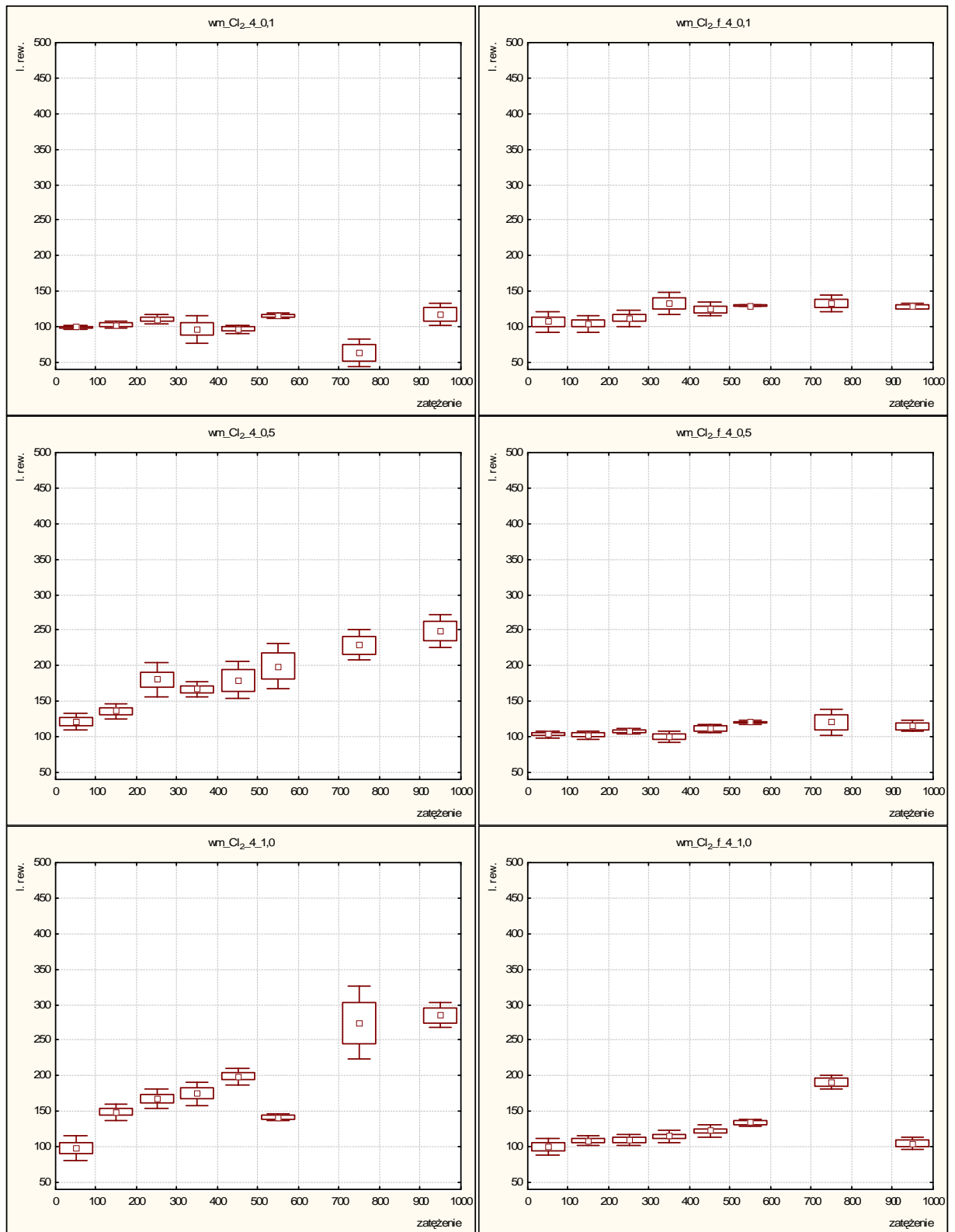
Próba - zmienna	N	Testy normalności – wartości p			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnowa	Lilieforsa	Shapiro-Wilka	
wm_Cl ₂ _f_2_0,1	24	p > 0,20	p > 0,20	0,242926	normalny
wm_Cl ₂ _f_2_0,5	29	p > 0,20	p < 0,10	0,203082	normalny
wm_Cl ₂ _f_2_1,0	29	p > 0,20	p < 0,15	0,248557	normalny
wm_Cl ₂ _f_4_0,1	34	p > 0,20	p > 0,20	0,277442	normalny
wm_Cl ₂ _f_4_0,5	32	p > 0,20	p < 0,15	0,281406	normalny
wm_Cl ₂ _f_4_1,0	34	p < 0,10	p < 0,01	0,000008	brak normalności
wm_Cl ₂ _f_6_0,1	34	p > 0,20	p > 0,20	0,343417	normalny
wm_Cl ₂ _f_6_0,5	34	p > 0,20	p > 0,20	0,811024	normalny
wm_Cl ₂ _f_6_1,0	29	p > 0,20	p > 0,20	0,580165	normalny

Jak wynika z przeprowadzonych testów statystycznych (Tabela 11 i 12) spośród osiemnastu próbek wody modelowej dezynfekowanej chlorem tylko w przypadku czterech próbek należało odrzucić hipotezę o normalności danych (wartość p była mniejsza od poziomu istotności 0,05). W tym znajdowały się trzy próbki wody modelowej badane testem Amesa bez zastosowania frakcji (wm_Cl₂_4_0,1; wm_Cl₂_4_1,0 i wm_Cl₂_6_0,5) oraz jedna z frakcją – oznaczona jako wm_Cl₂_f_4_1,0.

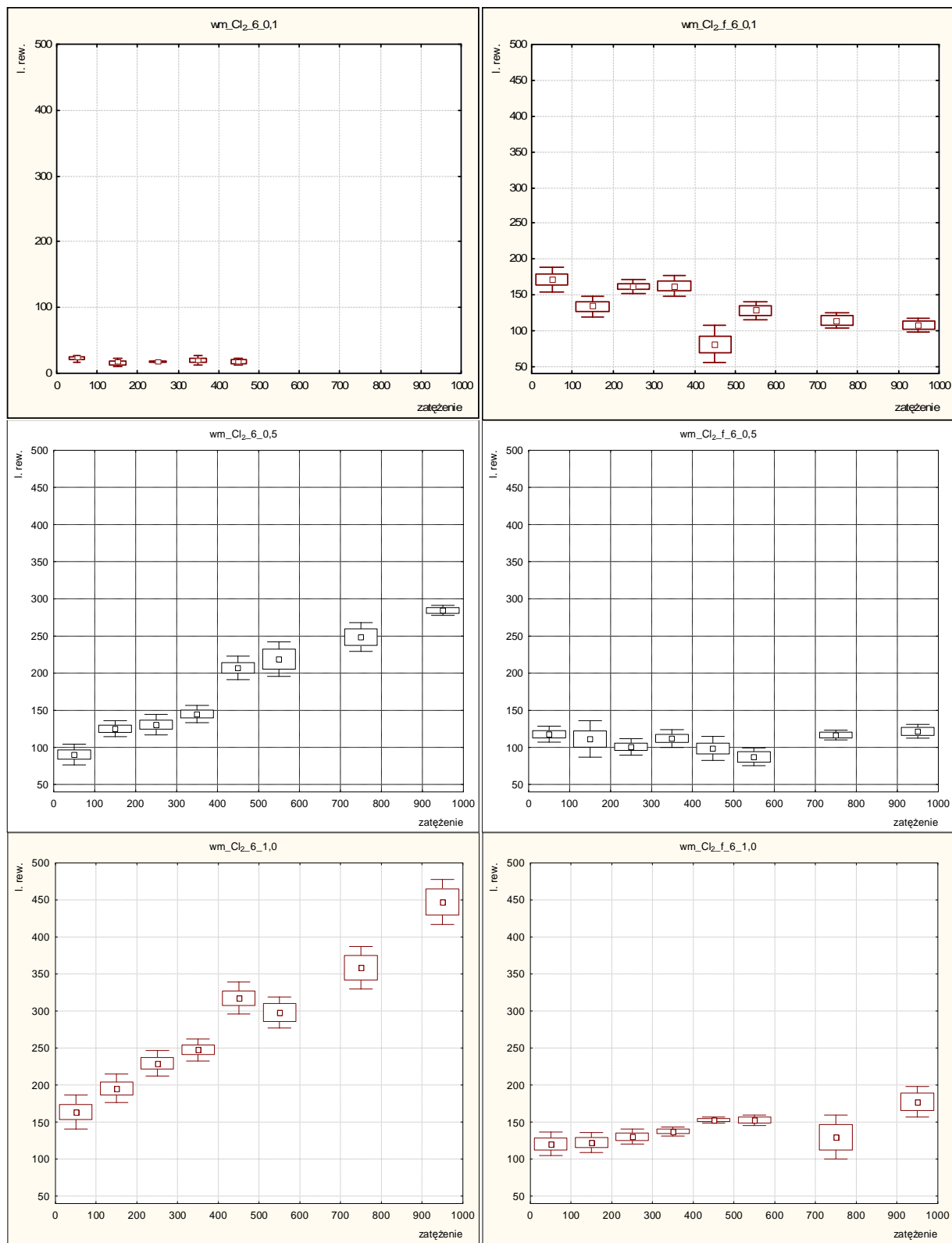
1.1.2.3. Krzywa zależności dawka–odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem



Wykres 6. Zależność dawka–odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem - $OWO=2,0\text{ mgC/dm}^3$



Wykres 7. Zależność dawka-odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem - $OWO=4,0 \text{ mgC/dm}^3$



Wykres 8. Zależność dawka-odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem - $OWO=6,0 \text{ mgC/dm}^3$

Na Wykresach 6-8 przedstawiono charakter krzywej zależności dawka–odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem badanej przy użyciu szczepu TA100 z i bez zastosowania frakcji S9-mix. Wyniki testu Amesa układały się w postaci dwóch różnych zależności dawka–odpowiedź. W żadnym badanym przypadku krzywa nie miała charakterystycznego dla testu *Salmonella* przebiegu, czyli wraz ze wzrostem zateżenia wody modelowej nie rosła liczba rewertantów, aż do osiągnięcia wartości maksymalnej, po której dalsze zateżenie wody powodowałoby spadek ilości rewertantów, czyli pojawiałby się tzw. efekt toksyczny. W przypadkach uzasadnionych odbiega się od tej reguły, co też i miało miejsce w tych badaniach. Ze względu na to, iż próbki wody nie powinny być za bardzo zateżone [113], stąd na kolejnych wykresach wraz ze wzrostem zateżania próbki wody rosła liczba rewertantów osiągając dla współczynnika koncentracji 1 000 wartości maksymalne. Taki przebieg miały wody badane testem Ames bez zastosowania frakcji dla zawartości OWO=6,0 mgC/dm³ i wszystkich trzech stężeń azotu amonowego 0,1; 0,5 i 1,0 mgNH₄⁺/dm³ oraz dla OWO= 4,0 mgC/dm³ i stężeniach azotu amonowego 0,5 i 1,0 mgNH₄⁺/dm³. Dla pozostałych trzynastu próbek wody uzyskane wyniki układały się w postaci linii prostej, czyli niezależnie od wzrostu zateżenia próbki nie rosła liczba rewertantów. Nieznacznie odbiegała próbka OWO=2,0 mgC/dm³ i N-NH₄⁺=1,0 mgNH₄⁺/dm³, gdzie liczba rewertantów rosła do zateżenia 800x a następnie spadła – jednakże próbka ta nie wykazywała charakteru mutagennego, gdyż w tym zateżeniu ilość rewertantów nie była równa czy też wyższa od wartości rewersji spontanicznej.

Obok analizowania charakteru krzywej dawka–odpowiedź, wykresy typu ramka–wąsy mogą również służyć do porównania błędu względnego SE oraz odchylenia standardowego SD dla poszczególnych zateżeń. Zgodnie z regułą – im większa wartość wspomnianych statystyk, tym większy rozrzut oraz zmienność można zaobserwować w danych. W przypadku zamieszczonych powyżej wyników dla poszczególnych próbek w większości przypadków nie zaobserwowano bardzo dużych różnic w wartości SE oraz SD dla poszczególnych zateżeń. Chociaż można znaleźć kilka wyjątków. Jak np. wykres ramka–wąsy dla próby wm_Cl₂_2_1,0 (Wykres 6), gdzie dla pewnych zateżeń obserwujemy bardzo małe wartości tych statystyk opisowych a dla innych duże. Oznacza to, że w zateżeniach z dużymi wartościami statystyk SE i SD, średnia słabo opisowała dane i mogła znacznie odbiegać od rzeczywistej wartości oczekiwanej dla tego zateżenia.

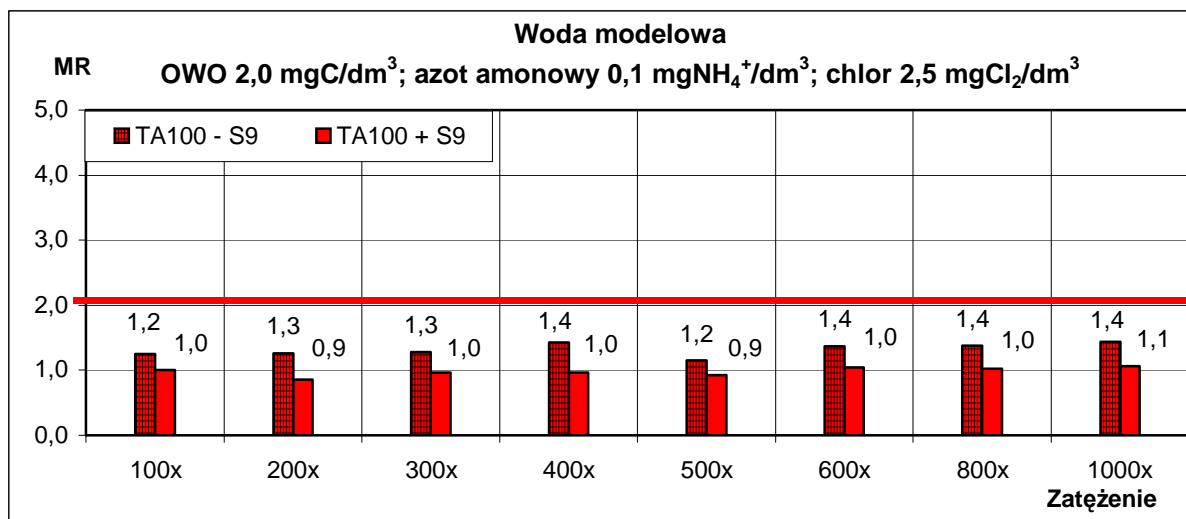
1.1.2.4. Współczynnik mutagenności (MR) wody modelowej dezynfekowanej chlorem

Wyniki testów Amesa przeprowadzonych na ekstraktach organicznych pochodzących z wód modelowych dezynfekowanych chlorem, badanych za pomocą szczepu testowego bakterii *Salmonella typhimurium* TA100 z aktywacją jak i bez aktywacji metabolicznej przez frakcję mikrosomalną wątroby szczurów S9-mix., przedstawiono na Wykresach od 9a do 11c. Przebadanie dziewięciu wariantów wody modelowej dezynfekowanej chlorem dało pogląd, przy jakich stężeniach OWO i azotu amonowego, można spodziewać się obecności w wodzie do picia zanieczyszczeń o potencjalnych właściwościach mutagennych.

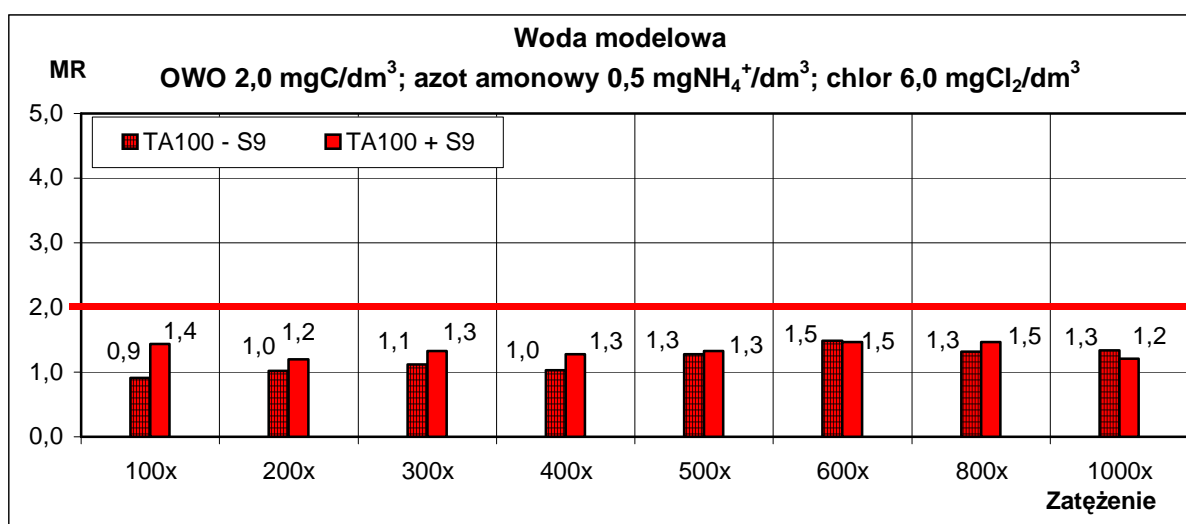
Badania testem Amesa ekstraktów wody modelowej o zawartości węgla organicznego $2,0 \text{ mg/dm}^3$ w przypadku trzech stężeń azotu amonowego: $0,1$; $0,5$ i $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ (Wykres 9 a,b,c), z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej z wątroby szczura jak i bez niej nie wykazały przekroczenia wartości współczynnika mutagenności powyżej 2,0. Zakres wartości wskaźnika mutagenności bez zastosowania frakcji wynosił od $1,2$ do $1,8$, a z frakcją od $0,8$ do $1,5$. Przy czym najwyższe wartości MR uzyskano dla wody modelowej o najwyższym stężeniu azotu amonowego. Uzyskane w testach bez zastosowania frakcji mikrosomalnej S9-mix wyniki MR, pozwoliły sądzić, iż ilość węgla organicznego $2,0 \text{ mgC/dm}^3$ i najwyższe badane stężenie azotu amonowego $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ w wodzie modelowej poddanej chlorowaniu nie było wystarczające by ilość powstających UPCh nawet przy 1 000-krotnym zateżeniu wody mogła spowodować rewersję mutacji w stopniu wskazującym jednoznacznie na działanie mutagenne powstałych w procesie chlorowania wtórnych mikrozanieczyszczeń wody. To samo można zauważyć dla ilość węgla organicznego równego $4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i najniższego stężenia azotu amonowego $0,1 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$.

Dla wody modelowej zawierającej ogólny węgiel organiczny $4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężenie azotu amonowego równe $0,5$ i $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ oraz dla OWO= $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ niezależnie od stężenia azotu amonowego wahającego się od $0,1$ do $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$, (Wykres 10b,c i 11a-c) badana woda modelowa wykazywała potencjalne właściwości mutagenne. Wartość wskaźnika mutagenności zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości ogólnego węgla organicznego i stężeniem azotu amonowego. Poddanie ekstraktów przemianom metabolicznym z udziałem enzymów frakcji mikrosomalnej zarówno dla OWO $4,0 \text{ mgC/dm}^3$ jak również dla OWO $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ niezależnie od zastosowanego stężenia azotu amonowego spowodowało obniżenie wskaźnika MR co pozwala sądzić o ich biotransformacji.

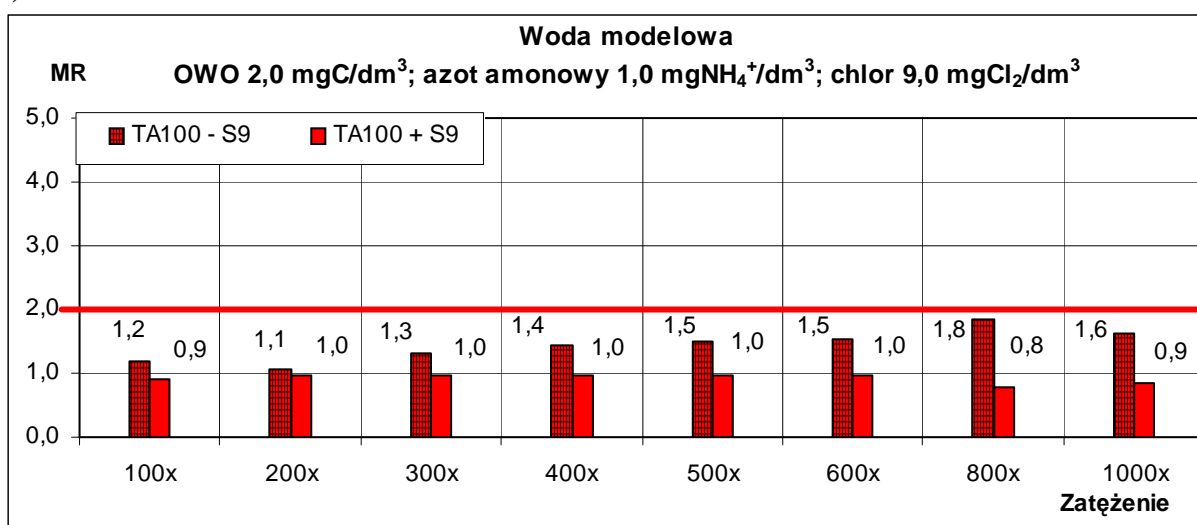
a)



b)

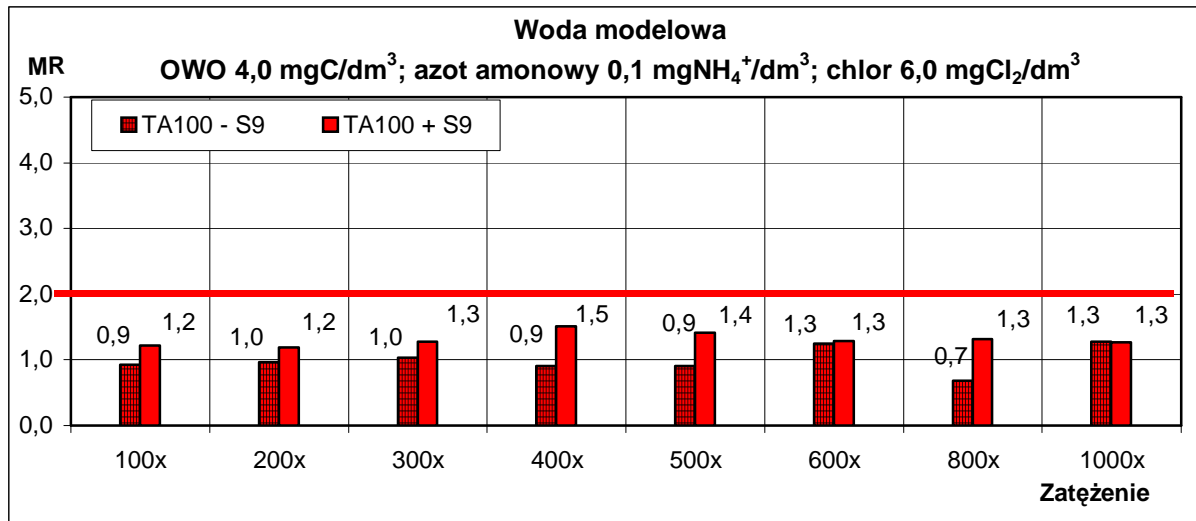


c)

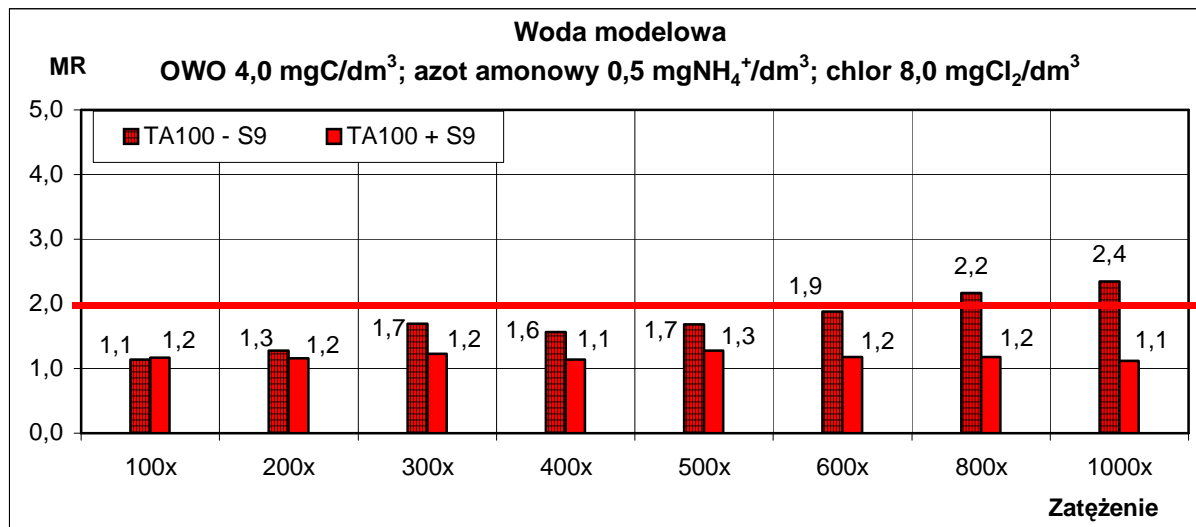


Wykres 9 a, b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla OWO = 2,0 mgC/dm³

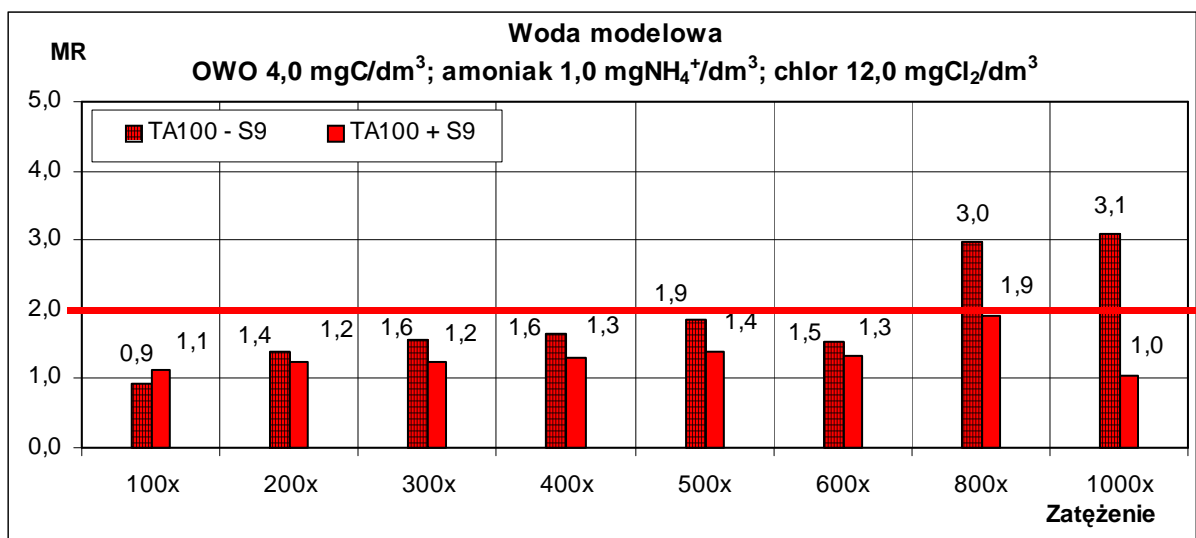
a)



b)

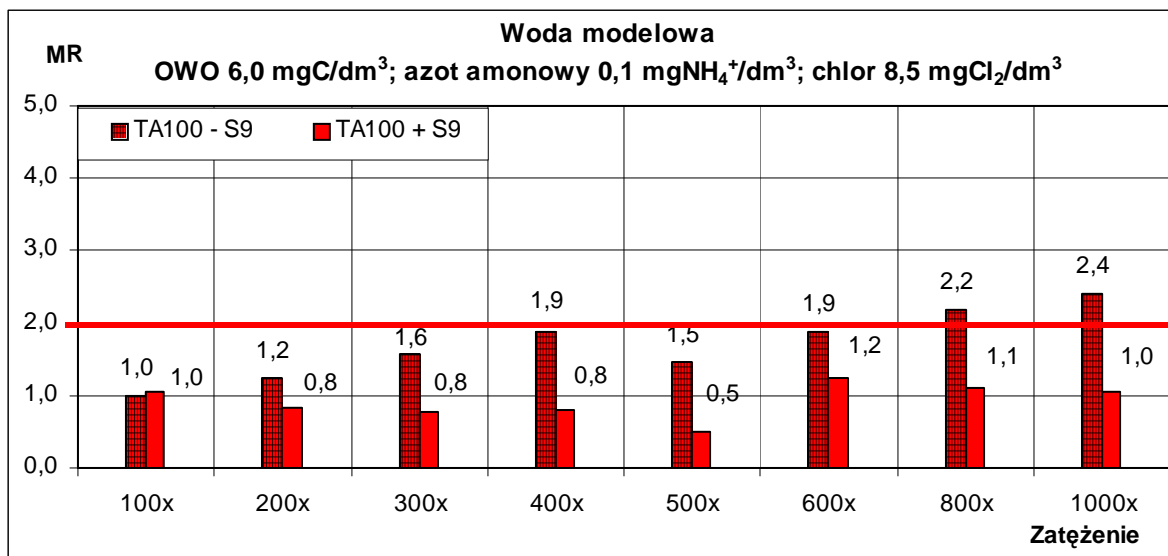


c)

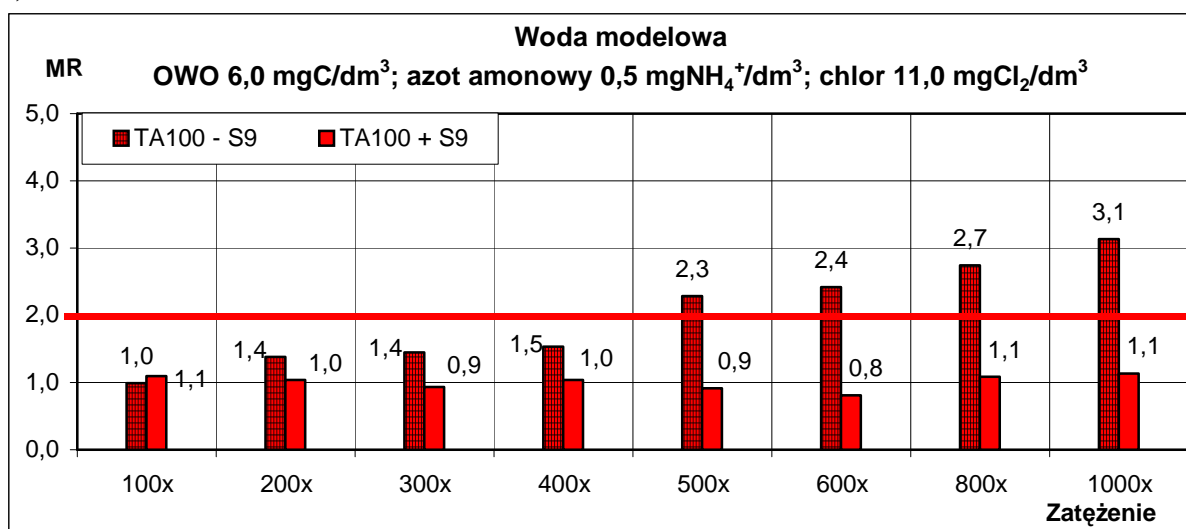


Wykres 10 a ,b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem OWO = 4,0 mgC/dm³

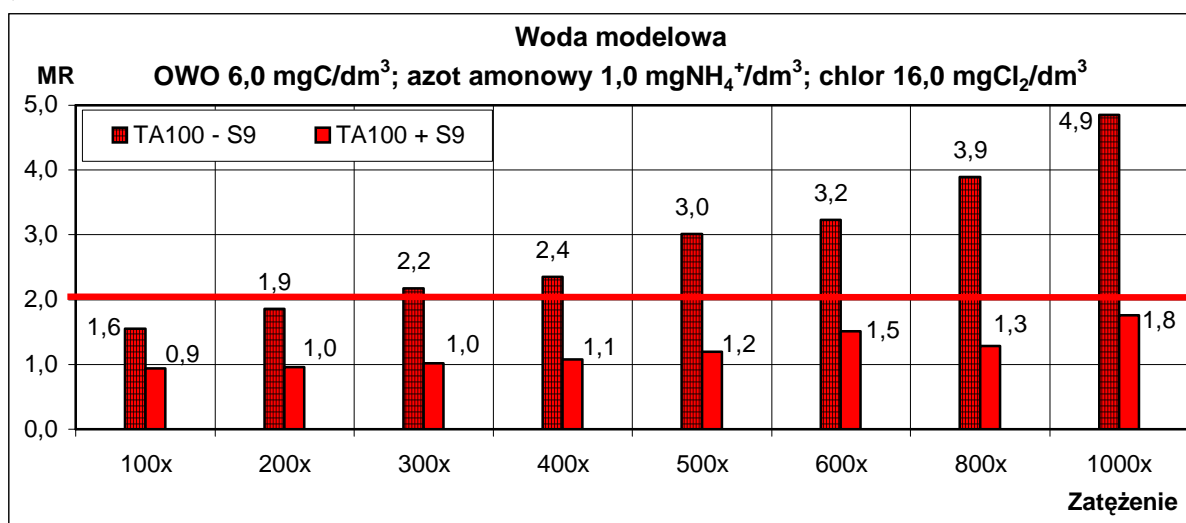
a)



b)



c)



Wykres 11 a, b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla OWO = 6,0 mgC/dm³

W przypadku ekstraktu chlorowanej wody modelowej o zawartości OWO $4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężeniu azotu amonowego $0,1 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ (Wykres 10a) wskaźniki mutagenności wyznaczone z użyciem szczepu *Salmonella typhimurium* TA100 nie przekroczyły wartości 2,0 a nawet nie zbliżyły się do tej wartości. Stosując do testu frakcję mikrosomalną uzyskano dla każdego zateżenia wody modelowej w tym wariantcie wyniki MR od 0,6 do 1,4. Przy tym samym stężeniu związków organicznych i średnim stężeniu azotu amonowego, czyli dla OWO $4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i $\text{N-NH}_4^+/\text{dm}^3=0,5 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ (Wykres 10b) zaobserwowano wyniki dodatnie testu Ames w dwóch najwyższych zateżeniach wody (800 i 1 000x) a przy zateżeniu 600x wartość MR zbliżyła się do 2,0 osiągając wartość 1,9. MR przy zastosowaniu frakcji wynosił od 1,1 do 1,3. Ekstrakty wody modelowej o stężeniu azotu amonowego równym $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ i zawartości węgla organicznego $4,0 \text{ mgC/dm}^3$, (Wykres 10c), wykazywały charakter mutageny w najwyższych zateżeniach (800x i 1 000x). I tak jak w poprzednich przypadkach nie wykazywały potencjalnych własności mutagennych po zastosowaniu frakcji mikrosomalnej z wątroby szczurów, tylko dla współczynnika koncentracji 800x - MR niepokojąco zbliżył się do 2,0 osiągając wartość 1,9 (MR był w tym przypadku w zakresie od 1,0 do 1,9).

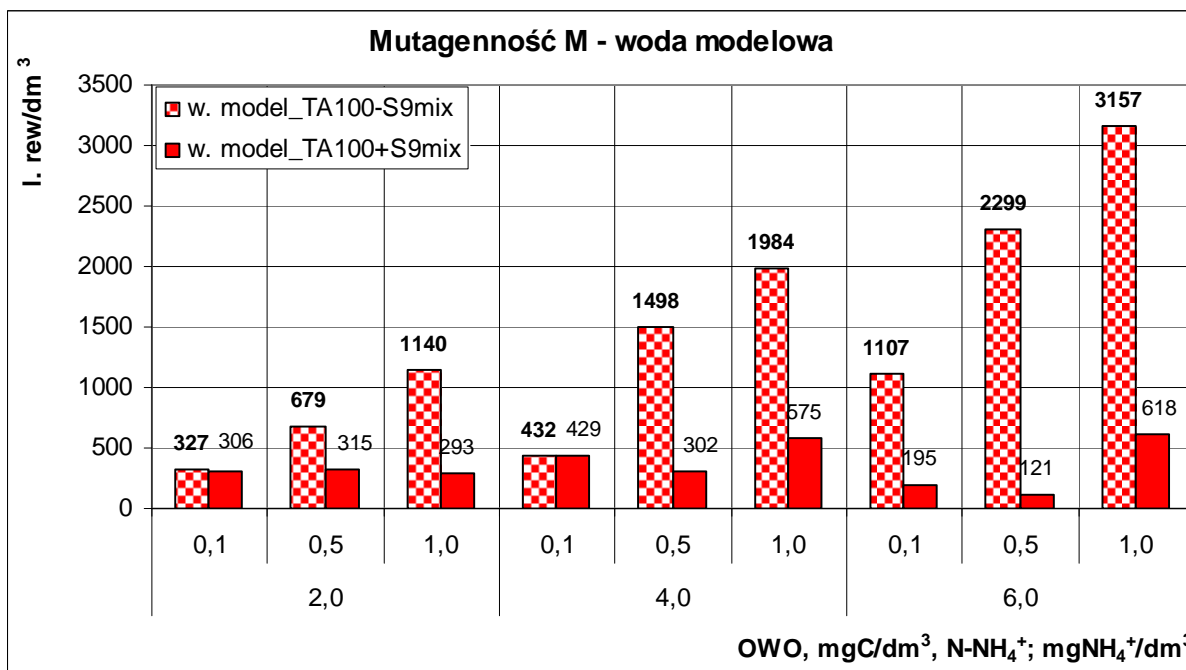
W wariantcie o najwyższej zawartości ogólnego węgla organicznego równego $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężeniu azotu amonowego $0,1 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ (Wykres 11a) zateżenie mikrozanieczyszczeń wody dla współczynnika koncentracji 800x i 1 000x powodowało wystąpienie efektu potencjalnej mutagenności. W zateżeniu 600x wartość MR zbliżyła się do 2,0. I tak jak w poprzednich wariantach po zastosowaniu do testu Ames frakcji S9-mix wskaźnik mutagenności MR był na poziomie jedności (0,8-1,2). W ekstraktach wody modelowej o wartości OWO $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężeniu azotu amonowego $0,5 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$, dodatkowo wyniki testu Ames uzyskano w przypadku zateżenia w zakresie od 500x do 1 000x. Zastosowanie frakcji mikrosomalnej S9 mix powodowało obniżenie wskaźnika mutagenności do wartości od 0,8 do 1,1. W przypadku badań, wykonanych na ekstrakcie wody modelowej dezynfekowanej chlorem (OWO – $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i azot amonowy $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ (Wykres 11c), bez frakcji mikrosomalnej, nie uzyskano wyników dodatnich wskazujących na obecność związków mutagennych tylko dla współczynników koncentracji 100 i 200x, chociaż przy zateżeniu 200x wartość MR była 1,9. W tym analizowanym przypadku wskaźnik mutagenności wzrastał, aż do osiągnięcia wartości maksymalnej dla wszystkich badanych wariantów wody modelowej i wynosił dla zateżenia 1 000x - 4,9. W przypadku tej wody zostały osiągnięte najwyższe wartości wskaźnika mutagenności dla badanego zakresu zateżenia od 100x do 1 000x. Natomiast, w przypadku badań tej samej wody z zastosowaniem

frakcji mikrosomalnej z wątroby szczurów, pod wpływem frakcji S9-mix następowała wyraźna biotransformacja mikrozanieczyszczeń badanego ekstraktu, o czym świadczą wyniki wskaźnika mutagenności na poziomie od 0,9 do 1,8 dla zateżenia 1 000x.

1.1.2.5. Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem

W celu weryfikacji modelu Vartiainena wyniki uzyskane testem Amesa przy zastosowaniu szczepu *Salmonella typhiumrium* TA100 przeliczono na mutagenność M określaną jako liczba rewertantów w 1 dm³ wody do picia. Uzyskaną dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem mutagenność M przedstawiono na Wykresie 12.

Uzyskana dla dziewięciu wariantów wody modelowej mutagenność M badana testem Amesa bez zastosowania frakcji mikrosomalnej mieściła się w granicach od 327 rew/dm³ dla najniższych wskaźników wody modelowej (OWO=2,0 mgC/dm³ i N-NH₄⁺=0,1 mgNH₄⁺/dm³) do 3 157 rew/dm³ dla najwyższych (OWO=6,0 mgC/dm³ i N-NH₄⁺=1,0 mgNH₄⁺/dm³). Jednocześnie zauważono, iż wzrost stężenia azotu amonowego powodował zwiększenie się mutagenności M, przy stałym stężeniu OWO. Zwiększenie OWO dwa razy (z 2,0 do 4,0 mgC/dm³) spowodowało prawie dwukrotne zwiększenie mutagenności dla stężenia azotu amonowego 0,5 i 1,0 mgNH₄⁺/dm³ i niewielki wzrost mutagenności M dla N-NH₄⁺=0,1 mgNH₄⁺/dm³, natomiast zwiększenie OWO trzykrotnie (z 2,0 do 6,0 mgC/dm³) spowodowało zwiększenie M dla wszystkich stężeń azotu amonowego od 2,8 dla N-NH₄⁺=1,0 mgNH₄⁺/dm³ do 3,4 razy dla N-NH₄⁺=0,1 i 0,5 mgNH₄⁺/dm³. Mutagenność M wody modelowej badanej testem *Salmonella* z zastosowaniem frakcji wynosiła od 121 do 618 rew./dm³ i nie wykazywała zależności takiej jak w przypadku wyników uzyskanych testem Amesa bez zastosowania frakcji mikrosomalnej.

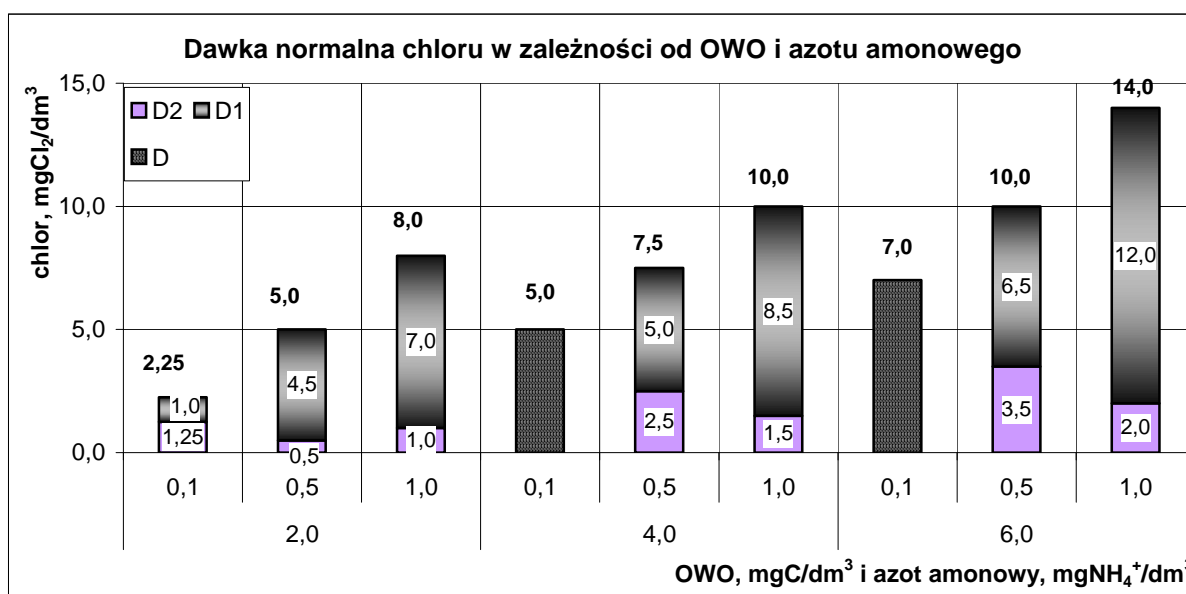


Wykres 12. Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem

Wyniki mutagenności M układały się tak samo jak wyniki dla dawki chloru oraz chloropochodnych (AOX i HAA) w zależności od zawartości OWO i stężenia azotu amonowego, czyli wzrost stężenia azotu amonowego powodował zwiększenie się mutagenności M, dawki chloru a co za tym idzie stężenia UPCh, przy stałym stężeniu OWO oraz następował ich wzrost przy zwiększaniu się stężenia OWO.

1.2. Woda modelowa dezynfekowana chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – etap IB

W celu ustalenia wpływu na aktywność mutageną wody zawartości OWO, stężenia azotu amonowego, dawki chloru i dwutlenku chloru, wodę modelową w tym etapie badań dezynfekowano chlorem po uprzednim wprowadzeniu do niej dwutlenku chloru w dawce 0,4 mgClO₂/dm³. W tym wariantcie do dezynfekcji wody modelowej stosowano dawki chloru od 0,25 do 9,0 mgCl₂/dm³. Wyniki badań przedstawiono na Wykresie 13.



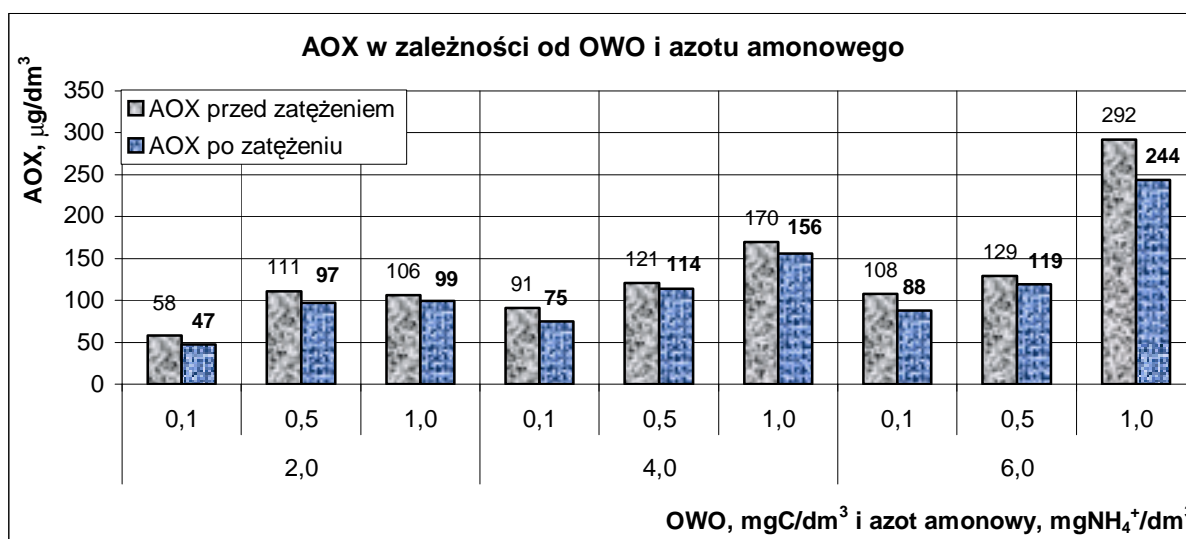
Wykres 13. Dawka normalna chloru zastosowana do dezynfekcji wody modelowej po wcześniejszym wprowadzeniu dwutlenku chloru

Dawka normalna chloru rosła wraz ze wzrostem stężenia OWO i azotu amonowego od 2,25 do 14,0 mgCl₂/dm³. Udział D₁ w dawce normalnej wynosił od 44 do 90 % i również wzrastał wraz ze wzrostem OWO i N-NH₄⁺ natomiast udział D₂ był od 10 do 56 % i nie wykazywał takiej zależności. Zwiększenie OWO z 2,0 do 4,0 mgC/dm³ powodowało wzrost dawki chloru 2,2 razy dla stężenia azotu amonowego 0,1 mgNH₄⁺/dm³. W pozostałych przypadkach wzrost ten był bliski bądź równy 1,4 razy.

1.2.1. Uboczne produkty dezynfekcji wody modelowej – etap IB

W rezultacie dezynfekcji wody modelowej, zawierającej związki organiczne, chlorem po wcześniejszym zastosowaniu dwutlenku chloru powstaje szereg produktów ubocznych procesu, oznaczanych jako AOX (Wykres 14) i HAA (Wykres 15a, b).

Dwutlenek chloru przed chlorowaniem wody zastosowano w celu obniżenia potencjalnej mutagenności wody modelowej.



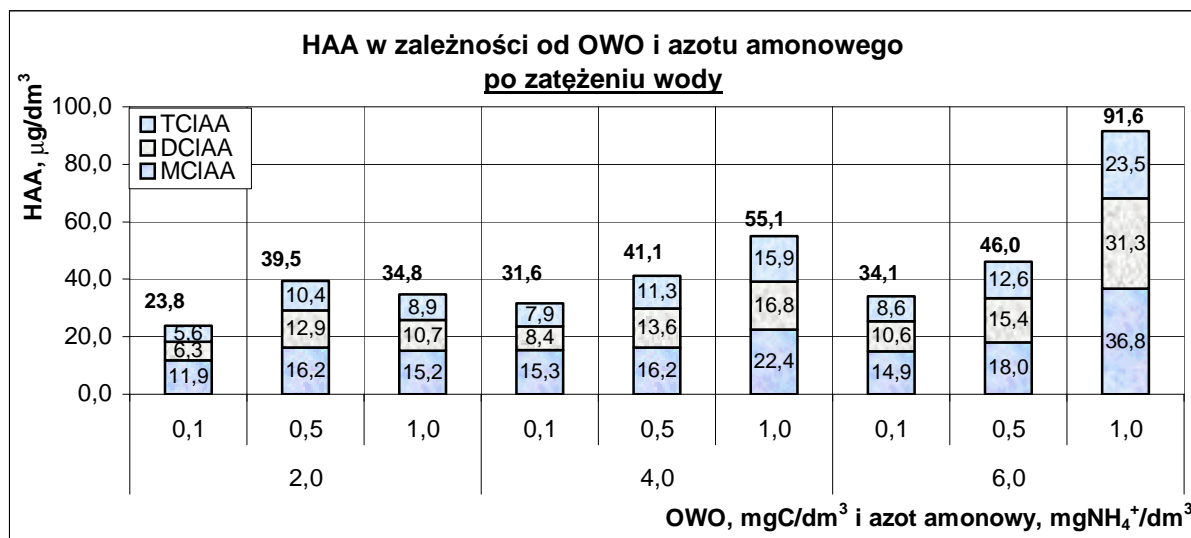
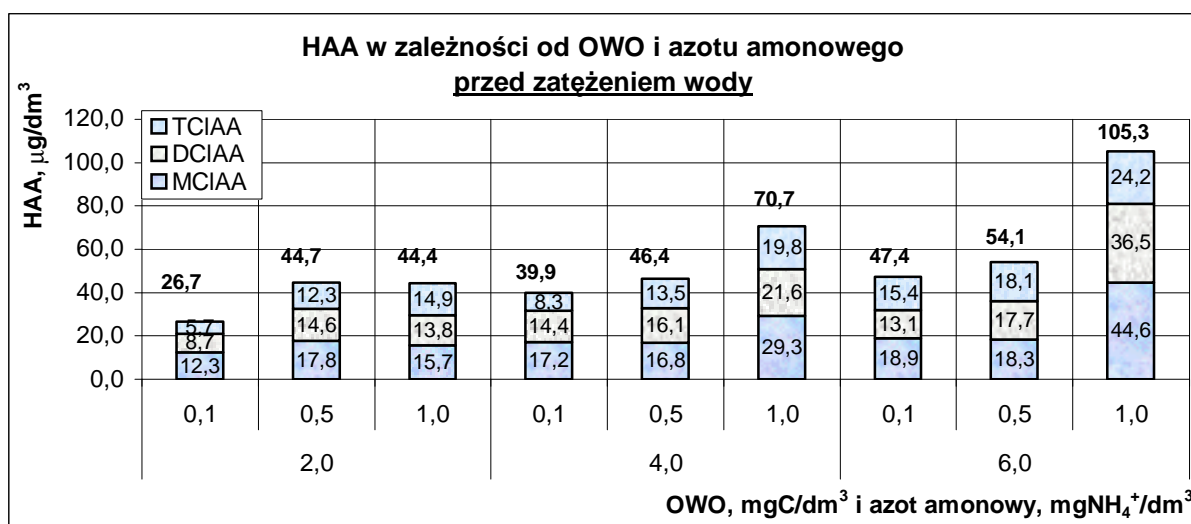
Wykres 14. AOX powstałe w wodzie modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed chlorowaniem

W tym wariancie wzrost dawki chloru powodował przyrost AOX od 58 µgCl/dm³ przy najniższym stężeniu azotu amonowego i OWO do 292 µgCl/dm³ przy najwyższych stężeniach. Odzysk AOX w procesie ekstrakcji wynosił średnio 88 % (81-94%). Dla AOX oznaczanych w wodzie modelowej przed i po jej zateżeniu zwiększenie OWO z 2,0 do 4,0 mgC/dm³ powodowało wzrost AOX - 1,6 razy dla stężenia azotu amonowego 0,1 i 1,0 mgNH₄⁺/dm³ i 1,7 dla 1,0 mgNH₄⁺/dm³ przy zwiększeniu OWO z 4,0 do 6,0 mgC/dm³. W pozostałych przypadkach wzrost ten był równy średnio 1,1 razy.

Przed procesem zateżania udział sumy kwasów chlorooctowych w adsorbowlanych halogenowych związkach organicznych wynosił 42 % (36-46 %) a po procesie zateżania zmniejszył się do 39 % (35-51 %). Udział kwasów chlorooctowych w AOX w wodzie modelowej wynosił dla: MCAA – 17 (14-21 %), DCAA – 13 % (12-16 %) a dla TCAA–12% (9-14) a po jej zateżaniu był podobny w przypadku kwasów di- i tri-chlorooctowego i wynosił odpowiednio: 12 % (11-13 %) i 10 % (9-12 %) i taki sam dla kwasu monochlorooctowego -17% (14-25 %).

Stężenie kwasów mono-, di- i trichlorooctowego wzrastało również wraz ze wzrostem zawartości OWO i stężeniem azotu amonowego, w wodzie modelowej przed zateżaniem, od wartości 5,6 µg/dm³ (TCAA) do 44,6 µg/dm³ (MCAA) a po zateżaniu od 5,7 µg/dm³ (TCAA) do 36,8 µg/dm³ (MCAA). Największy udział w sumie kwasów chlorooctowych w wodzie modelowej, przed zateżaniem, miał kwas monochlorooctowy – średnio 40 % (34-46 %).

Nieznacznie mniejszy - kwas di- i trichlorooctowy i wynosił odpowiednio: 35 % (28-36 %) i 28 % (21-34 %). Po zateżeniu wody modelowej również największy udział w sumie kwasów chlorooctowych miał MCAA - średnio 43 % (39-50 %) i był on o 3% wyższy niż w wodzie przed zateżeniem, natomiast udział kwasów DCAA i TCAA i wynosił odpowiednio: 31 % (26-34 %) i 26 % (24-29%). Średnia skuteczność zateżenia wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla sumy HAA wynosiła 83 % (72-89 %) a dla poszczególnych kwasów chlorooctowych osiągnęła wartości: 90 % (76-98 %) dla MCAA, 79 % (58-88 %) dla DCAA a dla TCAA – 80 % (56-98). Dla HAA oznaczanych w wodzie modelowej przed i po zateżeniu tak jak w przypadku AOX zwiększenie OWO z 2,0 do 4,0 mgC/dm³ powodowało wzrost HAA średnio 1,4 razy dla azotu amonowego 0,1 oraz 1,6 razy dla 1,0 mgN/dm³ i średnio 1,6 dla azotu amonowego 1,0 mgNH₄⁺/dm³ przy zwiększeniu OWO z 4,0 do 6,0 mgC/dm³. W pozostałych przypadkach wzrost ten był równy średnio 1,1 razy.



Wykres 15 a i b. HAA powstałe w chlorowanej wodzie modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru

1.2.2. Badania bioindykacyjne – test Ames – etap IB

Celem badań na wodzie modelowej było ustalenie zależności pomiędzy powstającymi po procesie dezynfekcji mutagennymi zanieczyszczeniami wody a stężeniem ogólnego węgla organicznego i azotu amonowego.

Liczbę rewertantów spontanicznych i indukowanych dla szczepu TA100, w badaniach prowadzonych bez i z zastosowaniem frakcji S9-mix zamieszczono poniżej:

Szczep	LR spontanicznych		LR indukowanych (pozytywnych)	
	- S9 – mix	+ S9 - mix	- S9 – mix	+ S9 - mix
TA100	99-130	124-165	965-1570 dla NQNO	850-860 dla 2-AF

Przy przedstawianiu i obróbce wyników przy użyciu podstawowej statystyki opisowej jak również testowej w tabelach i na wykresach ramka-wąsy (box-plotach) użyto oznaczeń próbek wody według schematów:

1) wm_ClO_2 i $Cl_2_a_b$, gdzie:

- wm_ClO_2 i Cl_2 – oznacza ekstrakt wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem, badanej testem Ames bez zastosowania frakcji mikrosomalnej S9,
- a – stężenie OWO, mgC/dm^3 ,
- b – stężenie azotu amonowego, $mgNH_4^+/dm^3$.

np. wm_ClO_2 i $Cl_2_2_0,1$ – oznacza wodę modelową po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem badaną testem Ames bez zastosowania frakcji mikrosomalnej S9, o wartości OWO = $2,0 mgC/dm^3$ i stężeniu azotu amonowego $0,1 mgNH_4^+/dm^3$

2) $wm_f_Cl_2_a_b$, gdzie:

- $wm_f_ClO_2$ i Cl_2 – oznacza ekstrakt wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem, badanej testem Ames z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej S9,
- a – stężenie OWO, mgC/dm^3 ,
- b – stężenie azotu amonowego, $mgNH_4^+/dm^3$.

np. wm_ClO_2 i $Cl_2_f_2_0,1$ – oznacza wodę modelową po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem, badaną testem Ames z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej S9, o wartości OWO= $2,0 mgC/dm^3$ i stężeniu azotu amonowego $0,1 mgNH_4^+/dm^3$.

1.2.2.1. Wyniki testu Ames wraz z podstawową statystyką opisową – etap IB

Poniżej przedstawiono podstawową statystykę opisową wyników testu Ames dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wprowadzeniu dwutlenku chloru dla wariantów bez (Tabela 13) i z zastosowaniem frakcji S9 mix (Tabela 14), czyli wyliczono średnią liczbę

rewertantów dla danej próbki wody wraz z odchyleniem standardowym jak również określono minimum i maximum, medianę oraz rangę i współczynnik zmienności CV.

Tabela 13. Statystyka opisowa - woda modelowa IB- TA100-S9 mix

Zatężenie próbny	wm_ ClO ₂ iCl ₂ _2_0,1	wm_ ClO ₂ iCl ₂ _2_0,5	wm_ ClO ₂ iCl ₂ _2_1,0	wm_ ClO ₂ iCl ₂ _4_0,1	wm_ ClO ₂ iCl ₂ _4_0,5	wm_ ClO ₂ iCl ₂ _4_1,0	wm_ ClO ₂ iCl ₂ _6_0,1	wm_ ClO ₂ iCl ₂ _6_0,5	wm_ ClO ₂ iCl ₂ _6_1,0
średnia	135	125	140	119	172	158	128	140	170
odchylenie standardowe	22	23	18	17	31	41	32	28	43
min	105	92	111	70	122	98	83	95	111
max	180	171	183	145	255	262	218	202	277
mediana	134	118	135	122	173	148	119	144	163
ranga	75	79	72	75	133	164	135	107	166
CV	16%	19%	13%	14%	18%	26%	25%	20%	25%

Tabela 14. Statystyka opisowa - woda modelowa IB – TA100+S9 mix

Statystyka opisowa	wm_f_ ClO ₂ iCl ₂ _2_0,1	wm_f_ ClO ₂ iCl ₂ _2_0,5	wm_f_ ClO ₂ iCl ₂ _2_1,0	wm_f_ ClO ₂ iCl ₂ _4_0,1	wm_f_ ClO ₂ iCl ₂ _4_0,5	wm_f_ ClO ₂ iCl ₂ _4_1,0	wm_f_ ClO ₂ iCl ₂ _6_0,1	wm_f_ ClO ₂ iCl ₂ _6_0,5	wm_f_ ClO ₂ iCl ₂ _6_1,0
średnia	125	124	123	125	133	127	118	101	120
odchylenie standardowe	15	12	13	39	27	16	11	9	11
min	98	105	104	32	102	89	100	84	101
max	157	153	147	174	199	155	142	123	144
mediana	125	122	122	128	125	130	117	101	123
ranga	59	48	43	142	97	66	42	39	43
CV	12%	10%	10%	31%	21%	13%	10%	9%	9%

W przypadku wyników testu Ames w wariancie bez zastosowania frakcji mikrosomalnej analizując wartości średnie dla próbek trudno było stwierdzić ogólną tendencję. Średnia liczba rewertantów dla dziewięciu ekstraktów wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem mieściła się w granicy od 119 rewertantów w próbce wm_ClO₂iCl₂_4_0,1 do 172 w próbce wm_ClO₂iCl₂_4_0,5. Podobnie układały się wyniki dla wartości minimalnych (od 70 do 122 rewertantów) a w przypadku maksymalnych najwyższą wartość 277 rewertantów osiągnięto w próbce wm_ClO₂iCl₂_6_1,0. Wartość mediany nie odbiegała znacząco od wartości średniej i w większości przypadków była mniejsza od średniej. Na tej podstawie można wnioskować, że rozkład próbek był prawostronnie skośny.

Duże odchylenie standardowe obserwowano dla próbek o stężeniu azotu amonowego 0,5 i 1,0 mgNH₄⁺/dm³ i OWO 4,0 oraz 6,0 mgC/dm³. Spowodowane to było głównie dużą wartością maksymalną dla tych próbek. Dla tych próbek ranga również była wysoka, przy stosunkowo niskiej wartości minimalnej.

Zmienność danych nie była wysoka dla poszczególnych próbek. Najwyższą zmienność obserwowano dla próbek wm_ClO₂iCl₂_4_1,0 i wm_ClO₂iCl₂_6_0,1 oraz wm_ClO₂iCl₂_6_0,5.

W przypadku próbek wody badanych z zastosowaniem frakcji wartości statystyk opisowych były do siebie zbliżone. Jedynie wyróżniała się próbka $wm_f_ClO_2iCl_2_4_0,1$, gdzie zarówno odchylenie standardowe jak i współczynnik zmienności były znacznie większe od pozostałych. Na tej podstawie można wnioskować, że mogło to być spowodowane dużą różnicą między wartością minimalną a maksymalną, czyli pojawiły się wartości, które znacznie odbiegały od pozostałych.

1.2.2.2. Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody modelowej - IB

W analizie wyników dotyczących rozkładu prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu jako utleniacza dwutlenku chloru również wzięto pod uwagę głównie wyniki uzyskane testem Shapiro-Wilka, ponieważ pozostałe dwa testy są testami asymptotycznymi, czyli działającymi poprawnie dla próbek o dużej liczności. Statystyka testowa wyników testu Amesa z i bez zastosowania aktywacji metabolicznej została zamieszczona w Tabelach 15 i 16.

Tabela 15. Statystyka testowa - woda modelowa IB - TA100-S9 mix

Próba	N	Testy normalności			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnova	Lilieforsa	Shapiro-Wilka	
$wm_ClO_2iCl_2_2_0,1$	32	$p > 0,20$	$p > 0,20$	0,098613	normalny
$wm_ClO_2iCl_2_2_0,5$	32	$p > 0,20$	$p < 0,05$	0,013878	brak normalności
$wm_ClO_2iCl_2_2_1,0$	32	$p < 0,15$	$p < 0,01$	0,009593	brak normalności
$wm_ClO_2iCl_2_4_0,1$	32	$p > 0,20$	$p < 0,15$	0,008037	brak normalności
$wm_ClO_2iCl_2_4_0,5$	31	$p > 0,20$	$p > 0,20$	0,089547	normalny
$wm_ClO_2iCl_2_4_1,0$	32	$p > 0,20$	$p < 0,10$	0,043136	brak normalności
$wm_ClO_2iCl_2_6_0,1$	34	$p > 0,20$	$p < 0,10$	0,012218	brak normalności
$wm_ClO_2iCl_2_6_0,5$	34	$p > 0,20$	$p > 0,20$	0,321674	normalny
$wm_ClO_2iCl_2_6_1,0$	34	$p > 0,20$	$p > 0,20$	0,091976	normalny

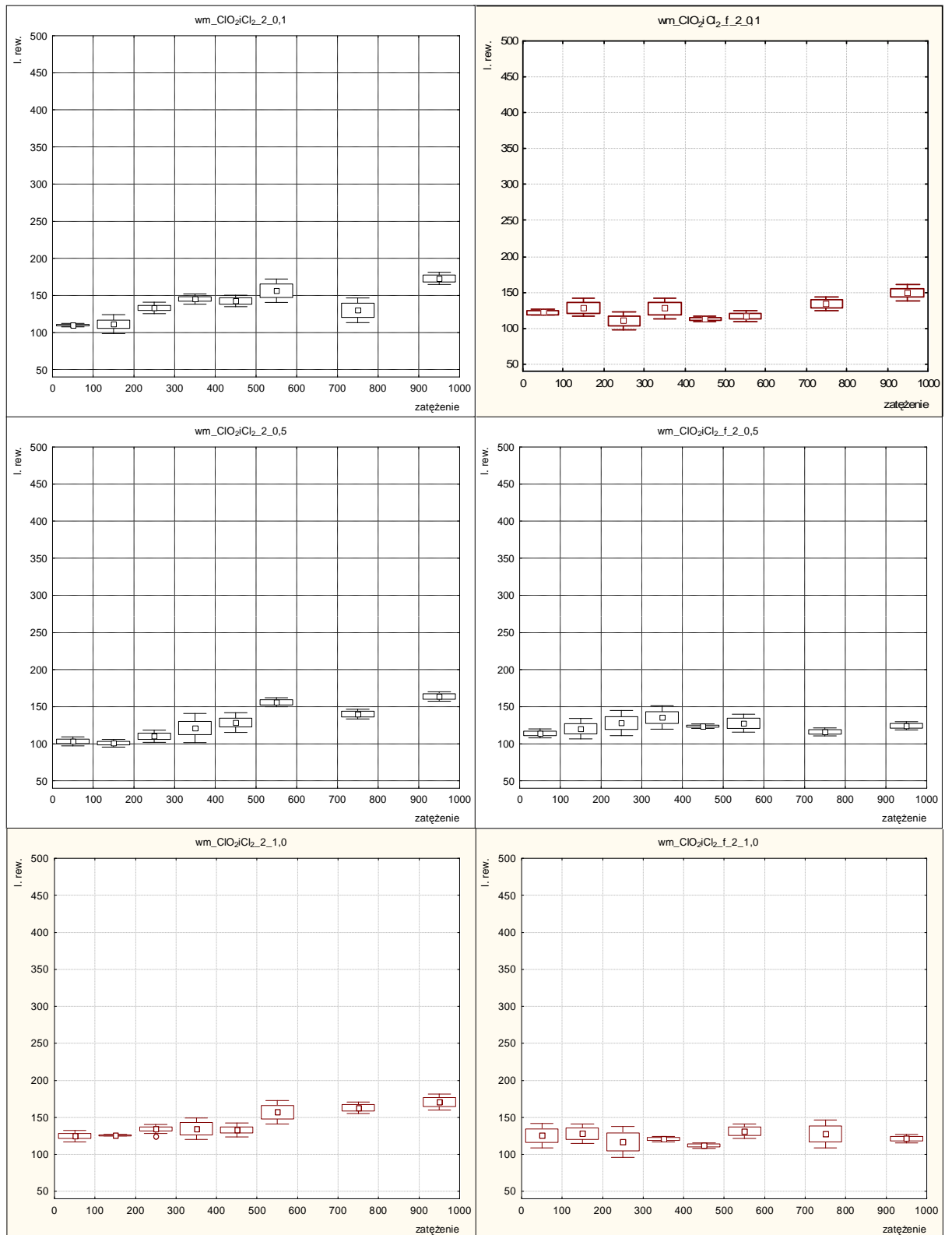
Tabela 16. Statystyka testowa - woda modelowa IB - TA100+S9 mix

Próba	N	Testy normalności			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnova	Lilieforsa	Shapiro-Wilka	
$wm_ClO_2iCl_2_f_2_0,1$	24	$p > 0,20$	$p < 0,10$	0,193184	normalny
$wm_ClO_2iCl_2_f_2_0,5$	29	$p > 0,20$	$p > 0,20$	0,239201	normalny
$wm_ClO_2iCl_2_f_2_1,0$	29	$p > 0,20$	$p > 0,20$	0,281192	normalny
$wm_ClO_2iCl_2_f_4_0,1$	34	$p > 0,20$	$p < 0,05$	0,007547	brak normalności
$wm_ClO_2iCl_2_f_4_0,5$	32	$p < 0,15$	$p < 0,01$	0,001232	brak normalności
$wm_ClO_2iCl_2_f_4_1,0$	34	$p > 0,20$	$p > 0,20$	0,556112	normalny
$wm_ClO_2iCl_2_f_6_0,1$	34	$p > 0,20$	$p < 0,10$	0,257461	normalny
$wm_ClO_2iCl_2_f_6_0,5$	34	$p > 0,20$	$p > 0,20$	0,510007	normalny
$wm_ClO_2iCl_2_f_6_1,0$	29	$p > 0,20$	$p > 0,20$	0,484157	normalny

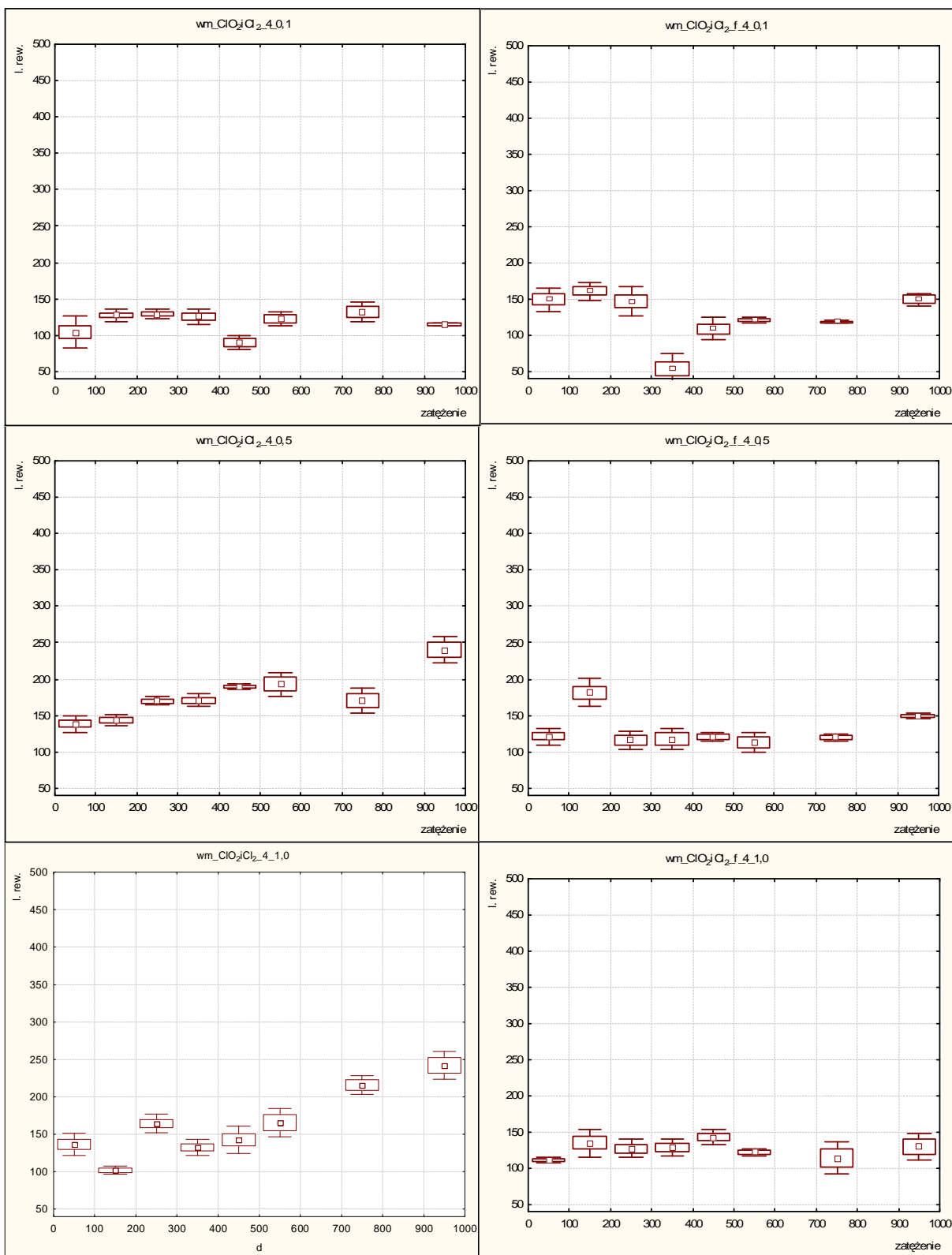
Zastosowane testy statystyczne (Tabela 15 i 16) wykazały, że aż siedem spośród osiemnastu próbek wody nie miały rozkładu normalnego w tym pięć z nich to były wody

badane testem Ames bez zastosowania frakcji (OWO=2,0 mg/dm³ i N-NH₄⁺=0,5 i 1,0 mgNH₄⁺/dm³, OWO 4,0 mgC/dm³ i N-NH₄⁺ = 0,1 mgNH₄⁺/dm³ oraz OWO=6,0 mgC/dm³ i N-NH₄⁺=0,1 i 0,5 mgNH₄⁺/dm³) i dwie z frakcją dla zawartości OWO 4,0 mgC/dm³ i stężenia azotu amonowego 0,1 i 0,5 mgNH₄⁺/dm³.

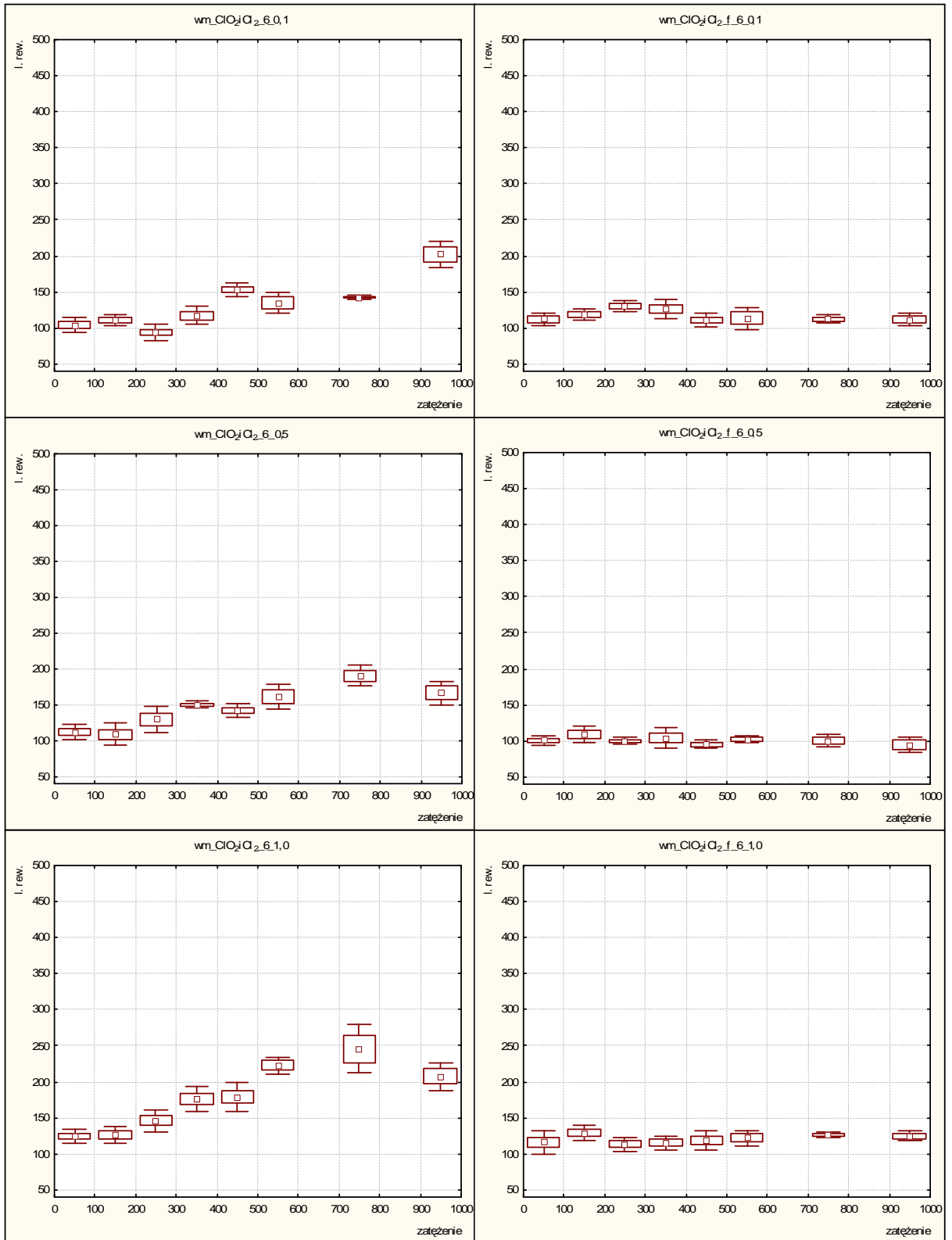
1.2.2.3. Krzywa zależności dawka–odpowiedź dla wody modelowej – etap IB



Wykres 16. Zależność dawka- odpowiedź dla wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru dla $OWO=2,0 \text{ mgC/dm}^3$



Wykres 17. Zależność dawka- odpowiedź dla wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru dla $OWO=4,0 \text{ mgC/dm}^3$



Wykres 18. Zależność dawka- odpowiedź dla wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru dla $OWO=6,0\text{ mgC/dm}^3$

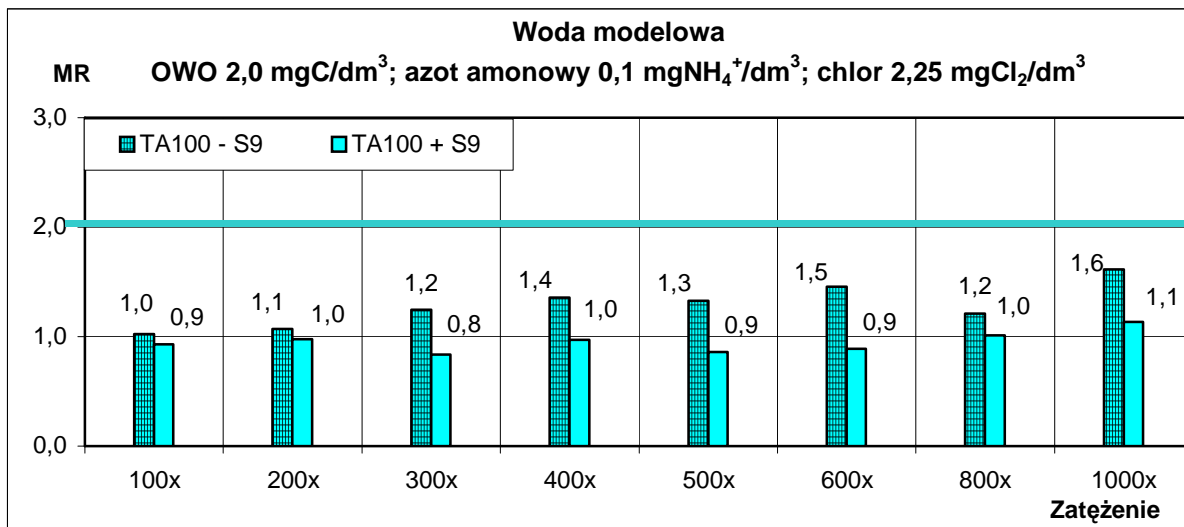
Na Wykresach 16-18 przedstawiono charakter krzywej zależności dawka–odpowiedź dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru jako wstępnego utleniacza badanej przy użyciu szczepu TA100 z i bez frakcji S9-mix.

W przypadku dwóch próbek wody, dla OWO=6,0 mgC/dm³ i stężenia azotu amonowego 0,5 i 1,0 mgNH₄⁺/dm³ (bez frakcji) krzywa miała charakterystyczny dla testu *Salmonella* przebieg - wraz ze wzrostem zanieczyszczenia wody rosła liczba rewertantów, aż do osiągnięcia wartości maksymalnej, po której dalsze zanieczyszczenie wody powodowało spadek ilości rewertantów, czyli pojawiał się tzw. efekt toksyczny. Na kolejnych trzech wykresach wraz ze wzrostem zanieczyszczenia rosła liczba rewertantów osiągając dla współczynnika koncentracji 1000 wartości maksymalne. Taki przebieg miały wody badane testem Ames bez zastosowania frakcji dla stężenia OWO=4,0 mgC/dm³ i azotu amonowego 0,5 i 1,0 mgNH₄⁺/dm³ oraz dla OWO=6 mgC/dm³ i stężenia N-NH₄⁺ wynoszącego 0,1 mgNH₄⁺/dm³. Dla pozostałych trzynastu próbek wody niezależnie od wzrostu zanieczyszczenia próbki nie rosła liczba rewertantów, czyli uzyskane wyniki układały się w postaci linii prostej. Podobnie jak dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem, w większości przypadków nie zaobserwowano bardzo dużych różnic w wartości SE oraz SD dla poszczególnych zanieczyszczeń. Wyjątek stanowi np. próbka wm_CIO2iCl2_6_1,0, gdzie dla zanieczyszczenia 800 i 1000 zaobserwowano dużo większe wartości statystyk niż w przypadku pozostałych zanieczyszczeń (Wykres 18).

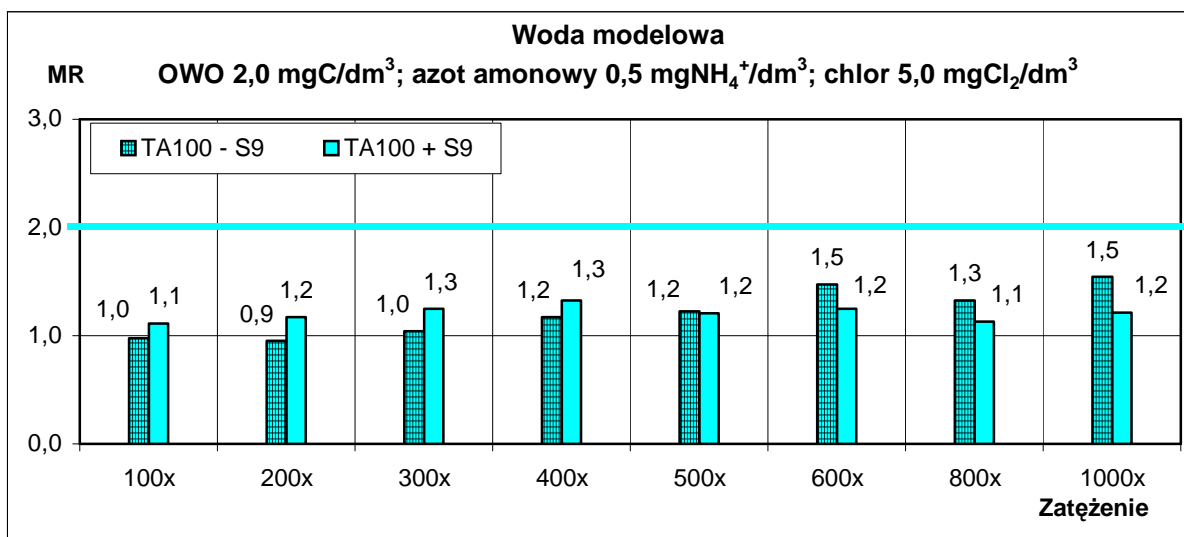
1.2.2.4. Współczynnik mutagenności (MR) wody modelowej – etap IB

Wyniki testów Ames przeprowadzonych na ekstraktach wód modelowych po wprowadzeniu do wody dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem, badanych za pomocą szczepu testowego bakterii *Salmonella typhimurium* TA100 z aktywacją jak i bez aktywacji metabolicznej przez frakcję mikrosomalną wątroby szczurów S9-mix. przedstawiono na Wykresach od 19a do 21c. Przebadanie tych samych dziewięciu wariantów wody modelowej co w etapie IA, tylko przy zastosowaniu przed dezynfekcją chlorem dwutlenku chloru dało pogląd, jaki wpływ na obniżenie się ilości powstających ubocznych produktów chlorowania ma zastosowanie dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem i przy jakich stężeniach OWO i azotu amonowego, można spodziewać się obecności w wodzie do picia zanieczyszczeń o potencjalnych właściwościach mutagennych.

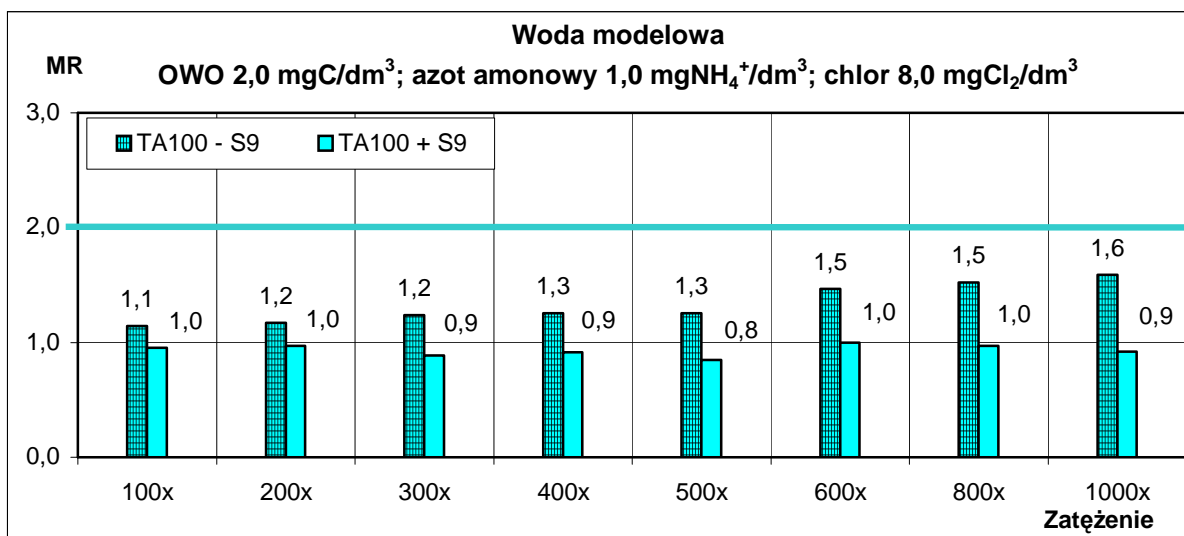
a)



b)

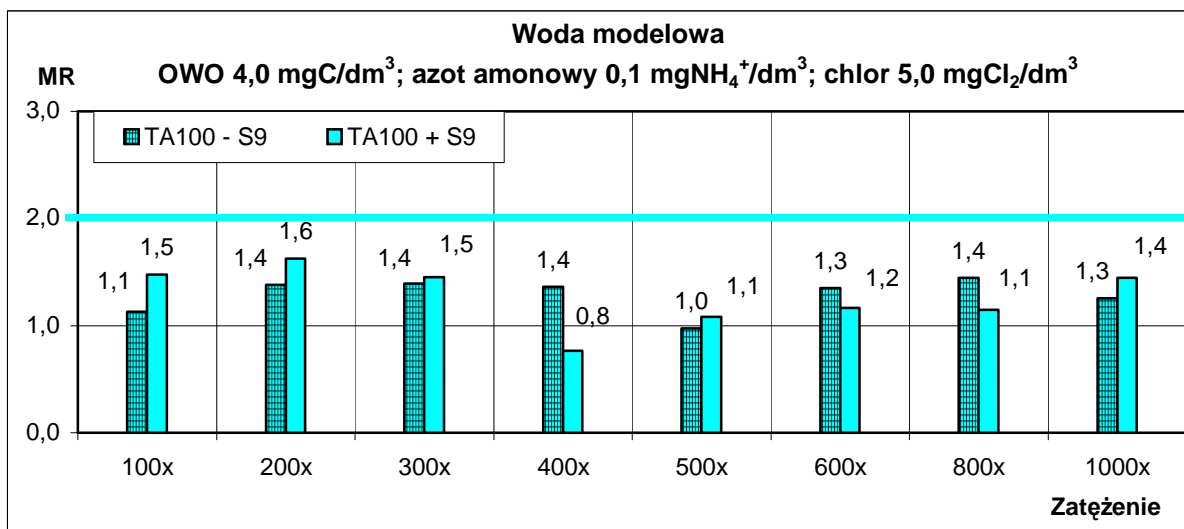


c)

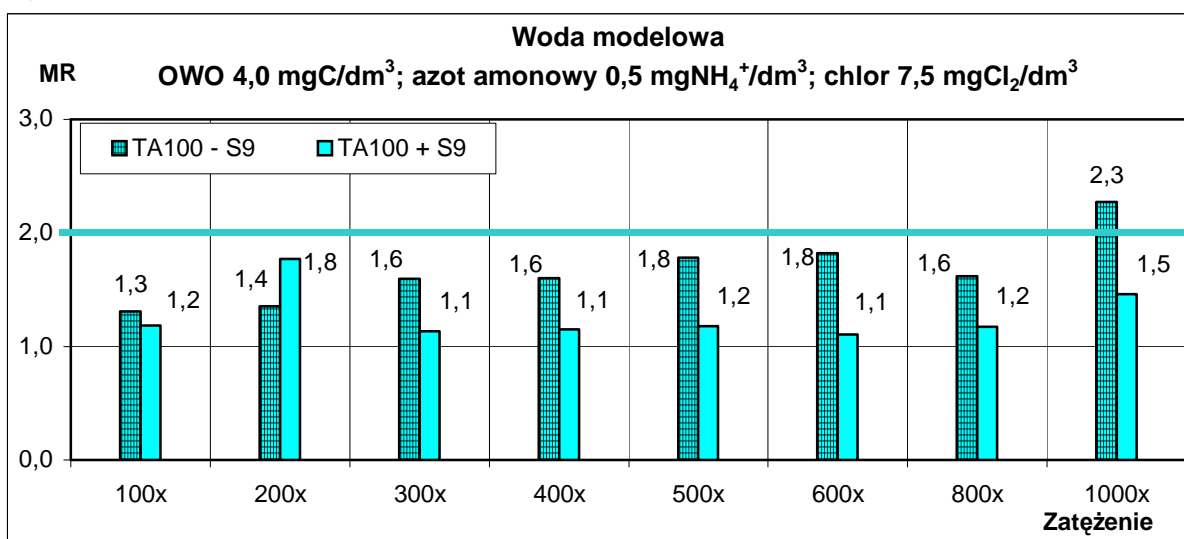


Wykres 19 a, b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru dla OWO=2,0 mgC/dm³

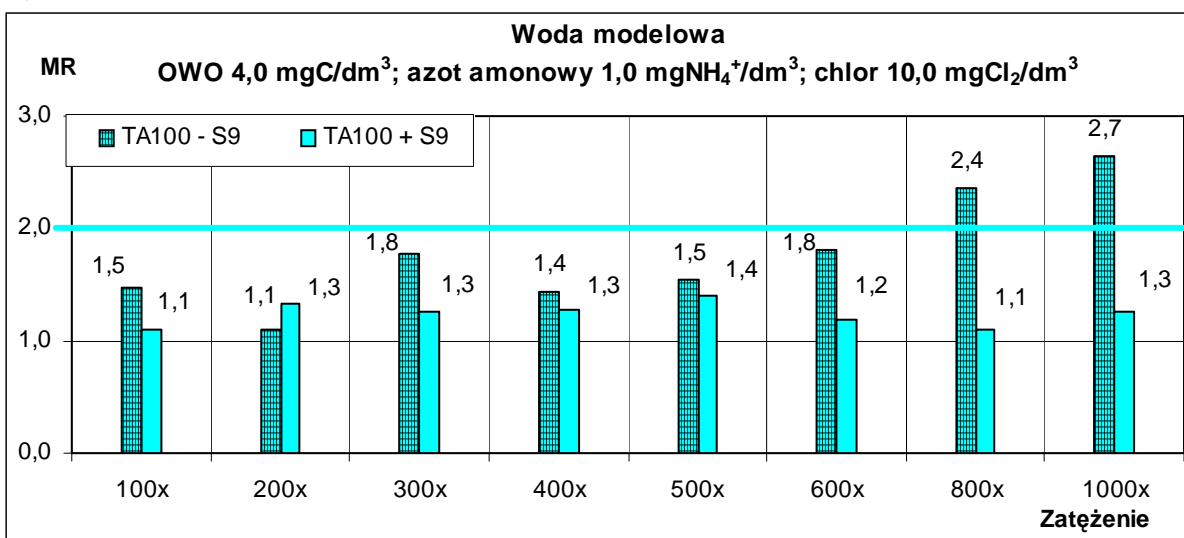
a)



b)

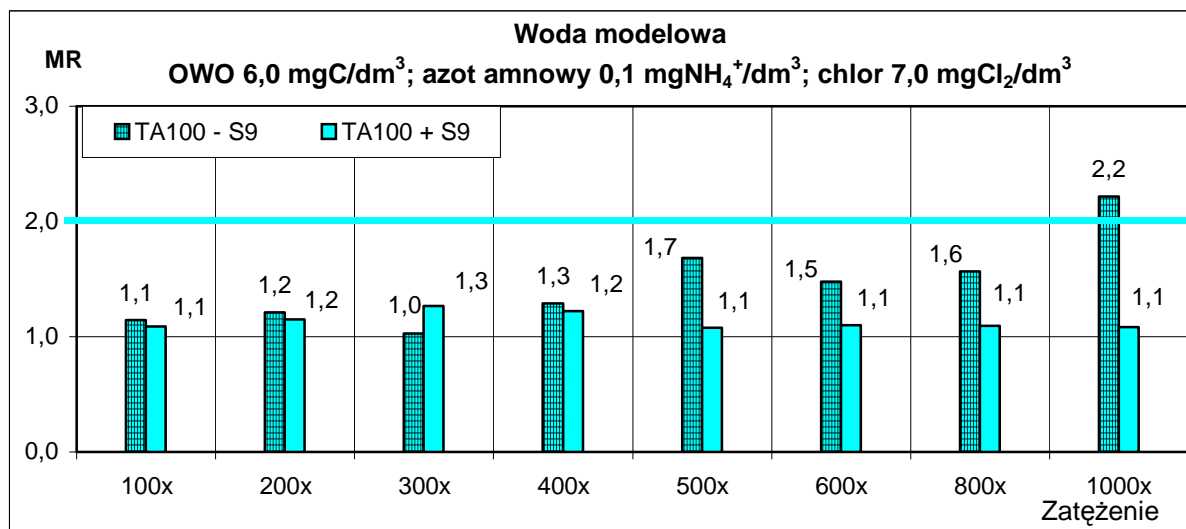


c)

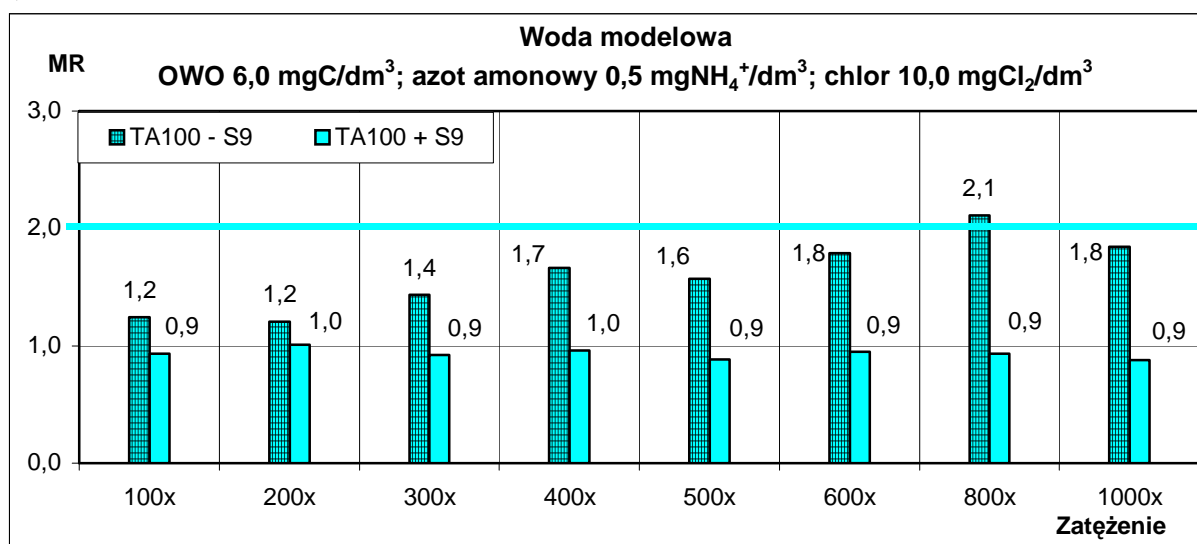


Wykres 20 a, b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru dla OWO = 4,0 mgC/dm³

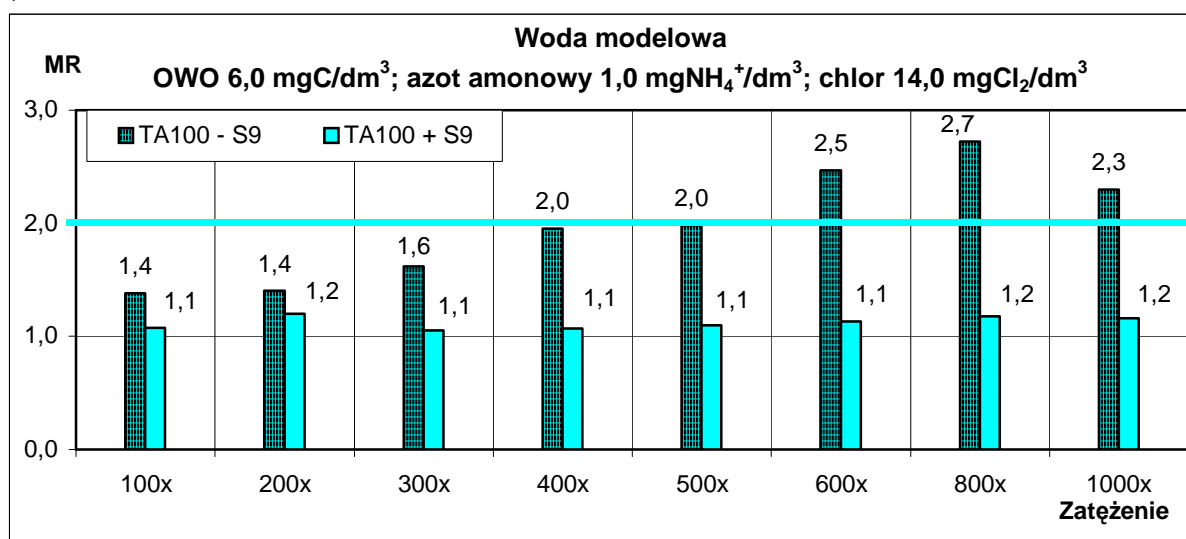
a)



b)



c)



Wykres 21 a, b, c. MR wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru dla OWO = 6,0 mgC/dm³

Badania, przy użyciu testu Ames, ekstraktów wody modelowej o zawartości OWO na poziomie $2,0 \text{ mgC/dm}^3$ niezależnie od stężenia azotu amonowego ($0,1$; $0,5$ i $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$) - Wykres 19 a,b,c, oraz dla $\text{OWO}=4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i $\text{N-NH}_4^+=0,1 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ z frakcją S9-mix jak i bez niej (Wykres 20 a) nie wykazały przekroczenia wartości wskaźnika mutagenności powyżej $2,0$.

Dla wody modelowej zawierającej ogólny węgiel organiczny na poziomie $4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i dla azotu amonowego $0,5$ i $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ oraz dla $\text{OWO}= 6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i dla trzech badanych stężeń azotu amonowego (Wykres 20 b, c i 21a, b, c) badana woda wykazywała potencjalne własności mutagenne. Wartość wskaźnika mutagenności zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości węgla organicznego i stężenia azotu amonowego.

Dla ekstraktów wody modelowej o zawartości $\text{OWO}=4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężeniu azotu amonowego $0,1 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ (Wykres 20 a) wskaźnik mutagenności MR nie przekroczył wartości $2,0$ dla wszystkich zateżeń wody. Analogicznie jak w przypadku poprzednich wód modelowych, po zastosowaniu frakcji mikrosomalnej z wątroby szczura, nie zaobserwowano dodatnich wyników testu Ames.

Dla wariantu, w którym zawartość $\text{OWO}=4,0 \text{ mgC/dm}^3$ a stężenie azotu amonowego wynosiło $0,5 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ (Wykres 20 b) zaobserwowano wyniki dodatnie testu Ames przy zateżeniu próbki $1\ 000x$. Zastosowanie do testu frakcji mikrosomalnej, dla każdego zateżenia wody w tym wariantcie dało również wyniki na poziomie jedności.

W przypadku ekstraktu wody modelowej, o zawartości ogólnego węgla organicznego $4,0 \text{ mgC/dm}^3$ i azotu amonowego równego $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ (Wykres 20 c), charakter mutagenny wykazano w najwyższych zateżeniach wody $800x$ i $1\ 000x$. I tak jak w poprzednich przypadkach próbki wody nie wykazywały potencjalnych własności mutagennych po zastosowaniu frakcji mikrosomalnej z wątroby szczurów.

W wariantcie wody modelowej o zawartości ogólnego węgla organicznego równego $6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężeniu azotu amonowego równym $0,1 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ (Wykres 21 a) dodatnie wyniki testu Ames uzyskano tylko w przypadku zateżenia $800x$, a monooksydazy frakcji mikrosomalnej zdolne były do detoksykacji badanych mikrozanieczyszczeń.

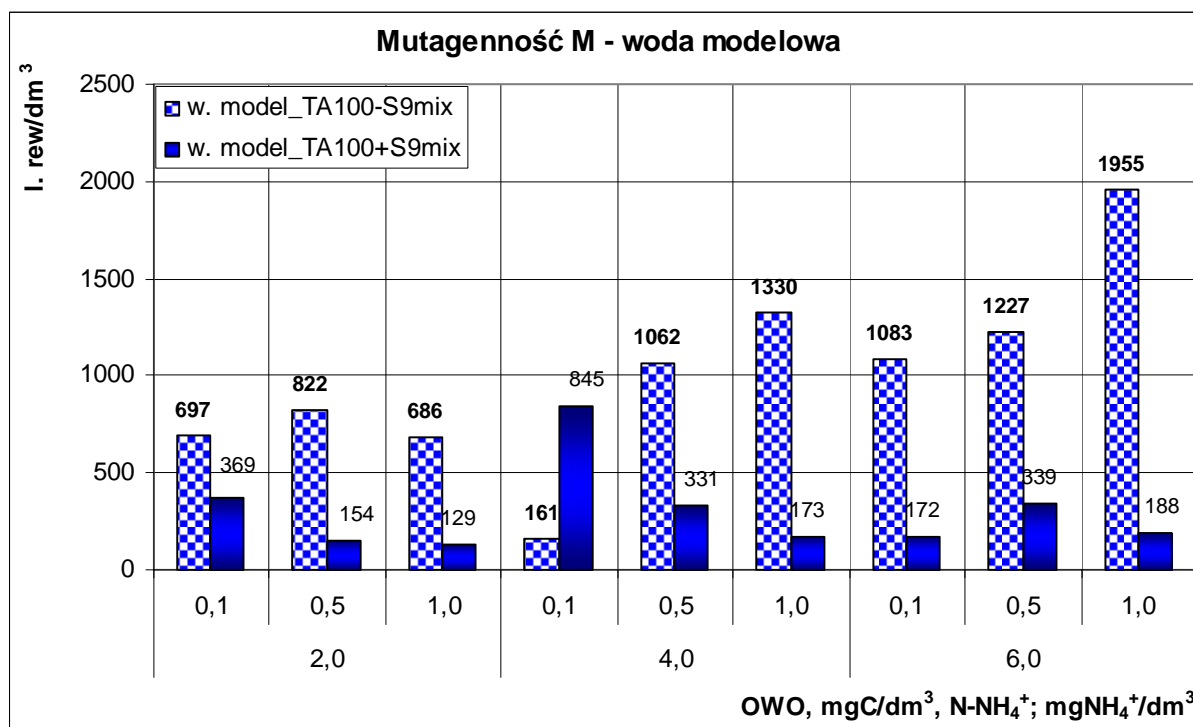
W ekstraktach wody modelowej, o stężeniu $\text{OWO} 6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i azotu amonowego $0,5 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$, zateżenie mikrozanieczyszczeń wody $800x$ powodowało wystąpienie efektu potencjalnej mutagenności (Wykres 21 b). I tak jak w poprzednich wariantach wskaźnik mutagenności MR był na poziomie jedności po zastosowaniu do testu Ames frakcji S9-mix.

Uzyskane wyniki dla wody modelowej o zawartości $\text{OWO} 6,0 \text{ mgC/dm}^3$ i stężeniu azotu amonowego $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ bez dodatku frakcji mikrosomalnej z wątroby

szczura (Wykres 21 c), wskazują na obecność w wodzie związków potencjalnie mutagennych w zakresie zateżeń 400x ÷ 800x. W tym analizowanym przypadku wskaźnik mutagenności wzrastał tak jak w przypadku wody modelowej dezynfekowanej chlorem, aż do osiągnięcia wartości maksymalnej dla wszystkich badanych wariantów wody i wynosił dla zateżenia 800x wartość 2,7. W przypadku tej wody zostały osiągnięte najwyższe wartości wskaźnika mutagenności dla badanego zakresu zateżenia od 100x do 1 000x. Jednak wartości te były znacznie niższe niż dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem. Monooksydazy frakcji mikrosomalnej zdolne były do biotransformacji zawartych w badanej wodzie zanieczyszczeń, o czym świadczyła liczba rewertantów indukowanych na poziomie rewersi spontanicznej.

1.2.2.5. Mutagenność M wody modelowej – etap IB

W celu weryfikacji modelu Vartiainena wyniki uzyskane testem Ames przy zastosowaniu szczepu *Salmonella typhiumrium* TA100 przeliczono na mutagenność M określaną jako liczba rewertantów w 1 dm³ wody do picia. Uzyskaną dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym wprowadzeniu dwutlenku chloru mutagenność M przedstawiono na Wykresie 22.



Wykres 22. Obserwowana mutagenność M dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru

Uzyskana dla dziewięciu wariantów wody modelowej mutagenność M badana testem Ames bez zastosowania frakcji mikrosomalnej mieściła się w granicach od 686 rew/dm³ dla

OWO=2,0 mgC/dm³ i N-NH₄⁺=1,0 mgNH₄⁺/dm³ do 1 955 rew/dm³ dla najwyższych stężeń OWO (6,0 mgC/dm³) i N-NH₄⁺ (1,0 mgNH₄⁺/dm³). Wzrost stężenia azotu amonowego powodował zwiększenie się mutagenności M przy stałej zawartości OWO, za wyjątkiem OWO=2,0 mgC/dm³, gdzie niezależnie od stężenia azotu amonowego wartość M była na podobnym poziomie. Uzyskane wyniki nie wykazują podobnej zależności jaka została uzyskana podczas badania testem Ames wody modelowej dezynfekowanej chlorem, chociaż i w tym wariancie najwyższą wartość mutagenności M uzyskano dla najwyższych parametrów badanej wody. Mutagenność M wody modelowej badanej testem *Salmonella* z zastosowaniem frakcji wynosiła od 129 dla OWO=2,0 mgC/dm³ i N-NH₄⁺=1,0 mgNH₄⁺/dm³ do 369 rew./dm³ dla OWO=6,0 mgC/dm³ i N-NH₄⁺=1,0 mgNH₄⁺/dm³.

Również dla wody modelowej wyniki mutagenności M układały się tak samo jak wyniki dla dawki chloru oraz chloropochodnych (AOX i HAA) w zależności od stężenia OWO i azotu amonowego, czyli wzrost stężenia azotu amonowego powodował zwiększenie się mutagenności M, dawki chloru a co za tym idzie AOX i HAA, przy stałym stężeniu OWO oraz następował ich wzrost przy zwiększaniu się stężenia OWO, z nieznacznym zaburzeniem tej tendencji dla OWO równego 2,0 mgC/dm³.

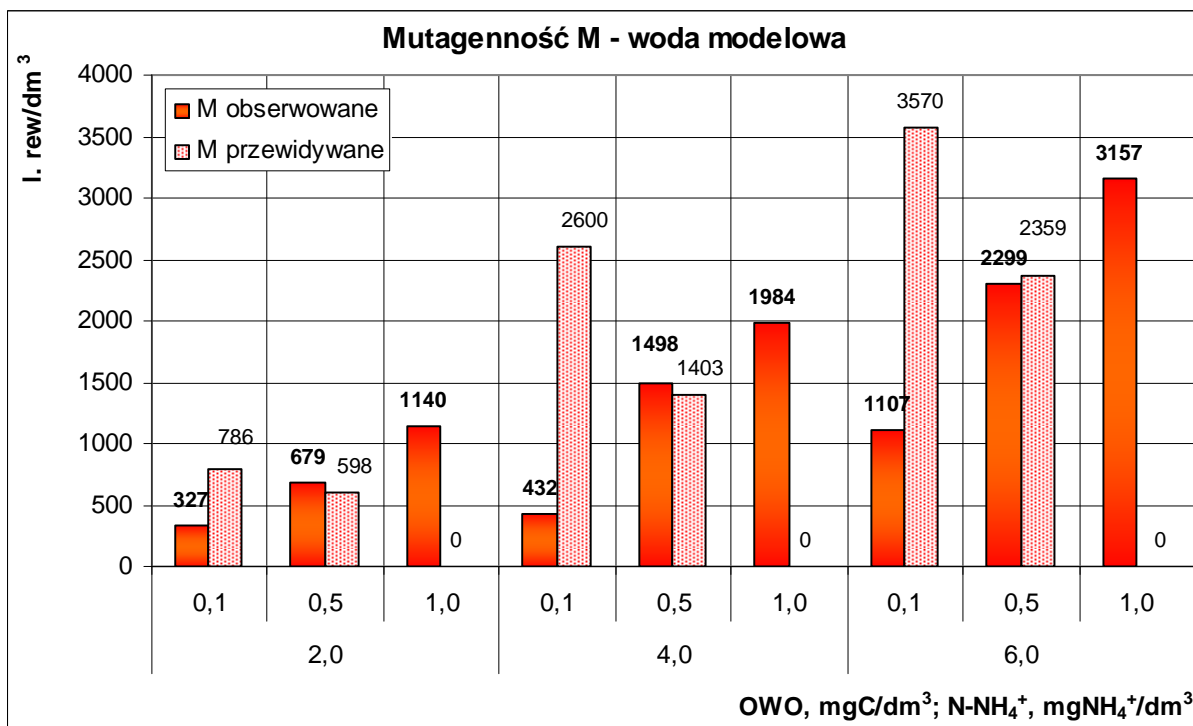
1.3. Próba weryfikacji modelu fińskiego na podstawie badań na wodzie modelowej

W celu weryfikacji modelu Vartiainena do prognozowania potencjalnej mutagenności wody do picia za pomocą tego modelu obliczono mutagenność M wody modelowej badanej w dwóch wariantach dezynfekcji zarówno chlorem jak również chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru jako wstępnego utleniacza i porównano z mutagennością M obserwowaną w teście Ames wykonanym przy użyciu szczepu *S. typhimurium* TA100 bez aktywacji metabolicznej.

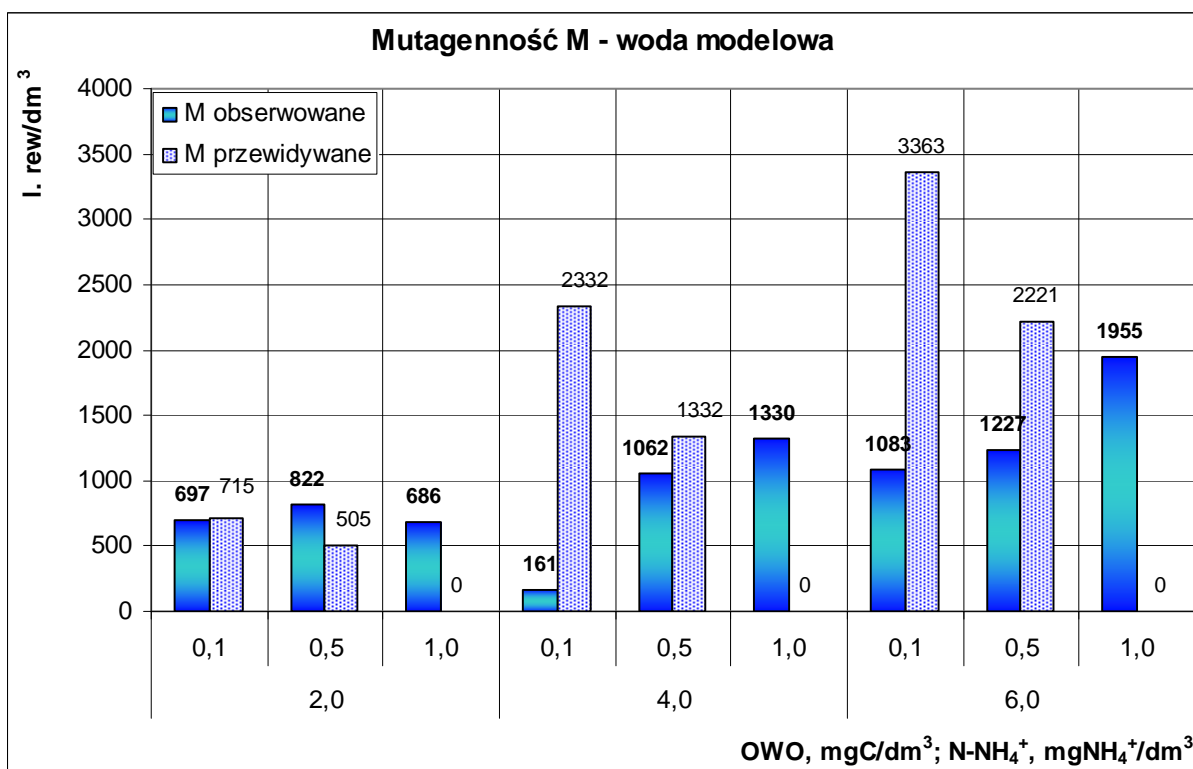
1.3.1. Zastosowanie fińskiego modelu do obliczenia mutagenności wody modelowej

Wyniki mutagenności M prognozowanej modelem i przewidywanej testem Ames zamieszczono na Wykresach 23 i 24.

Na przedstawionych wykresach wyraźnie widać, iż uzyskane testem Ames wyniki mutagenności M dla wody modelowej niezależnie od wariantu dezynfekcji odbiegały od uzyskanych modelem do prognozowania potencjalnej mutagenności wody do picia.



Wykres 23. Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem



Wykres 24. Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru

W przypadku modelu wzrost stężenia azotu amonowego powodował spadek mutagenności M osiągając wartość 0 dla najwyższych stężeń azotu amonowego niezależnie

od zawartości OWO przeciwnie niż w przeprowadzonych badaniach, gdzie wzrost stężenia azotu amonowego powodował wzrost mutagenności M i był tym większy im wyższa była wartość OWO.

1.4. Korelacja wyników uzyskanych dla wody modelowej

Przed przystąpieniem do wykazania zależności lub jej braku pomiędzy podstawowymi wskaźnikami wody modelowej takimi jak OWO, azot amonowy i organiczny, dawka chloru a ubocznymi produktami procesu dezynfekcji (AOX, HAA) oznaczanymi w wodzie przed i po jej zateżnieniu jak również mutagennością M obserwowaną w teście Amesa i przewidywaną modelem Vartiainen przeprowadzono weryfikację hipotezy o tym, że dane pochodzą z populacji o rozkładzie normalnym za pomocą testów: Shapiro-Wilka, Lillieforsa oraz Kołmogorowa-Smirnowa. Wyniki przedstawiono w Tabelach 17 i 18.

W celu uzyskania współzależności lub jej braku pomiędzy uzyskanymi w trakcie badań wynikami dla wody modelowej zastosowano test istotności współczynnika korelacji Pearsona dla danych pochodzących z populacji o rozkładzie normalnym a w przeciwnym przypadku badano istotność korelacji porządku rang Spearmana. W Tabelach 19 i 20 przedstawiono wyniki korelacji dla uzyskanych w pracy wyników. Na czerwono zaznaczone zostały współczynniki korelacji istotne statystycznie.

Tabela 17. Statystyka testowa wyników dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem

Oznaczenia	N	Testy normalności – wartości p			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnowa	Lillieforsa	Shapiro-Wilka	
OWO	9	p > 0,20	p > 0,20	0,037287	brak normalności
N-NH₄⁺	9	p > 0,20	p > 0,20	0,034158	brak normalności
N-org	9	p < 0,15	p > 0,20	0,037287	brak normalności
Cl₂	9	p > 0,20	p > 0,20	0,961489	normalny
AOX	9	p > 0,20	p > 0,20	0,757981	normalny
AOX_ekst.	9	p > 0,20	p > 0,20	0,907217	normalny
HAA	9	p > 0,20	p > 0,20	0,546398	normalny
HAA_ekstr	9	p > 0,20	p > 0,20	0,950503	normalny
MCIAA	9	p > 0,20	p > 0,20	0,489019	normalny
MCIAA_ekstr.	9	p > 0,20	p > 0,20	0,840303	normalny
DCIAA	9	p > 0,20	p > 0,20	0,293961	normalny
DCIAA_ekst	9	p > 0,20	p > 0,20	0,847103	normalny
TclAA	9	p > 0,20	p > 0,20	0,691616	normalny
TCIAA_ekstr.	9	p > 0,20	p > 0,20	0,729405	normalny
M bez frakcji_observ.	9	p > 0,20	p > 0,20	0,586410	normalny
M z frakcją_observ.	9	p > 0,20	p < 0,10	0,409164	normalny
M_przewidyw. - model	9	p > 0,20	p < 0,15	0,122178	normalny

Tabela 18. Statystyka testowa wyników dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru

Oznaczenia	N	Testy normalności – wartości p			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnowa	Lillieforsa	Shapiro-Wilka	
OWO	9	p > 0,20	p > 0,20	0,037287	brak normalności
N-NH ₄ ⁺	9	p > 0,20	p > 0,20	0,034158	brak normalności
N-org	9	p < 0,15	p > 0,20	0,037287	brak normalności
Cl ₂	9	p > 0,20	p > 0,20	0,923375	normalny
AOX	9	p > 0,20	p < 0,05	0,017597	brak normalności
AOX_ekstr.	9	p > 0,20	p < 0,10	0,121912	normalny
HAA	9	p > 0,20	p < 0,10	0,041106	brak normalności
HAA_ekstr	9	p > 0,20	p < 0,15	0,023426	brak normalności
MCIAA	9	p < 0,15	p < 0,01	0,003353	brak normalności
MCIAA_ekstr.	9	p > 0,20	p < 0,05	0,002229	brak normalności
DCIAA	9	p > 0,20	p < 0,10	0,016315	brak normalności
DCIAA_ekst	9	p > 0,20	p < 0,15	0,037000	brak normalności
TCIAA	9	p > 0,20	p > 0,20	0,992500	normalny
TCIAA_ekstr.	9	p > 0,20	p > 0,20	0,142976	normalny
M bez frakcji_obserw.	9	p > 0,20	p > 0,20	0,879601	normalny
M z frakcją_obserw.	9	p > 0,20	p < 0,10	0,003012	brak normalności
M_przewidyw. - model	9	p > 0,20	p > 0,20	0,154723	normalny

W przypadku wody modelowej dezynfekowanej chlorem (Tabela 17) wszystkie zmienne mają rozkład normalny za wyjątkiem ogólnego węgla organicznego, azotu amonowego i organicznego. Dla wody modelowej, do której dawковано dwutlenek chloru przed dezynfekacją chlorem (Tabela 18) mniej niż połowa wyników miała rozkład normalny, natomiast znaczna ich część wykazywała brak normalności.

Dla wody modelowej niezależnie od sposobu dezynfekcji większość uzyskanych wyników wykazywała wysoką korelację dodatnią (Tabela 19 i 20), istotną statystycznie. Jedynie OWO nie wykazywało w obu przypadkach istotnej korelacji z azotem amonowym i organicznym i posiadało dość niski współczynnik korelacji mieszczący się w przedziale 0,11 do 0,74 z większością zmiennych. W przypadku mutagenności M badanej testem Ames z zastosowaniem frakcji dla wody modelowej po zastosowaniu ClO₂ jako wstępnego utleniacza nawet ujemnym (Tabela 20). Natomiast było istotnie dodatnio skorelowane (0,63 i 0,69) w obu przypadkach dezynfekcji wody modelowej z mutagennością M uzyskaną w teście *Salmonella* bez frakcji oraz w przypadku wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym dawkowaniu dwutlenku chloru z kwasem mono- i tri-chlorooctowym oznaczonym w wodzie przed jej zateżeniem. W obu przypadkach wody modelowej współczynniki korelacji były nieistotne statystycznie dla mutagenności M obserwowanej w teście Ames z zastosowaniem frakcji jak również dla mutagenności M przewidywanej modelem Vartiainen i były w większości przypadków niskie i ujemne.

Tabela 19. Korelacja wyników dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem

	OWO	N-NH ₄ ⁺	N-org	Cl ₂	AOX	AOX_ekstr.	HAA	HAA_ekstr.	MCIAA	MCIAA_ekstr.	DCIAA	DCIAA_ekstr.	TCIAA	TCIAA_ekstr.	M bez frakcji obserw.	M z frakcją obserw.	M przewidyw. -model
OWO	1,00	0,00	0,00	0,61	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,37	0,11	0,32	0,26	0,32	0,63	-0,11	0,38
N-NH₄⁺	0,00	1,00	1,00	0,77	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,90	0,95	0,95	0,95	0,95	0,74	0,32	-0,83
N-org	0,00	1,00	1,00	0,77	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95	0,90	0,95	0,95	0,95	0,95	0,74	0,32	-0,83
Cl₂	0,61	0,77	0,77	1,00	0,90	0,93	0,86	0,90	0,84	0,93	0,85	0,88	0,86	0,90	0,95	0,46	-0,23
AOX	0,32	0,95	0,95	0,90	1,00	0,99	0,99	1,00	0,98	0,98	0,98	0,97	0,97	0,99	0,85	0,61	-0,61
AOX_ekstr.	0,32	0,95	0,95	0,93	0,99	1,00	0,98	0,99	0,97	0,99	0,96	0,97	0,97	1,00	0,90	0,57	-0,55
HAA	0,32	0,95	0,95	0,86	0,99	0,98	1,00	0,99	0,99	0,95	0,98	0,97	0,99	0,98	0,84	0,50	-0,62
HAA_ekstr.	0,32	0,95	0,95	0,90	1,00	0,99	0,99	1,00	0,99	0,98	0,98	0,98	0,99	0,99	0,86	0,54	-0,59
MCIAA	0,32	0,95	0,95	0,84	0,98	0,97	0,99	0,99	1,00	0,96	0,96	0,98	0,99	0,97	0,82	0,49	-0,62
MCIAA_ekstr.	0,37	0,90	0,90	0,93	0,98	0,99	0,95	0,98	0,96	1,00	0,93	0,97	0,95	0,97	0,90	0,61	-0,52
DCIAA	0,11	0,95	0,95	0,85	0,98	0,96	0,98	0,98	0,96	0,93	1,00	0,92	0,96	0,97	0,83	0,56	-0,62
DCIAA_ekstr.	0,32	0,95	0,95	0,88	0,97	0,97	0,97	0,98	0,98	0,97	0,92	1,00	0,97	0,96	0,83	0,51	-0,56
TCIAA	0,26	0,95	0,95	0,86	0,97	0,97	0,99	0,99	0,99	0,95	0,96	0,97	1,00	0,97	0,84	0,44	-0,57
TCIAA_ekstr.	0,32	0,95	0,95	0,90	0,99	1,00	0,98	0,99	0,97	0,97	0,97	0,96	0,97	1,00	0,87	0,56	-0,59
M bez frakcji obserwowane	0,63	0,74	0,74	0,95	0,85	0,90	0,84	0,86	0,82	0,90	0,83	0,83	0,84	0,87	1,00	0,36	-0,24
M z frakcją obserwowane	-0,11	0,32	0,32	0,46	0,61	0,57	0,50	0,54	0,49	0,61	0,56	0,51	0,44	0,56	0,36	1,00	-0,58
M przewidyw. - model	0,38	-0,83	-0,83	-0,23	-0,61	-0,55	-0,62	-0,59	-0,62	-0,52	-0,62	-0,56	-0,57	-0,59	-0,24	-0,58	1,00

Tabela 20. Korelacja wyników dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru

	OWO	N-NH ₄ ⁺	N-org	Cl ₂	AOX	AOX_ekstr.	HAA	HAA_ekstr.	MCIAA	MCIAA_ekstr.	DCIAA	DCIAA_ekstr.	TCIAA	TCIAA_ekstr.	M bez frakcji obserw.	M z frakcją obserw.	M przewidyw. -model
OWO	1,00	0,00	0,00	0,58	0,58	0,47	0,58	0,47	0,74	0,45	0,47	0,47	0,69	0,47	0,69	0,21	0,38
N-NH₄⁺	0,00	1,00	1,00	0,80	0,69	0,84	0,69	0,79	0,37	0,69	0,69	0,79	0,69	0,79	0,47	-0,53	-0,86
N-org	0,00	1,00	1,00	0,80	0,69	0,84	0,6	0,79	0,37	0,69	0,69	0,79	0,69	0,79	0,47	-0,53	-0,86
Cl₂	0,58	0,80	0,80	1,00	0,86	0,93	0,86	0,93	0,66	0,79	0,81	0,89	0,97	0,91	0,83	-0,24	-0,25
AOX	0,58	0,69	0,69	0,86	1,00	0,95	1,00	0,98	0,80	0,93	0,93	0,98	0,87	0,98	0,90	-0,20	-0,39
AOX_ekstr.	0,47	0,84	0,84	0,93	0,95	1,00	0,95	1,00	0,67	0,90	0,92	0,98	0,91	0,99	0,87	-0,25	-0,43
HAA	0,74	0,58	0,58	0,86	0,95	0,88	1,00	0,90	0,90	0,81	0,82	0,90	0,95	0,90	0,95	-0,23	-0,25
HAA_ekstr.	0,47	0,79	0,79	0,89	0,98	0,98	0,90	1,00	0,72	0,95	0,95	1,00	0,85	1,0	0,83	-0,23	-0,51
MCIAA	0,74	0,37	0,37	0,66	0,80	0,67	0,80	0,72	1,00	0,72	0,70	0,72	0,83	0,72	0,83	-0,18	-0,12
MCIAA_ekstr.	0,45	0,69	0,69	0,79	0,93	0,90	0,93	0,95	0,72	1,00	1,00	0,95	0,73	0,95	0,73	-0,03	-0,44
DCIAA	0,47	0,69	0,69	0,81	0,93	0,92	0,93	0,95	0,70	1,00	1,00	0,95	0,73	0,95	0,73	0,00	-0,42
DCIAA_ekstr.	0,47	0,79	0,79	0,89	0,98	0,98	0,98	1,00	0,72	0,95	0,95	1,00	0,85	1,00	0,83	-0,23	-0,51
TCIAA	0,69	0,69	0,69	0,97	0,87	0,91	0,87	0,90	0,83	0,73	0,73	0,85	1,00	0,89	0,88	-0,33	-0,25
TCIAA_ekstr.	0,47	0,79	0,79	0,91	0,98	0,99	0,98	0,99	0,72	0,95	0,95	1,00	0,89	1,00	0,87	-0,23	-0,42
M bez frakcji obserwowane	0,69	0,47	0,47	0,83	0,90	0,87	0,90	0,87	0,83	0,73	0,73	0,83	0,88	0,87	1,00	-0,13	-0,29
M z frakcją obserwowane	0,21	-0,53	-0,53	-0,24	-0,20	-0,25	-0,20	-0,23	-0,18	-0,03	0,00	-0,23	-0,33	-0,23	-0,13	1,00	0,46
M przewidyw. - model	0,38	-0,86	-0,86	-0,25	-0,39	-0,43	-0,39	-0,39	-0,12	-0,44	-0,42	-0,51	-0,25	-0,42	-0,29	0,46	1,00

Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem badanej w teście Amesa bez zastosowania frakcji (Tabela 19) była skorelowana dodatnio i istotna statystycznie zarówno z OWO, azotem amonowym jak i organicznym, jak również z chlorem i ubocznymi produktami chlorowania oznaczonymi w wodzie przed i po jej zatężeniu. Nieistotną statystycznie niską korelację wykazywała z mutagennością M obserwowaną w teście Amesa z zastosowaniem frakcji a niską i ujemną dla mutagenności M przewidywanej modelem Vartiainena, co potwierdzało przedstawione wcześniej zależności pomiędzy uzyskanymi wynikami. W przypadku wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym dawkowaniu dwutlenku chloru (Tabela 20) nieistotną statystycznie niską i do tego ujemną korelację mutagenność M wody modelowej badanej bez zastosowania frakcji S9-mix zaobserwowano w stosunku do mutagenności M przewidywanej modelem Vartiainena i obserwowanej w teście z zastosowaniem frakcji oraz niską dodatnią z azotem amonowym i organicznym. Z pozostałymi zmiennymi mutagenność M badana w teście Amesa bez zastosowania frakcji wykazywała korelację dodatnią, wysoką i istotną statystycznie.

1.5. Propozycja wstępnego modelu prognozowania mutagenności wody do picia na podstawie wyników z wody modelowej

Dlatego, iż nie uzyskano korelacji pomiędzy mutagennością M obserwowaną w teście Amesa bez frakcji mikrosomalnej dla wody modelowej niezależnie od wariantu dezynfekcji z mutagennością M przewidywaną modelem Vartiainena a współczynniki korelacji dla tej mutagenności były wysokie, dodatnie i istotne statystycznie z takimi wskaźnikami wody jak OWO, azot amonowy, azot organiczny czy też dawka chloru jak również z chloropochodnymi AOX i HAA zarówno w wodzie przed jak i po zatężaniu, dlatego też podjęto próbę dopasowania nowego modelu regresji wielorakiej do tych danych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań, jak również wyników korelacji oraz na podstawie doniesień literaturowych zaobserwowano, iż na wielkość mutagenności M badanej testem Amesa bez frakcji mikrosomalnej S9-mix dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem wpływ miały: stężenie OWO, azotu amonowego i organicznego oraz dawka chloru. W Tabelach 21 i 22 przedstawiono wyniki dopasowywania modelu regresji wielorakiej dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem i wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym wprowadzeniu dwutlenku chloru.

1.5.1. Dopasowanie modelu regresji wielorakiej do danych z wody modelowej dezynfekowanej chlorem

W Tabeli 21 przedstawiono wyniki dopasowywania modelu regresji wielorakiej dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem.

Tabela 21. Wyniki regresji wielorakiej dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem

	Zmienne x	Wyraz wolny B ₀	Współczynnik regresji B _x	R ²	R ² skorygowany	Błąd standardowy estymacji
I	OWO	-1348	212,5	0,94	0,87	337
	NH ₄ ⁺		202,5			
	N-org		4270			
	Cl ₂		103,8			
II	OWO	-1404	368,1	0,93	0,89	307
	NH ₄ ⁺		1054			
	N-org		3738			
III	OWO	-932,3	368,1	0,92	0,89	306
	NH ₄ ⁺		1618			
IV	OWO	-2007	368,1	0,90	0,86	349
	N-org		9374			
V	OWO	-912,4	342,9	0,92	0,87	335
	NH ₄ ⁺		1492			
	Cl ₂		16,82			
VI	OWO	-1346	178,7	0,93	0,90	302
	N-org		4479			
	Cl ₂		126,3			

Na podstawie uzyskanych wyników widać, iż zarówno współczynniki determinacji R², oraz R² – skorygowany były wysokie i porównywalne, w każdym badanym przypadku, jak również błąd standardowy estymacji wykazywał dla tych wariantów podobną wartość. Jednakże tylko w dwóch przypadkach uzyskane współczynniki regresji i wyraz wolny były istotne statystycznie. Były to warianty, w których wybrano następujące zmienne objaśniające: OWO, azot amonowy lub azot organiczny (wariant III i IV). Ze względu na, iż w przypadku III uzyskano najwyższe wartości R² = 0,92 i R²-skorygowany oraz najniższy błąd standardowy estymacji jako najlepiej dopasowany model regresji do wyników z wody modelowej dezynfekowanej chlorem uznano model przedstawiony w wariacie III, gdzie β₀=-932,3; β_{OWO}=368,1 a β_{N-NH₄⁺}=1618. Uzyskany model regresji wielorakiej miał następującą postać:

$$f = -932,3 + 368,1 * OWO + 1618 * NH_4^+ \quad \text{l. rew./dm}^3$$

1.5.2. Dopasowanie modelu regresji wielorakiej do danych z wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem

Na podstawie uzyskanych wyników dopasowywania modelu regresji wielorakiej do danych z wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru jako wstępnego utleniacza (Tabela 22) zauważono, iż zarówno współczynniki determinacji R^2 , oraz R^2 – skorygowany były dość wysokie i porównywalne, w każdym badanym przypadku, jednakże niższe niż te uzyskane dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem. Również błąd standardowy estymacji wykazywał dla tych wariantów podobną wartość, choć w wariancie I odbiegającą od pozostałych.

Tabela 22. Wyniki regresji wielorakiej dla wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed chlorowaniem

x	Zmienne x	Wyraz wolny B_0	Współczynnik regresji B_x	R^2	R^2 skorygowany	Błąd standardowy estymacji
I	OWO	-116,2	18,52	0,70	0,41	385
	NH_4^+		-218,0			
	N-org		1303			
	Cl_2		116,7			
II	OWO	-276,7	171,7	0,69	0,51	349
	NH_4^+		511,5			
	N-org		1546			
III	OWO	-81,5	171,7	0,69	0,59	322
	NH_4^+		744,7			
IV	OWO	-569,3	171,7	0,67	0,55	334
	N-org		4282			
V	OWO	64,62	-0,79	0,70	0,52	347
	NH_4^+		-118,1			
	Cl_2		131,4			
VI	OWO	-144,3	59,03	0,70	0,53	344
	N-org		1233			
	Cl_2		85,85			

Jednakże tylko w jednym przypadku uzyskane współczynniki regresji, bez wyrazu wolnego były istotne statystycznie. W tym przypadku uzyskano również najwyższą wartość R^2 -skorygowany = 0,59 oraz najniższy błąd standardowy estymacji, stąd też jako najlepiej dopasowany model regresji do wyników z wody modelowej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem uzyskano w wariancie III, gdzie $\beta_0 = -81,5$; $\beta_{OWO} = 171,7$ a $\beta_{N-NH_4^+} = 744,7$. Uzyskany model regresji wielorakiej miał następującą postać:

$$f = -81,5 + 171,7 * OWO + 744,7 * NH_4^+ \quad \text{l. rew./dm}^3$$

2. Woda rzeczywista – etap II badań

Badania na rzeczywistej uzdatnionej wodzie powierzchniowej po procesie jej dezynfekcji przeprowadzono w celu oceny jakości zdrowotnej wrocławskiej wody wodociągowej w aspekcie powstających pochodnych chlorowych. Z uwagi na sezonową zmienność składu jakościowego wody badania prowadzone były w cyklu rocznym. Wyniki podstawowych parametrów fizyczno-chemicznych wody powierzchniowej oczyszczanej w ZOW „Mokry Dwór” przedstawiono w Tabeli 23.

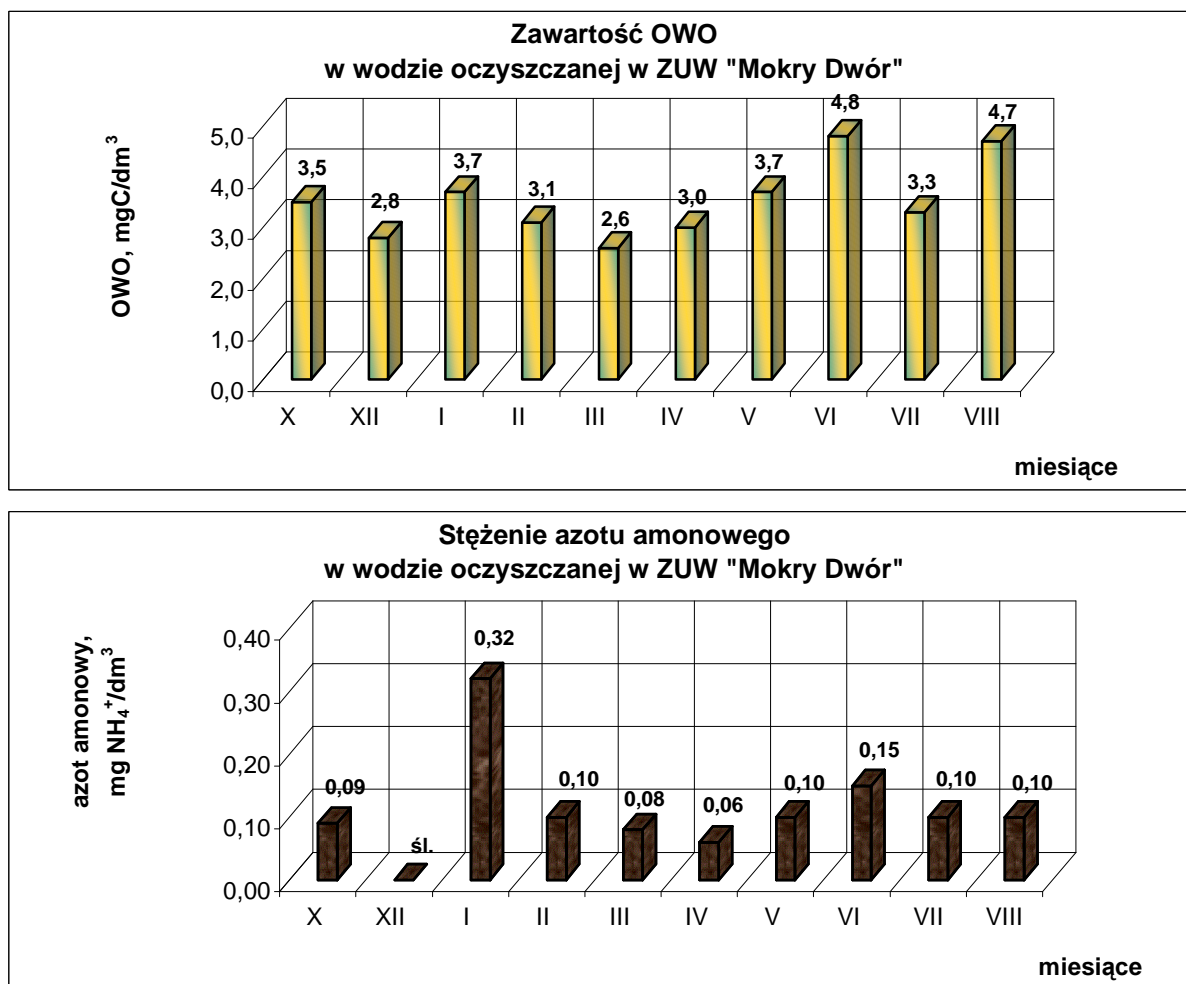
Tabela 23. Skład fizyczno-chemiczny wody rzeczywistej

Woda -oznaczenie	Data poboru wody	Barwa mgPt/dm ³	Mętność NTU	pH	Absorbancja m ⁻¹	Przewodnictwo μ S/cm	Azot organiczny mgN/dm ³	Utlenialność mgO ₂ /dm ³
W1	październik	8,0	0,4	7,8	6,8	520	0,40	3,0
W2	grudzień	8,0	0,7	8,3	6,2	519	0,43	2,7
W3	styczeń	6,0	0,5	7,7	7,4	510	0,46	2,9
W4	luty	5,0	0,6	7,8	2,3	555	0,60	3,4
W5	marzec	5,0	0,2	7,7	6,7	583	0,46	2,2
W6	kwiecień	3,0	0,2	7,7	5,9	625	0,43	2,7
W7	maj	6,0	0,1	7,5	9,6	649	0,48	3,3
W8	czerwiec	8,0	0,5	8,2	8,6	661	0,43	3,3
W9	lipiec	8,5	0,3	7,6	2,2	525	0,80	3,1
W10	sierpień	7,0	0,6	7,7	6,8	395	0,48	3,6
Średnia		6,7	0,4	-	6,3	539	0,49	3,1

W okresie rocznych badań woda powierzchniowa oczyszczana w ZOW „Mokry Dwór” charakteryzowała się stabilnym składem fizyczno-chemicznym i w zakresie badanych wskaźników jakości, odpowiadała wymaganiom określonym Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [80].

Woda była klarowna - mętność wody zmieniała się w zakresie 0,1÷0,7 NTU/m³, przy średniej wartości 0,4 NTU/m³; barwa wody wahała się od 3,0÷8,0 mg Pt/dm³ przy wartości średniej 6,7; o odczynie obojętnym (7,5-8,2); średnio zmineralizowana (395- 661 μ S/cm z wartością średnią – 539 μ S/cm). Azot organiczny występował w stężeniach 0,40 – 0,80 mgN/dm³ - średnio 0,49 mgN/dm³. Absorbancja UV₂₅₄ zmieniała się w granicach 5,0 ÷9,6 m⁻¹ przy średniej wartości 6,3 m⁻¹, a utlenialność była w zakresie 2,2–3,6 mg O₂/dm³ przyjmując wartość średnią równą 3,1 mg O₂/dm³.

Zawartość ogólnego węgla organicznego wahała się w zakresie 2,6- 4,8 mgC/dm³, przy średniej wartości 3,5 mgC/dm³. Stężenie azotu amonowego osiągało wartość od 0,06 do 0,32 mgNH₄⁺/dm³, średnio przyjmując wartość 0,12 mgNH₄⁺/dm³ i tylko raz występowało w ilościach śladowych (Wykres 25 a, b).

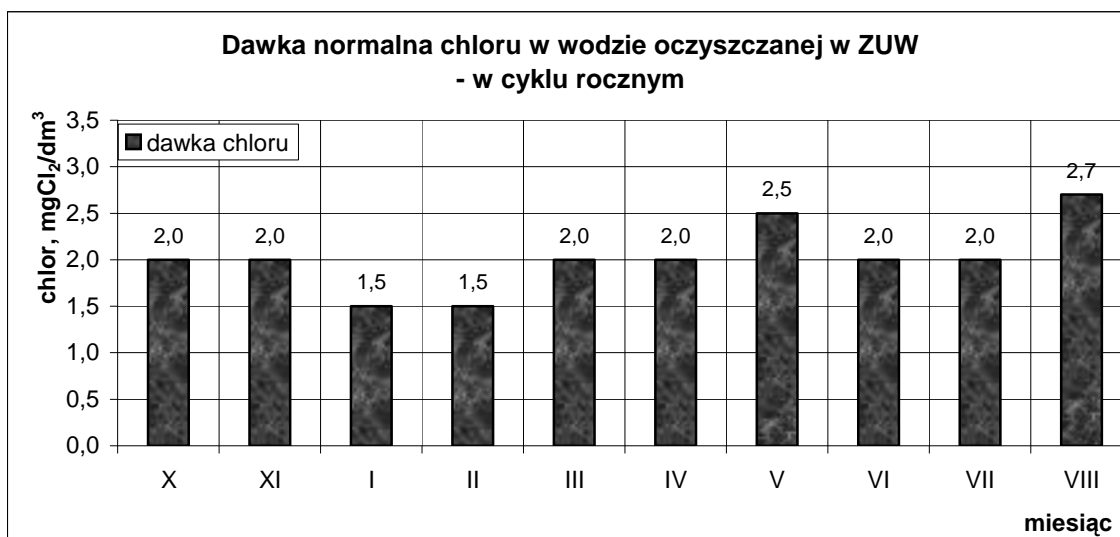


Wykres 25 a i b. Zawartość OWO i stężenie azotu amonowego w wodzie rzeczywistej

2.1. Woda rzeczywista dezynfekowana chlorem – etap IIA

W celu ustalenia zależności pomiędzy zawartością OWO, stężeniem azotu amonowego i dawką chloru a aktywnością mutageną wody, wodę rzeczywistą w tym etapie badań dezynfekowano chlorem.

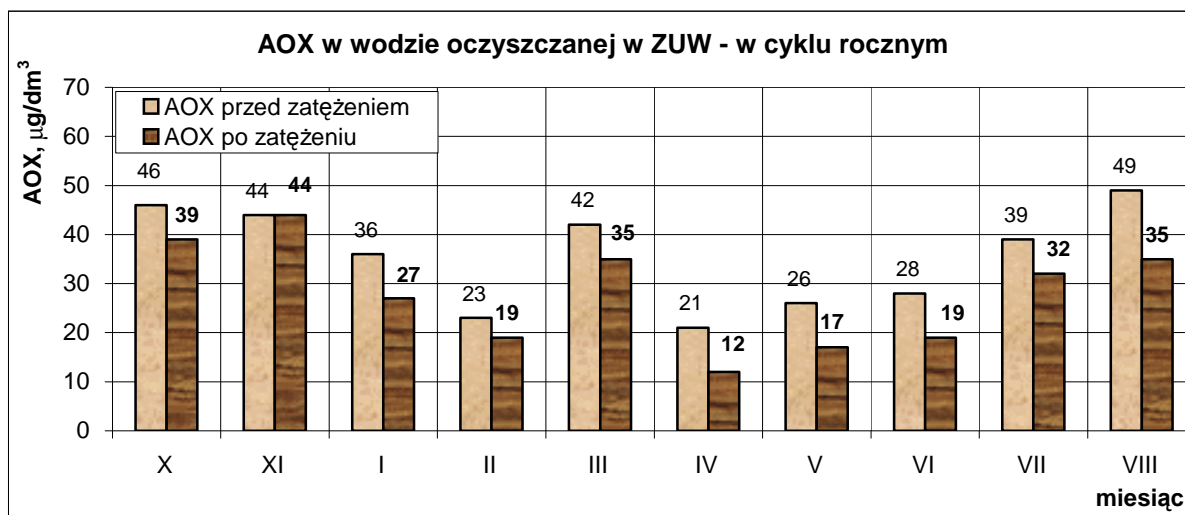
Na podstawie krzywych zapotrzebowania ustalono dawki normalne chloru, które zmieniały się w niewielkim stopniu w zakresie 1,5-2,7 mgCl₂/dm³ – Wykres 26.



Wykres 26. Dawka normalna chloru zastosowana do chlorowania wody rzeczywistej

2.1.1. Uboczne produkty dezynfekcji wody rzeczywistej chlorem

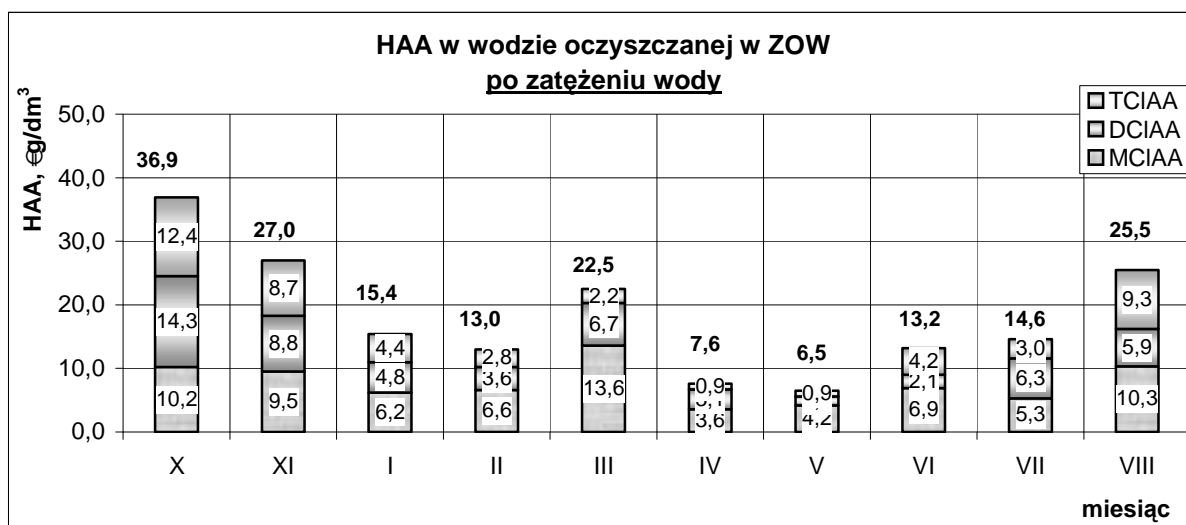
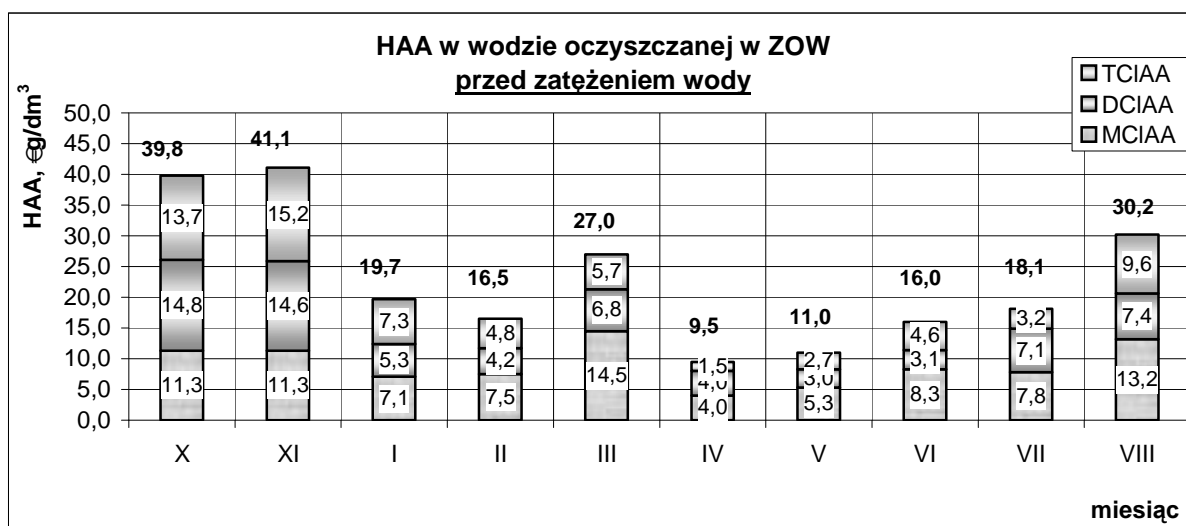
W rezultacie chlorowania wody zawierającej związki organiczne powstaje szereg produktów ubocznych procesu. Chlorowanie wody rzeczywistej również jak w przypadku wody modelowej powodowało wytworzenie ubocznych produktów tego procesu, które oznaczane były jako AOX (Wykres 27) i HAA (Wykres 28 a,b).



Wykres 27. AOX powstałe po dezynfekcji chlorem wody rzeczywistej

Ilość powstałych AOX w wodzie – wahała się w granicach od 21 do 49 µg/dm³ przy średniej wartości 35 µg/dm³, natomiast w ekstrakcie z wód zmieniała się od 12 do 44 µg/dm³, czyli była niższa średnio o 23 % (0-43 %) – Wykres 27. Znaczący, 62 % (42-93 %) udział w AOX, w wodzie przed zateżeniem, miały kwasy chlorooctowe. Najwyższy – 25 % (19-35 %) udział miał kwas monochlorooctowy, kwas di- i tri-chlorooctowy nieco niższy

i wynosił odpowiednio: 19 % (11-33 %) i 18 % (7-35 %), a po jej zateżeniu był podobny w przypadku kwasów mono- i tri-chlorooctowego i wynosił odpowiednio: 28 % (17-39 %) i 16 % (6-27 %) i taki sam dla kwasu dichlorooctowego - 19 % (8-37 %). Po procesie zateżania udział sumy kwasów chlorooctowych w absorbowlalnych halogenowych związkach organicznych wynosił 64 % (38-95 %) i zwiększył się o 2 %.



Wykres 28 a i b. HAA powstałe po dezynfekcji chlorem wody rzeczywistej

Sumaryczne stężenie HAA w wodzie przed zateżeniem (Wykres 28a) wahało się w dość szerokich granicach 9,5-38,0 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, przy średniej wartości 22,9 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Najwyższy 42 % (27-54 %) udział w ich sumarycznym stężeniu miał kwas monochlorooctowy a udziały pozostałych dwóch kwasów były podobne i wynosiły odpowiednio 30 % (19-39 %) i 28 % (16-37 %). Podobnie kształtowały się zależności w wodzie po zateżeniu (Wykres 28b). Sumaryczne stężenie HAA w ekstrakcie wahało się w granicach od 7,6-36,9 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, przy

średniej wartości 18,2 µg/dm³. Największy udział w sumie kwasów chlorooctowych miał kwas monochlorooctowy – średnio 46 % (28-65 %). Mniejszy udział miał kwas di- i trichlorooctowy i wynosił odpowiednio: 30 % (28-43 %) i 24 % (10-36 %). Średnia skuteczność odzysku dla sumy HAA wynosiła 79 % (59-93 %) a dla poszczególnych kwasów chlorooctowych osiągnęła wartości: 84 % (68-94%) dla MCAA, 79 % (47-99 %) dla DCAA – a dla TCAA – 68 % (33-97).

W wodzie nie stwierdzono obecności pochodnych bromowych kwasu octowego.

2.1.2. Badania bioindykacyjne – test Ames – woda rzeczywista - etap IIA

Celem badań na wodzie rzeczywistej była ocena potencjalnej aktywności mutagennej wrocławskiej wody wodociągowej w aspekcie powstających pochodnych chlorowych. Jak również określenie mutagenności M badanych wód w celu weryfikacji modelu Vartiainenena. W tym etapie badania prowadzono na wodzie wodociągowej dezynfekowanej chlorem, przy użyciu szczepu testowego *Salmonella typhimurium* TA100 i TA98 zarówno z frakcją mikrosomalną S9-mix jak i bez jej zastosowania. Liczbę rewertantów spontanicznych i indukowanych dla TA98 i TA100, w badaniach prowadzonych bez i z zastosowaniem frakcji S9-mix zamieszczono poniżej:

Szczep	LR spontanicznych		LR indukowanych (pozytywnych)	
	- S9 – mix	+ S9 - mix	- S9 – mix	+ S9 - mix
TA98	22-35	26-40	3328-4105 dla 2,4,7-TNFon	1758-2633 dla 2-AF
TA100	99-120	118-150	994-1280 dla NQNO	849-870 dla 2-AF

Przy przedstawianiu i ocenie wyników przy użyciu podstawowej statystyki opisowej jak również testowej w tabelach i na wykresach ramka-wąsy (box-plotach) użyto oznaczeń próbek wody według schematów:

1) wx_Ya/b_TAy/z, gdzie:

- wx_ – oznacza ekstrakt z wody powierzchniowej oczyszczanej w ZOW „Mokry Dwór” i poddanej w warunkach laboratoryjnych dezynfekcji, w której x oznacza kolejną próbkę wody pobraną w cyklu rocznym według schematu:

okres zimowo-wiosenny

- w1 – woda pobrana w październiku,
- w2 – woda pobrana w grudniu,
- w3 – woda pobrana w styczniu,
- w4 – woda pobrana w lutym,
- w5 – woda pobrana w marcu,

okres letnio-jesienny

- w6 – woda pobrana w kwietniu,
- w7 – woda pobrana w maju,
- w8 – woda pobrana w czerwcu,
- w9 – woda pobrana w lipcu,
- w10 – woda pobrana w sierpniu,

- Ya/b – sposób dezynfekcji wody

- o Ya –chlorem,
- o Yb –chlorem wcześniejszym dawkowaniu dwutlenku chloru,

- TAy/z – zastosowany do badań bioindykacyjnych szczep *S. typhimurium* 100 lub 98, np. w1_Cl₂_TA100 – oznacza wodę powierzchniową oczyszczaną w ZOW „Mokry Dwór” i dezynfekowaną chlorem badaną testem Ames a z użyciem szczepu TA100, bez zastosowania frakcji mikrosomalnej S9

2) wx_f_Ya/b_TAy/z, gdzie:

- Oznaczenia jak wyżej
- _f_ - informuje, iż ekstrakt wody badany był z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej S9 np. w1_f_Cl₂_TA100 – oznacza wodę powierzchniową oczyszczaną w ZOW „Mokry Dwór” i dezynfekowaną chlorem badaną testem Ames a z użyciem szczepu TA100, z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej S9

2.1.2.1. Wyniki testu Ames a wraz ze statystyką opisową – etap IIA

Poniżej przedstawiono podstawową statystykę opisową wyników testu Ames a dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem dla wariantów z zastosowanym szczepem *S. typhimurium* TA100 i TA98 zarówno z jak i bez aktywacji metabolicznej (Tabela 24-27), tj. wyliczono średnią liczbę rewertantów dla danej próbki wody wraz z odchyleniem standardowym jak również określono minimum i maximum, medianę oraz rangę i współczynnik zmienności CV.

W przypadku wyników testu Ames a uzyskanych przy zastosowaniu szczepu TA100 bez zastosowania frakcji mikrosomalnej (Tabela 24) w okresie jesienno-zimowym średnia liczba rewertantów osiągnęła wartość maksymalną 113 w październiku a minimalną w lutym i wynosiła 74. W okresie wiosenno-letnim następował wzrost średniej liczby rewertantów od 61 w kwietniu do 170 w sierpniu. Podobny charakter zmian jak dla wartości średniej zaobserwowano dla wartości mediany dla poszczególnych próbek i w większości przypadków wartości mediany były bliskie średnim co oznaczało, że dane miały rozkład symetryczny. Na podstawie uzyskanych wyników nie zauważono, aby wartości statystyk opisowych takich jak odchylenie standardowe, minimum, maksimum, ranga oraz współczynnik zmienności CV zmieniały się podobnie jak średnia. Analiza pozostałych statystyk opisowych, wykazała, iż wyróżniają się próbki W6, W7, W10, dla których zarówno odchylenie standardowe, jaki i wartość rangi są znacznie większe niż dla pozostałych próbek. Szczególne znaczenie ma to

dla próbek W6 i W7, dla których przy małych wartościach średnich zaobserwowano tak dużą zmienność (prawie dwukrotnie większą) w porównaniu z innymi danymi.

Tabela 24. Statystyka opisowa – woda rzeczywista IIA - TA100-S9 mix

Statystyka opisowa	W1_ Cl ₂ _TA100	W2_ Cl ₂ _TA100	W3_ Cl ₂ _TA100	W4_ Cl ₂ _TA100	W5_ Cl ₂ _TA100	W6_ Cl ₂ _TA100	W7_ Cl ₂ _TA100	W8_ Cl ₂ _TA100	W9_ Cl ₂ _TA100	W10_ Cl ₂ _TA100
średnia	113	96	99	74	77	61	66	89	94	170
odchylenie standardowe	23	16	12	21	20	29	38	11	16	98
min	73	66	76	38	43	21	28	74	70	85
max	168	129	120	121	112	117	153	118	137	355
mediana	112	96	101	76	79	56	49	86	91	111
ranga	95	63	44	83	69	96	125	44	67	270
CV	21%	17%	12%	28%	26%	48%	58%	13%	17%	58%

Tabela 25. Statystyka opisowa – woda rzeczywista IIA - TA100+S9 mix

Statystyka opisowa	W1_f_ Cl ₂ _TA100	W2_f_ Cl ₂ _TA100	W3_f_ Cl ₂ _TA100	W4_f_ Cl ₂ _TA100	W5_f_ Cl ₂ _TA100	W6_f_ Cl ₂ _TA100	W7_f_ Cl ₂ _TA100	W8_f_ Cl ₂ _TA100	W9_f_ Cl ₂ _TA100	W10_f_ Cl ₂ _TA100
średnia	111	97	60	91	77	59	63	78	78	89
odchylenie standardowe	10	13	21	8	10	13	13	6	9	10
min	93	72	14	72	58	34	37	64	60	76
max	131	122	81	103	98	82	92	94	98	110
mediana	110	99	68	91	75	59	64	78	76	85
ranga	38	50	67	31	40	48	55	30	38	34
CV	9%	13%	34%	9%	13%	22%	20%	8%	11%	11%

Tabela 26. Statystyka opisowa – woda rzeczywista IIA - TA98-S9 mix

Statystyka opisowa	W1_ Cl ₂ _TA98	W2_ Cl ₂ _TA98	W3_ Cl ₂ _TA98	W4_ Cl ₂ _TA98	W5_ Cl ₂ _TA98	W6_ Cl ₂ _TA98	W7_ Cl ₂ _TA98	W8_ Cl ₂ _TA98	W9_ Cl ₂ _TA98	W10_ Cl ₂ _TA98
średnia	14	19	16	19	16	17	13	12	15	18
odchylenie standardowe	5	5	5	5	5	6	5	4	4	6
min	5	8	7	10	6	7	5	5	7	8
max	27	28	24	30	26	30	22	23	22	28
mediana	13	19	16	19	16	16	13	11	15	18
ranga	22	20	17	20	20	23	17	18	15	20
CV	33%	29%	30%	29%	33%	34%	37%	38%	29%	32%

Tabela 27. Statystyka opisowa – woda rzeczywista IIA - TA98+S9 mix

Statystyka opisowa	W1_f_ Cl ₂ _TA98	W2_f_ Cl ₂ _TA98	W3_f_ Cl ₂ _TA98	W4_f_ Cl ₂ _TA98	W5_f_ Cl ₂ _TA98	W6_f_ Cl ₂ _TA98	W7_f_ Cl ₂ _TA98	W8_f_ Cl ₂ _TA98	W9_f_ Cl ₂ _TA98	W10_f_ Cl ₂ _TA98
średnia	23	25	21	29	21	23	19	17	23	23
odchylenie standardowe	5	15	5	5	3	8	6	4	7	6
min	17	4	9	19	16	13	6	9	12	15
max	34	54	32	38	27	43	36	23	45	38
mediana	22	20	21	28	21	23	19	17	22	22
ranga	17	50	23	19	11	30	30	14	33	23
CV	24%	60%	24%	18%	14%	32%	31%	23%	30%	26%

W przypadku wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem badanej w teście Ames z szczepem *S. typhimurium* TA100 z zastosowaniem frakcji (Tabela 25) nie zaobserwowano dużych różnic w wartościach statystyk dla poszczególnych próbek. Zarówno odchylenie standardowe, ranga jaki i współczynnik zmienności były do siebie zbliżone, za wyjątkiem próbki W3. Natomiast wartości średnie układały się w sposób charakterystyczny podobny jak dla próbek z wód badanych bez zastosowania frakcji. Dla próbek W1 do W5 minimalna wartość średniej wynosiła 60 (dla wody pobranej w styczniu), maksymalna 111 (październik), a dla próbek od W6 do W10 miał miejsce wzrost średniej liczby rewertantów od 59 w kwietniu do 89 w sierpniu.

W przypadku tych samych próbek wody wodociągowej badanej testem Ames z zastosowaniem szczepu TA98 bez frakcji (Tabela 26) wartości średnie nie układały się tak jak dla wody badanej szczepem TA100. Nie zauważono tendencji wzrostowej czy spadkowej w liczbie rewertantów. Dla wszystkich próbek wartości odchylenia standardowego, rangi jak również współczynnika zmienności dla poszczególnych próbek były do siebie zbliżone. A wartości mediany były bliskie średnim, czyli dane miały rozkład symetryczny.

Dla wody wodociągowej badanej szczepem TA98 z zastosowaniem frakcji (Tabela 27), wyróżniała się próbka W2, gdzie wartości odchylenia standardowego, rangi i współczynnika zmienności były dużo większe niż dla pozostałych próbek. Dla wszystkich próbek wartości średnie były do siebie zbliżone i nie zaobserwowano żadnych charakterystycznych tendencji.

2.1.2.2. Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody rzeczywistej - IIA

W analizie wyników dotyczących rozkładu prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem wzięto pod uwagę, podobnie jak w przypadku wody modelowej, wyniki uzyskane testem Shapiro-Wilka, ponieważ pozostałe dwa testy są testami asymptotycznymi, czyli działającymi poprawnie dla próbek o dużej liczności. Statystyka testowa wyników testu Ames z i bez zastosowania aktywacji metabolicznej dla szczepu testowego TA100 została zamieszczona w Tabeli 28, a dla TA98 w Tabeli 29.

W przypadku wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem badanej przy zastosowaniu szczepu TA100 (Tabela 28) ponad połowa danych miała rozkład normalny i dużo częściej odrzucona była hipoteza o tym, że dane pochodzą z rozkładu normalnego w przypadku wody badanej bez zastosowania frakcji niż z zastosowaniem frakcji. Dla wód badanych przy użyciu szczepu TA98 (Tabela 29) tylko woda W9_CI2_TA 98f, czyli pobrana w lipcu i badana z zastosowaniem frakcji nie miała rozkładu normalnego.

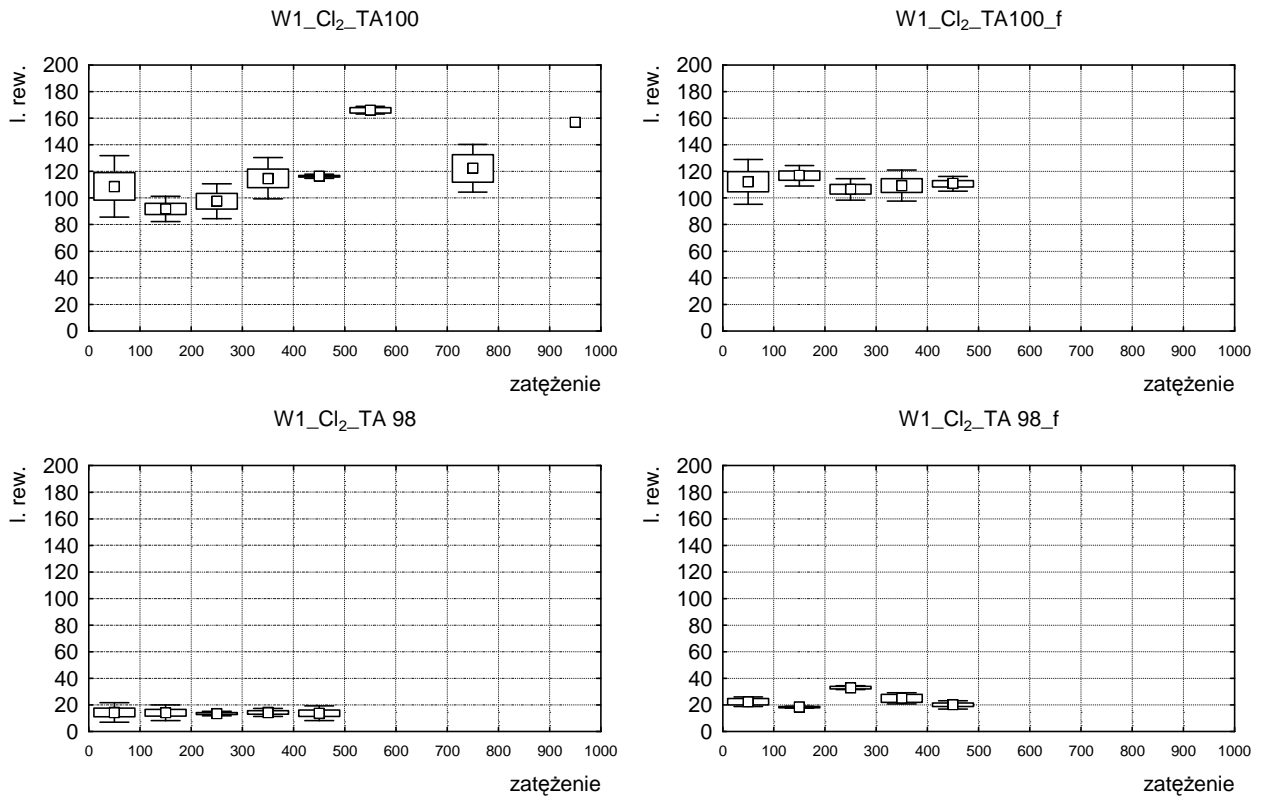
Tabela 28. Statystyka testowa – woda rzeczywista IIA - TA100 ±S9 mix

Próba	N	Testy normalności			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnova	Lilieforsa	Shapiro-Wilka	
W1_CI2_TA100	31	p < 0,15	p < 0,01	0,058265	normalny
W1_CI2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,504288	normalny
W2_CI2_TA100	28	p > 0,20	p > 0,20	0,583007	normalny
W2_CI2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,900406	normalny
W3_CI2_TA100	34	p > 0,20	p > 0,20	0,37114	normalny
W3_CI2_TA100f	25	p < 0,10	p < 0,01	0,000178	brak normalności
W4_CI2_TA100	33	p > 0,20	p < 0,20	0,141048	normalny
W4_CI2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,367209	normalny
W5_CI2_TA100	34	p > 0,20	p < 0,15	0,021815	brak normalności
W5_CI2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,839984	normalny
W6_CI2_TA100	34	p > 0,20	p < 0,10	0,006227	brak normalności
W6_CI2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,649817	normalny
W7_CI2_TA100	34	p < 0,01	p < 0,01	0,000008	brak normalności
W7_CI2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,134521	normalny
W8_CI2_TA100	31	p < 0,01	p < 0,01	0,0015	brak normalności
W8_CI2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,567396	normalny
W9_CI2_TA100	33	p > 0,20	p > 0,20	0,16520	normalny
W9_CI2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,629022	normalny
W10_CI2_TA100	34	p < 0,05	p < 0,01	0,00001	brak normalności
W10_CI2_TA100f	25	p < 0,10	p < 0,01	0,007886	brak normalności

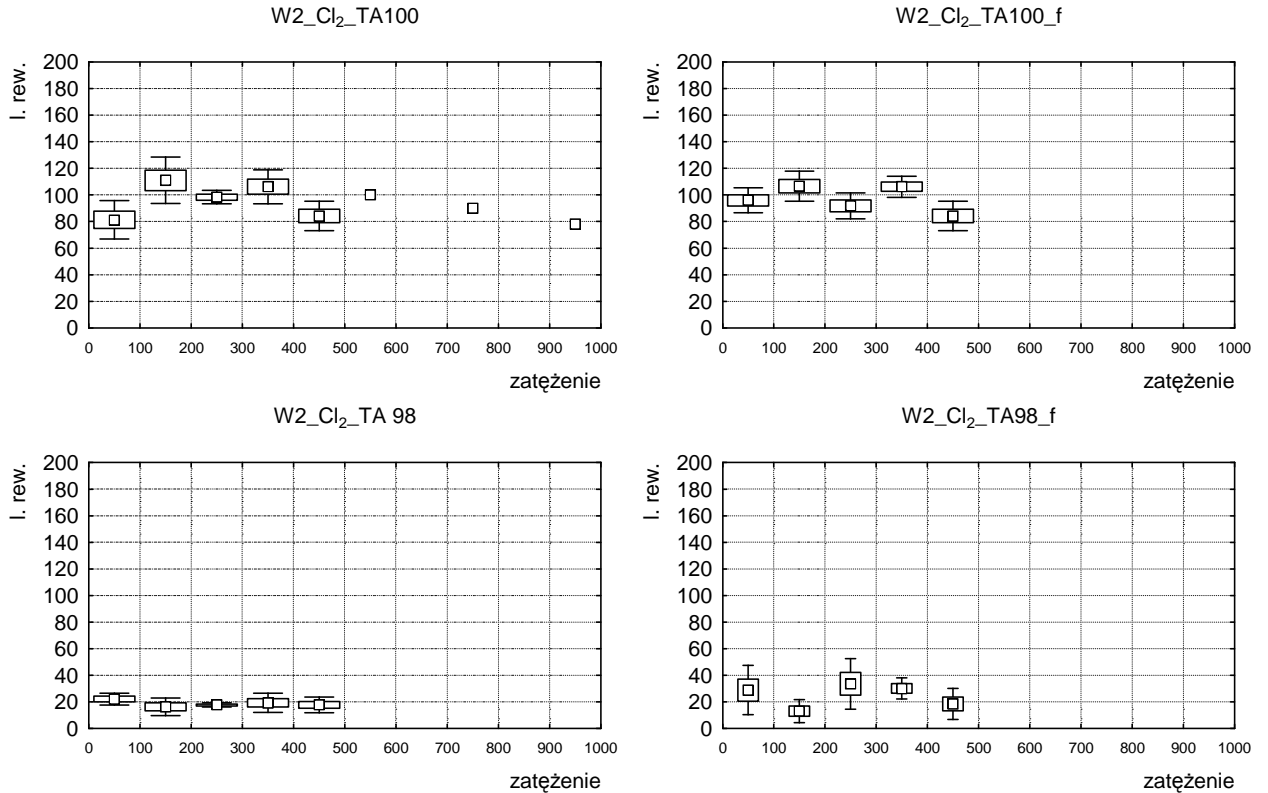
Tabela 29. Statystyka testowa – woda rzeczywista IIA - TA98 ±S9 mix

Próba	N	Testy normalności			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnova	Lilieforsa	Shapiro-Wilka	
W1_CI2_TA 98	25	p > 0,20	p < 0,05	0,266368	normalny
W1_CI2_TA 98f	13	p > 0,20	p > 0,20	0,145554	normalny
W2_CI2_TA 98	24	p > 0,20	p > 0,20	0,716825	normalny
W2_CI2_TA 98f	25	p > 0,20	p < 0,05	0,054703	normalny
W3_CI2_TA 98	25	p > 0,20	p > 0,20	0,335796	normalny
W3_CI2_TA 98f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,769274	normalny
W4_CI2_TA 98	23	p > 0,20	p > 0,20	0,543008	normalny
W4_CI2_TA 98f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,484258	normalny
W5_CI2_TA 98	25	p > 0,20	p > 0,20	0,682673	normalny
W5_CI2_TA 98f	25	p > 0,20	p < 0,15	0,355775	normalny
W6_CI2_TA 98	25	p > 0,20	p < 0,15	0,301509	normalny
W6_CI2_TA 98f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,059570	normalny
W7_CI2_TA 98	23	p > 0,20	p > 0,20	0,313108	normalny
W7_CI2_TA 98f	25	p > 0,20	p < 0,10	0,187570	normalny
W8_CI2_TA 98	25	p > 0,20	p > 0,20	0,289084	normalny
W8_CI2_TA 98f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,451468	normalny
W9_CI2_TA 98	25	p > 0,20	p > 0,20	0,658489	normalny
W9_CI2_TA 98f	25	p > 0,20	p < 0,20	0,011689	brak normalności
W10_CI2_TA 98	25	p > 0,20	p > 0,20	0,413198	normalny
W10_CI2_TA 98f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,214899	normalny

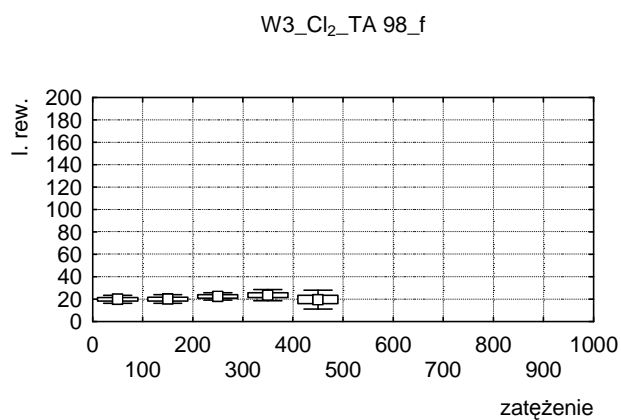
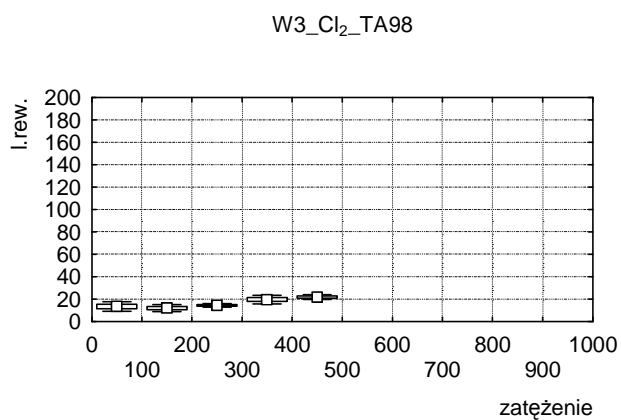
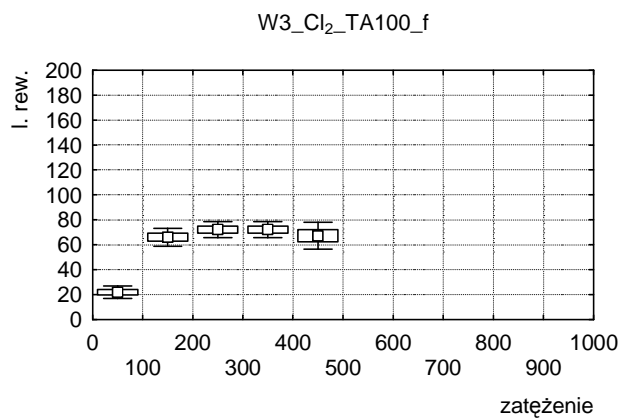
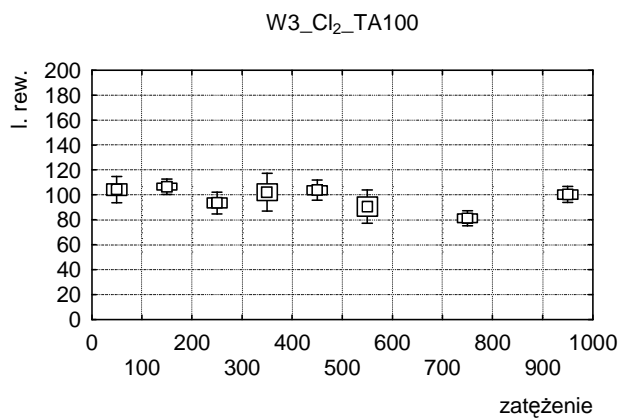
2.1.2.3. Krzywa zależności dawka – odpowiedź dla wody rzeczywistej - IIA



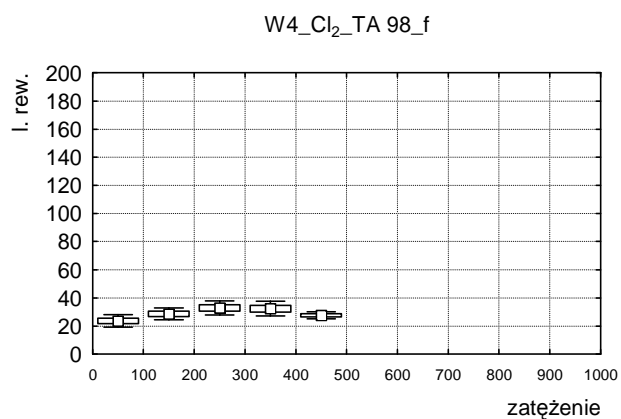
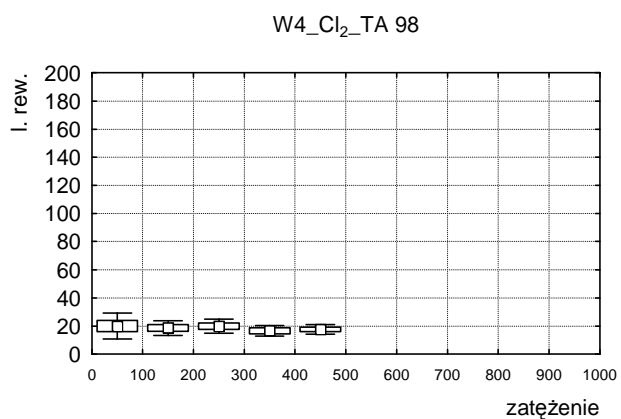
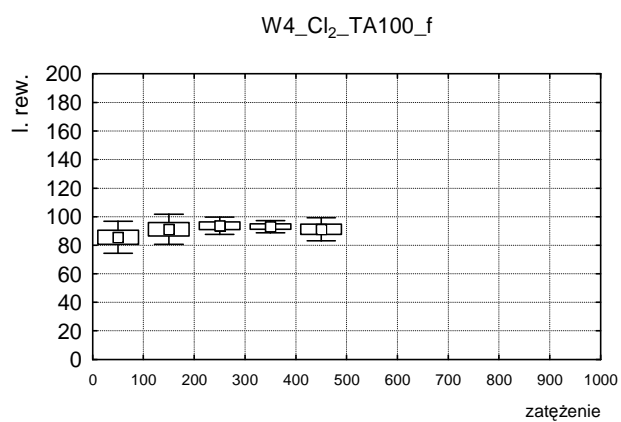
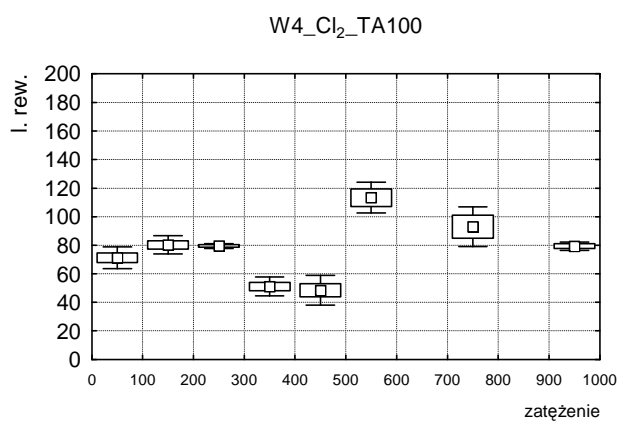
Wykres 29 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowieź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - październik



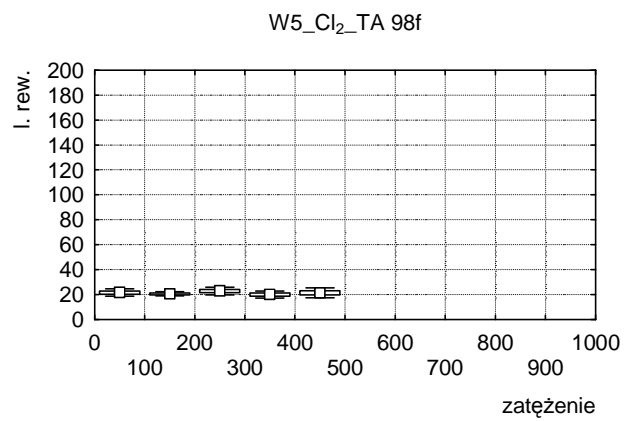
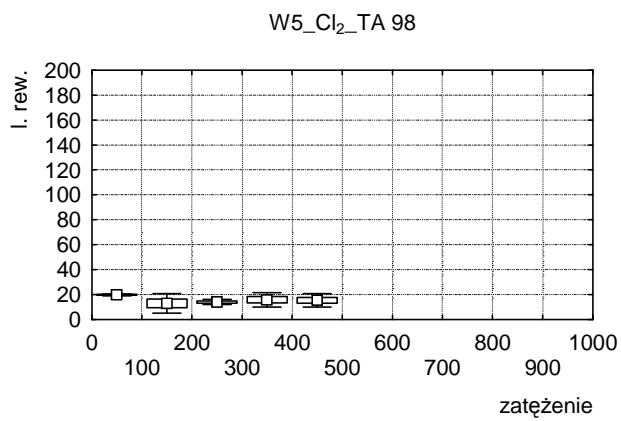
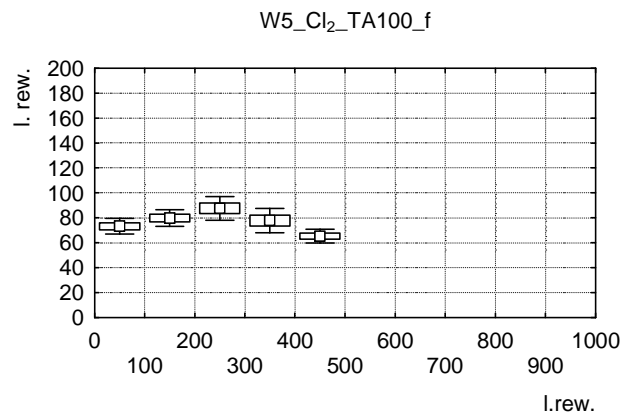
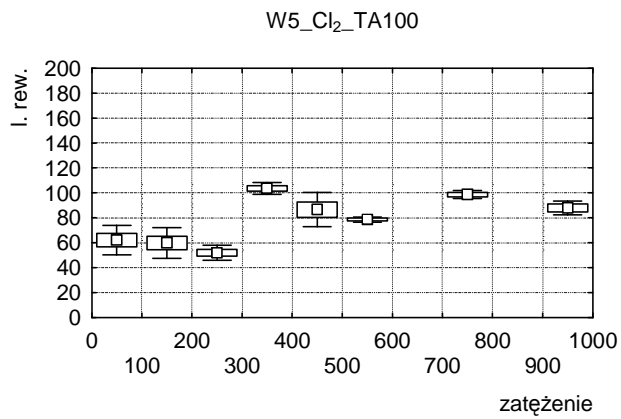
Wykres 30 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowieź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - grudzień



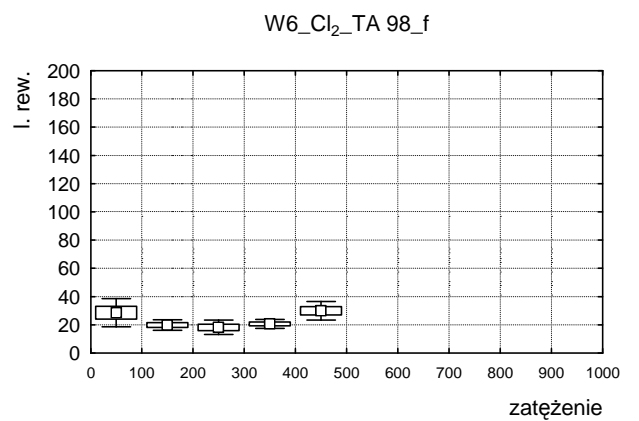
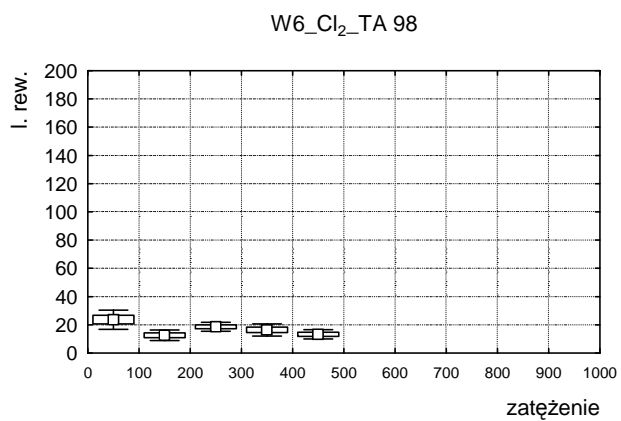
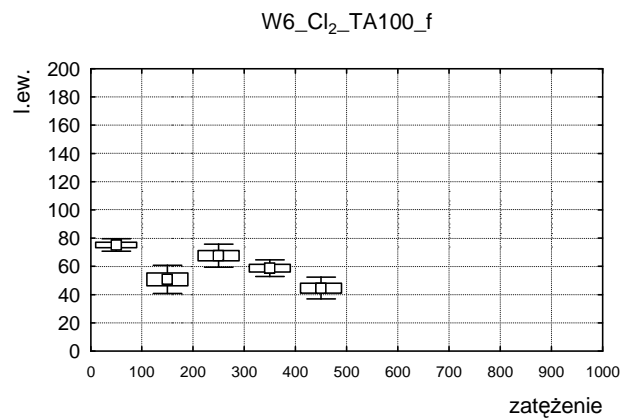
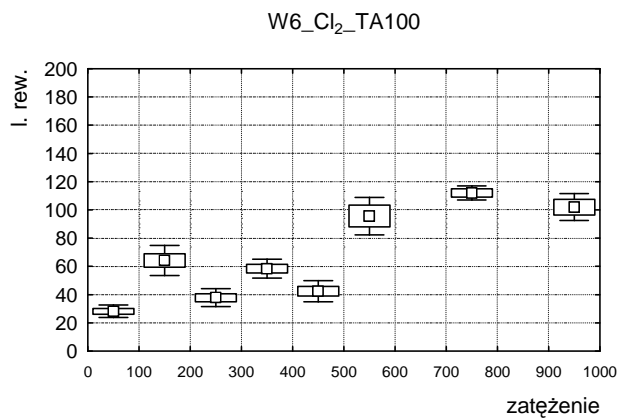
Wykres 31 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - styczeń



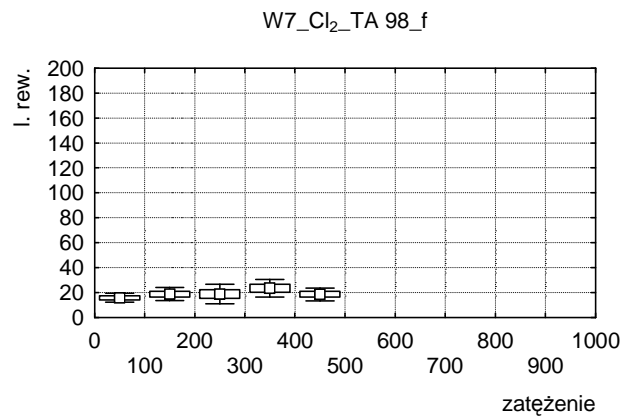
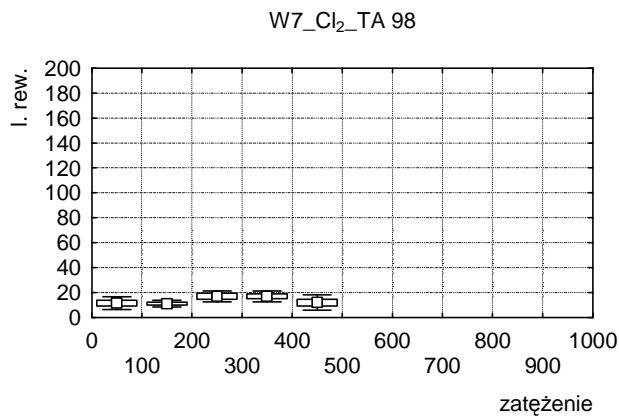
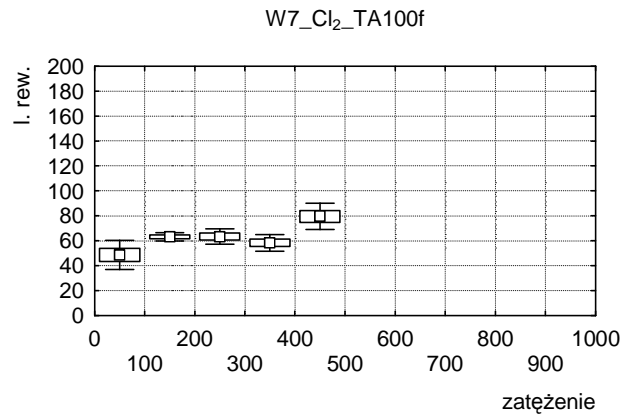
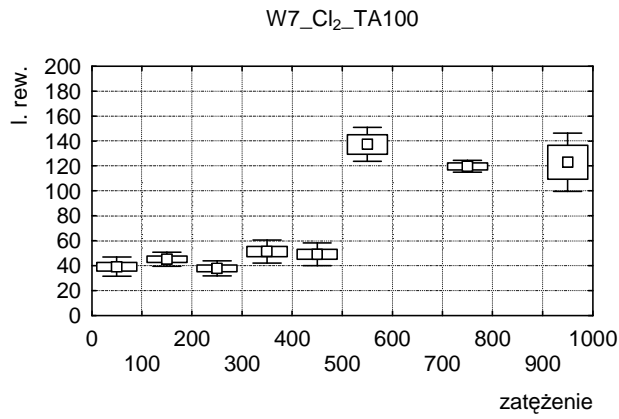
Wykres 32 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - luty



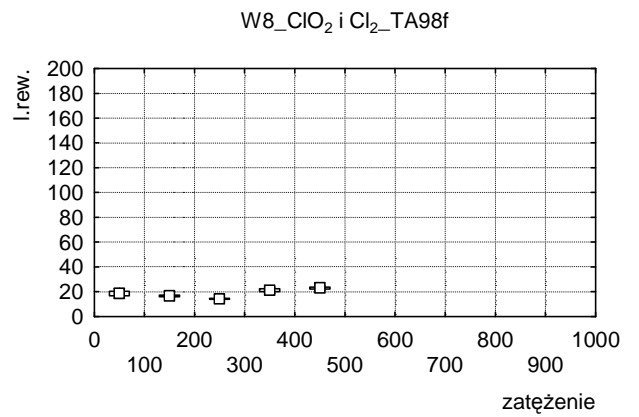
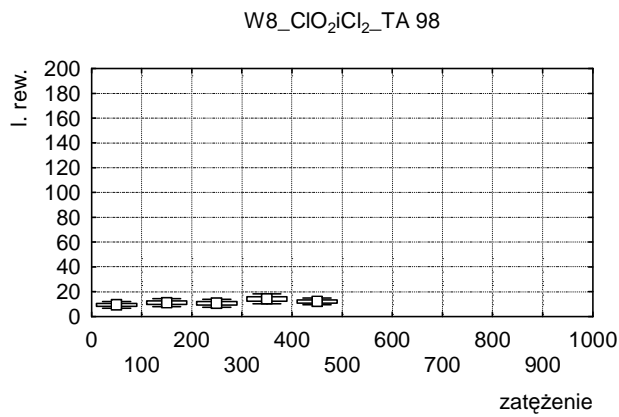
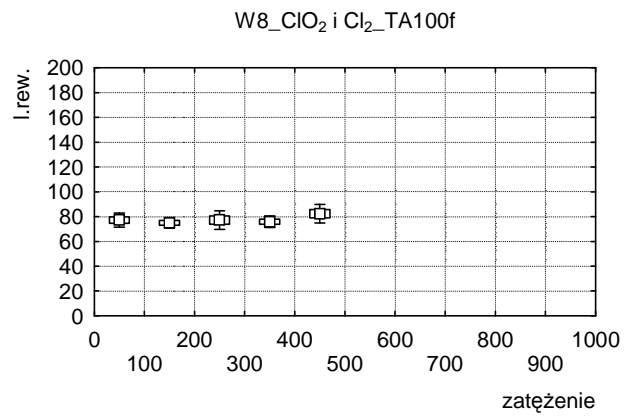
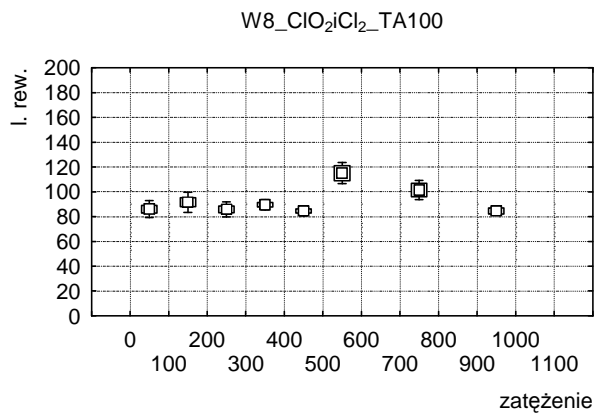
Wykres 33 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - marzec



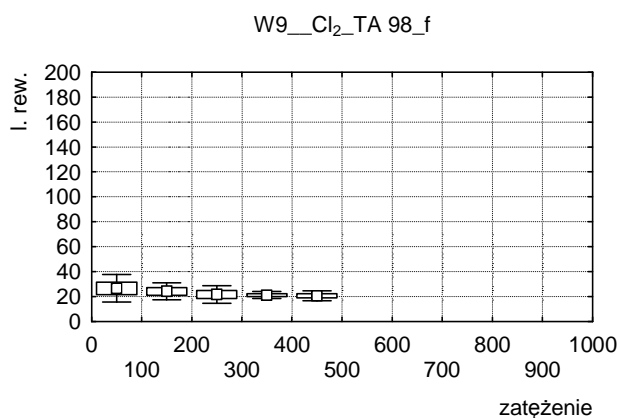
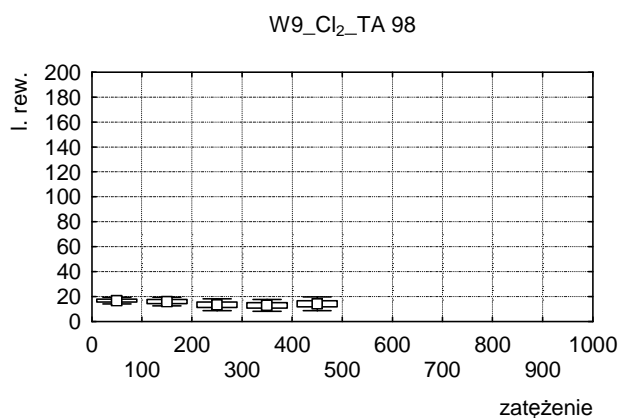
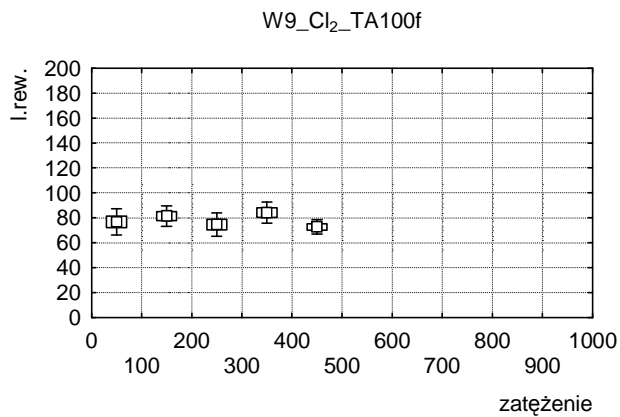
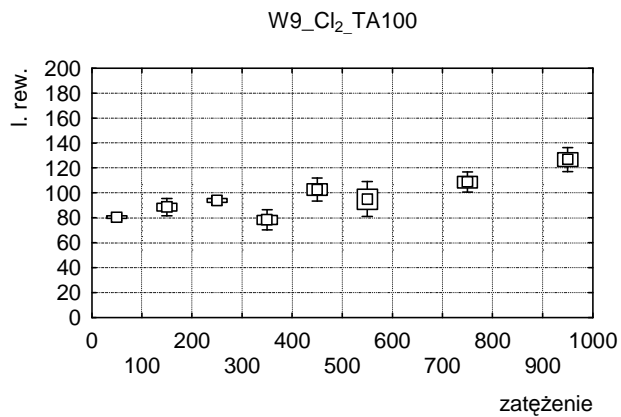
Wykres 34 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem - kwiecień



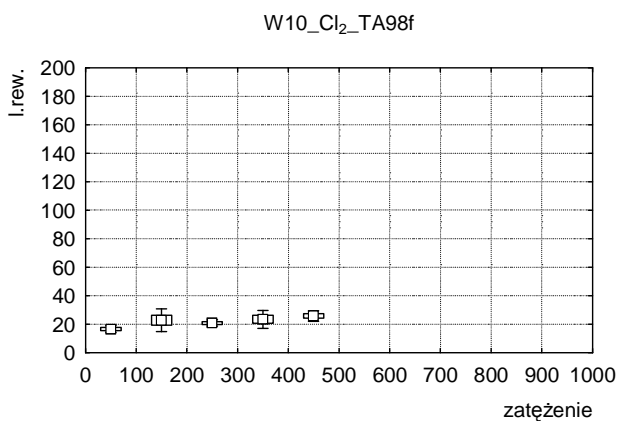
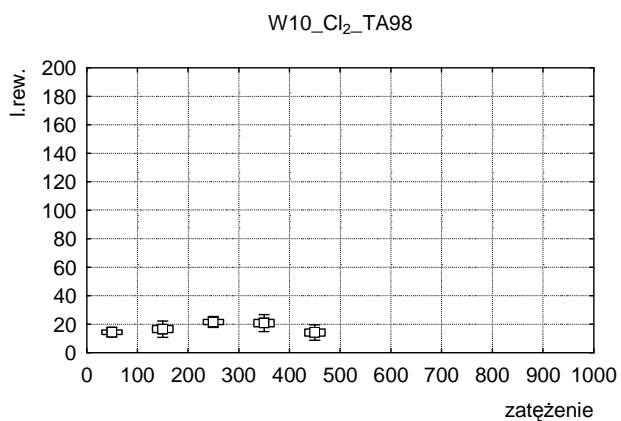
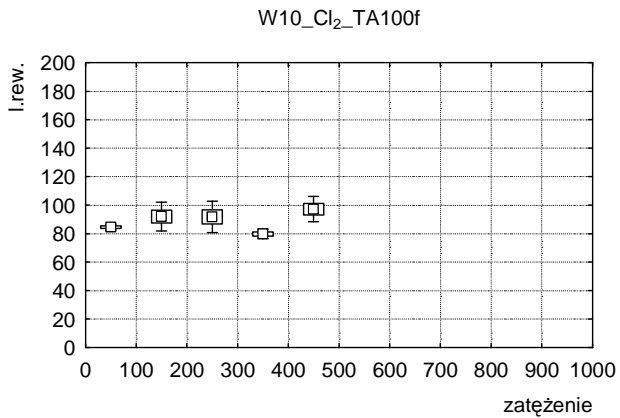
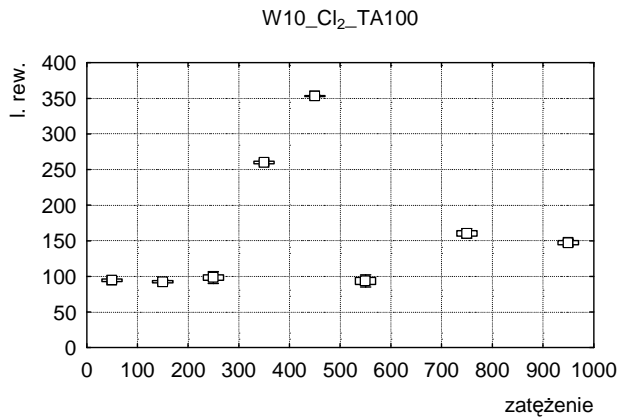
Wykres 35 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – maj



Wykres 36 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – czerwiec



Wykres 37 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – lipiec



Wykres 38 a, b, c, d. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – sierpień

Na Wykresach od 29a do 38d przedstawiono charakter krzywej zależności dawka –odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem badanej w cyklu rocznym przy użyciu szczepów testowych *Salmonella typhimurium* TA100 i TA98 zarówno z jak i bez frakcji S9-mix.

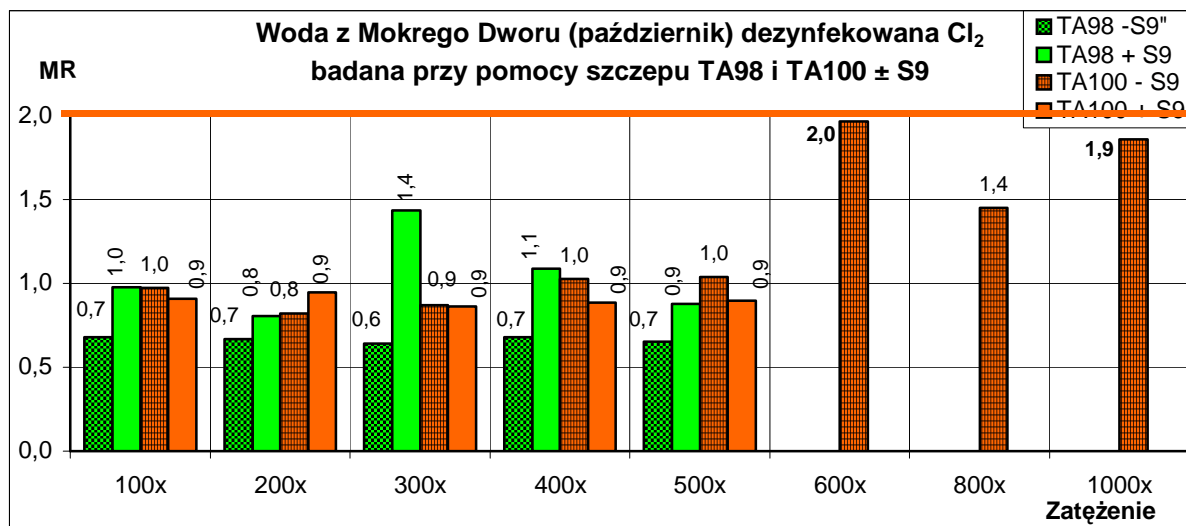
W przypadku dwóch próbek wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem, czyli dla próbki pobranej w październiku (dla szczepu TA100 bez frakcji) – Wykres 29a i w sierpniu (również TA100 bez frakcji) - Wykres 38a, krzywa dawka-odpowiedź miała charakterystyczny dla testu *Salmonella* przebieg - wraz ze wzrostem zateżenia wody rosła liczba rewertantów, aż do osiągnięcia wartości maksymalnej, po której dalsze zateżenie wody powodowało spadek ilości rewertantów, czyli pojawiał się tzw. efekt toksyczny. Dla pozostałych próbek wody niezależnie od wzrostu zateżenia próbki nie rosła liczba rewertantów, czyli uzyskane wyniki układały się w postaci linii prostej.

Analizując wykresy ramka-wąsy dla wody wodociągowej badanej w teście Amesa szczepem TA98 i porównując wyniki dla wody z zastosowaniem i bez zastosowania frakcji stwierdzono, że dla wszystkich próbek średnia dla wody z zastosowaniem frakcji była podobna do średniej bez zastosowania frakcji. Natomiast dla wody badanej szczepem TA100, nie zaobserwowano zależności podobnych jak dla wody badanej szczepem TA98. Wartości średnie dla wody bez zastosowania frakcji są raz mniejsze raz większe w porównaniu do wartości średnich z zastosowaniem frakcji. Dla wody bez zastosowania frakcji zaobserwowano również dużo większą zmienność w danych niż dla wody z zastosowaniem frakcji.

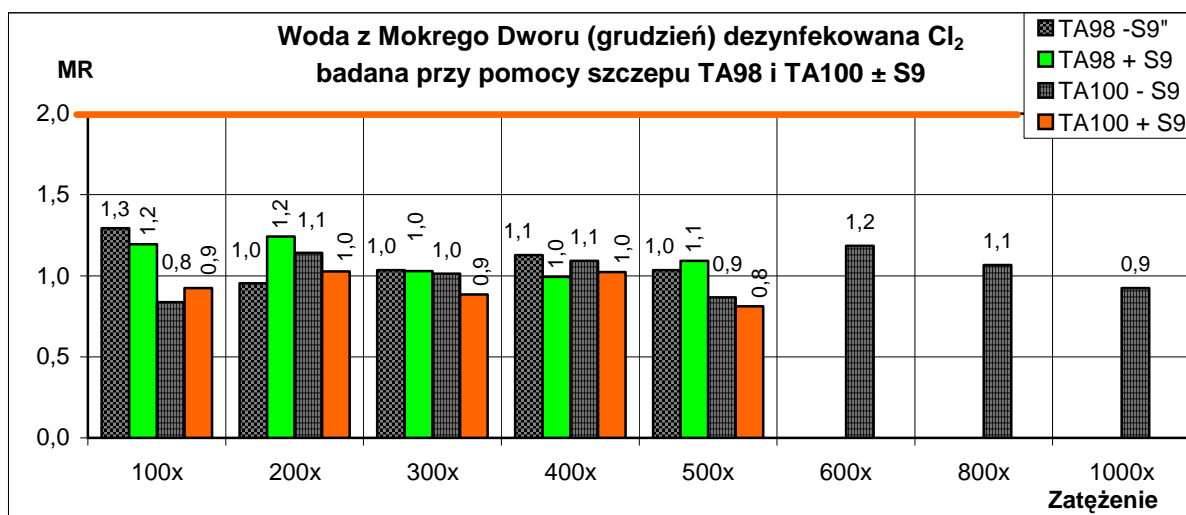
2.1.2.4. Współczynnik mutagenności (MR) wody rzeczywistej - IIA

Wyniki testów Amesa przeprowadzonych na ekstraktach wód rzeczywistych dezynfekowanych chlorem, badanych za pomocą szczepów testowych bakterii *Salmonella typhimurium* TA100 i TA98 z jak i bez aktywacji metabolicznej przedstawiono na Wykresach od 39 do 48.

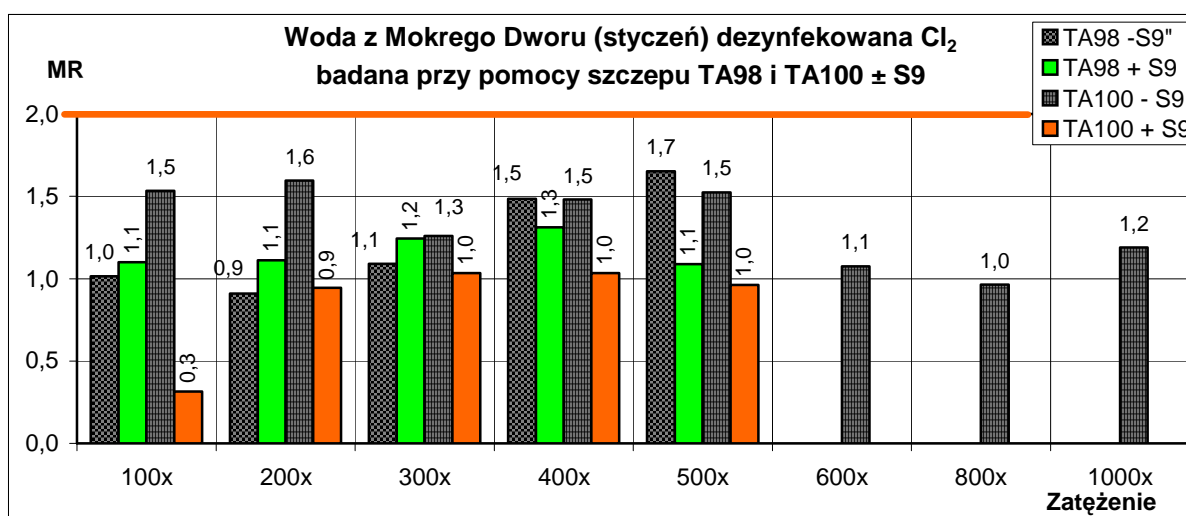
- a) Wyniki testów Amesa dla wody powierzchniowej oczyszczanej przez ZOW „Mokry Dwór”, dezynfekowanej chlorem, badanej w okresie jesienno-zimowym – Wykres 39-43.



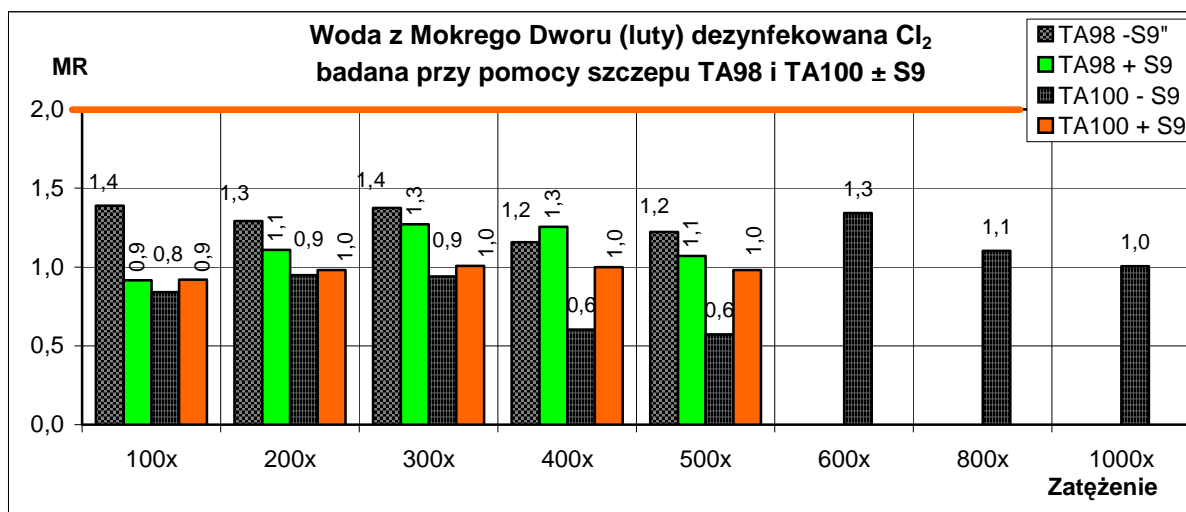
Wykres 39. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – październik



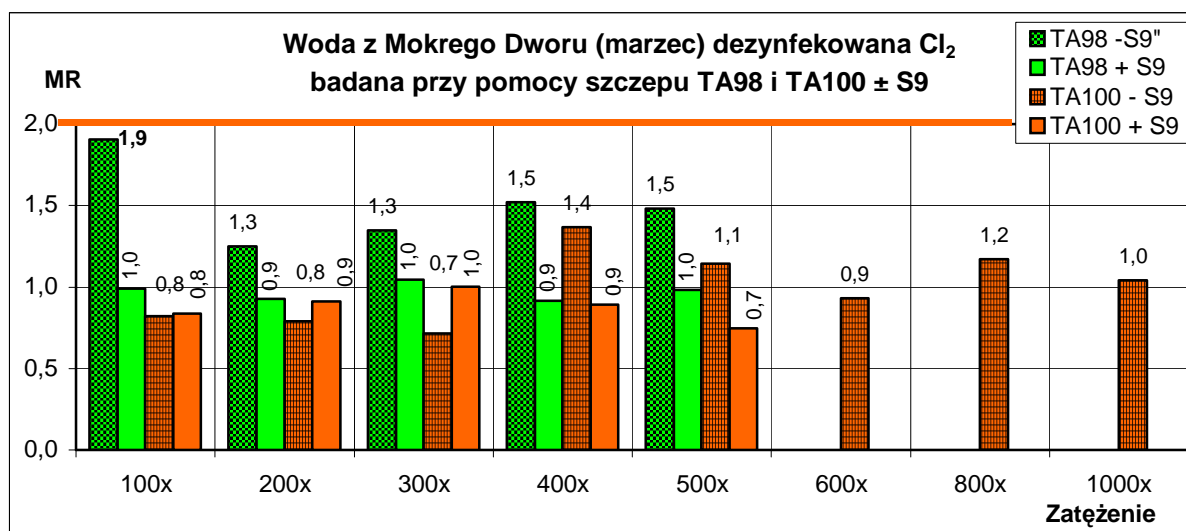
Wykres 40. MR wody powierzchniowej rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – grudzień



Wykres 41. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – styczeń



Wykres 42. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – luty

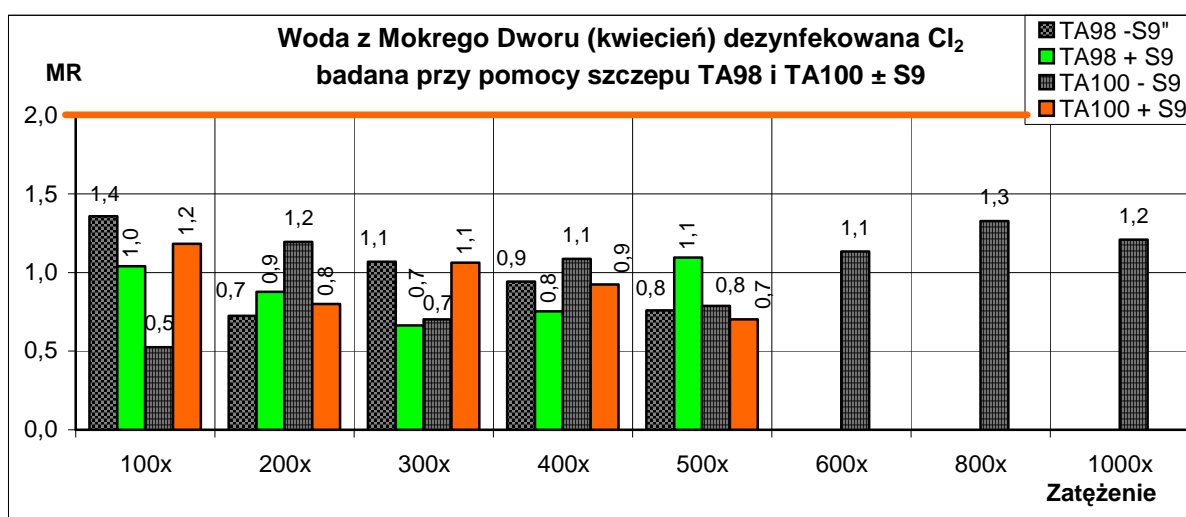


Wykres 43. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – marzec

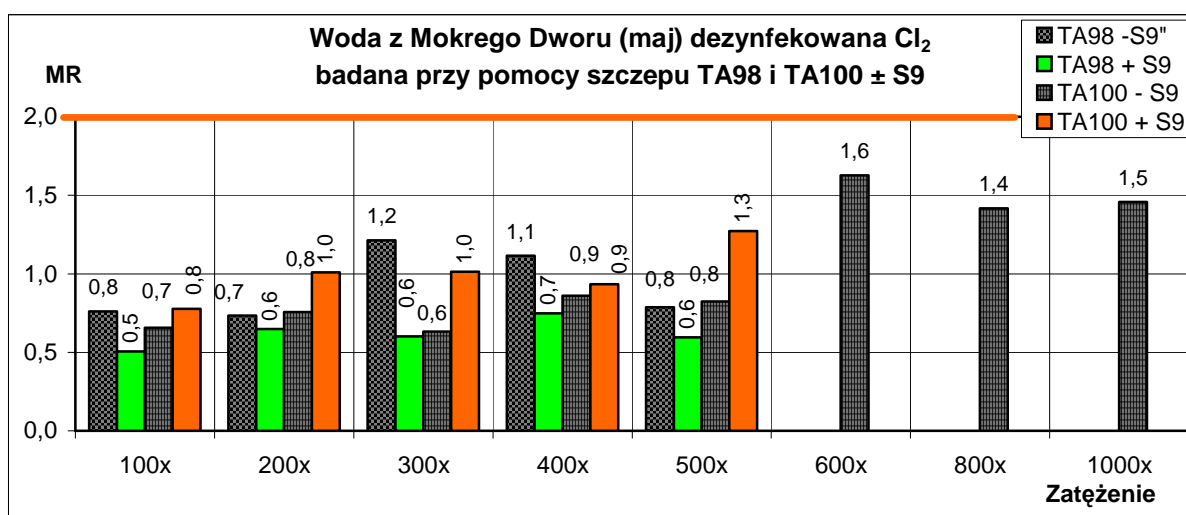
W przypadku wody powierzchniowej uzdatnianej w ZOW „Mokry Dwór” dezynfekowanej chlorem w okresie jesienno-zimowym (Wykresy od 39 do 43), nie stwierdzono występowania związków o charakterze mutagennym, które miałyby istotny wpływ na podwyższenie rewersji indukowanej szczepów *Salmonella typhimurium* TA100 i TA98, zarówno z aktywacją metaboliczną jak i bez niej. Pomimo rozszerzania zakresu zateżeń do 1 000x, w tym okresie, tylko w jednym przypadku stwierdzono występowania w badanych wodach dezynfekowanych chlorem, związków o charakterze mutagennym, które miały istotny wpływ na podwyższenie rewersji indukowanej tylko szczepu *Salmonella typhimurium* TA100 bez aktywacji metabolicznej i miało to miejsce w przypadku próbki wody pobranej w miesiącu październiku, kiedy to wskaźnik MR był równy 2,0 przy zateżeniu wody 600x (Wykres 39). Poza tym uzyskano w jedynie w dwóch przypadkach podwyższone

wartości rewersji indukowanej powodujące wzrost wskaźnika mutagenności MR do wartości bliskiej 2,0 w przypadku testów bez zastosowania frakcji mikrosomalnej. Osiągnięta wartość MR równa 1,9 miała miejsce dla wody pobranej w październiku w zateżeniu 1 000x, badanej przy użyciu szczepu TA100 (Wykres 39). W teście na wodzie z marca (Wykres 43), przy zateżeniu 100 razy wartość MR dla szczepu TA98 również wyniosła 1,90. Pozostałe wody, badane, w okresie jesienno-zimowym, przy użyciu testu Amesa bez zastosowaniem frakcji mikrosomalnej wątroby szczurów oraz wszystkie z jej zastosowaniem, nie wykazywały potencjalnych właściwości mutagennych.

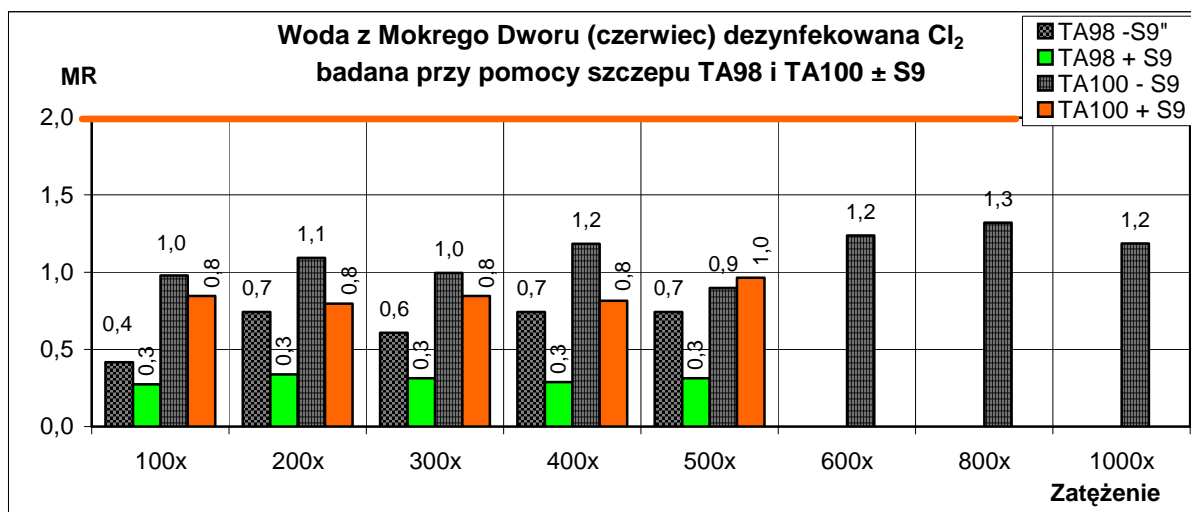
b) Wyniki testów Amesa dla wody powierzchniowej oczyszczanej przez ZOW „Mokry Dwór”, dezynfekowanej chlorem, badanej w okresie wiosenno-letnim (Wykres 44-48)



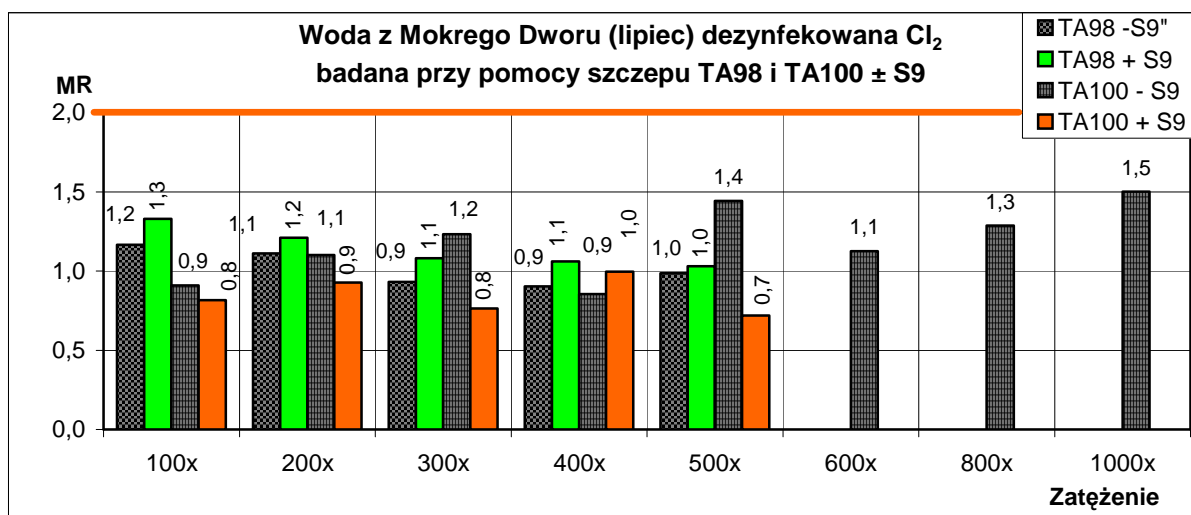
Wykres 44. MR wody powierzchniowej rzeczynistej dezynfekowanej chlorem – kwiecień



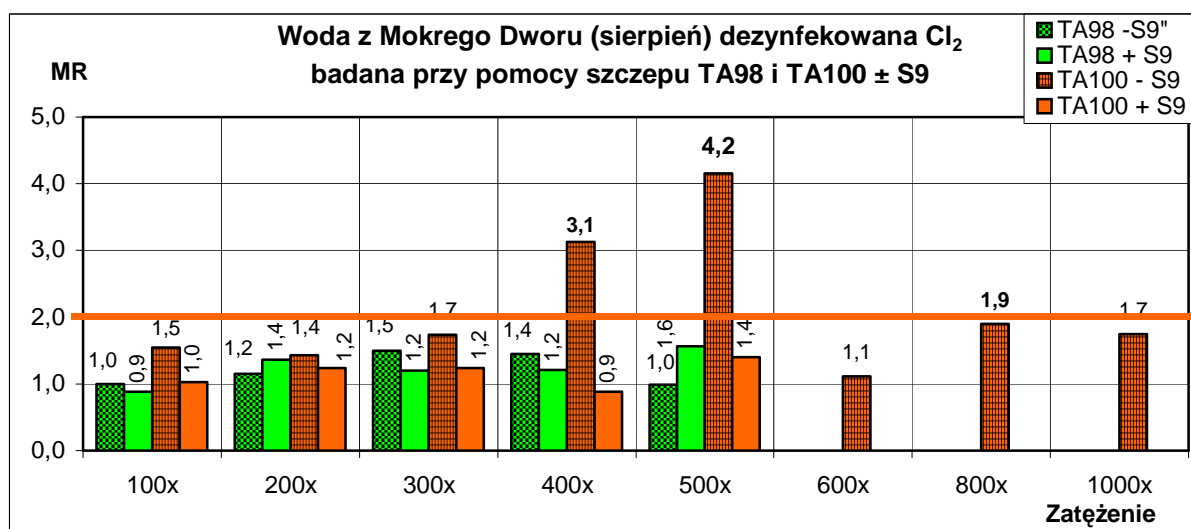
Wykres 45. MR wody rzeczynistej dezynfekowanej chlorem – maj



Wykres 46. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – czerwiec



Wykres 47. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – lipiec



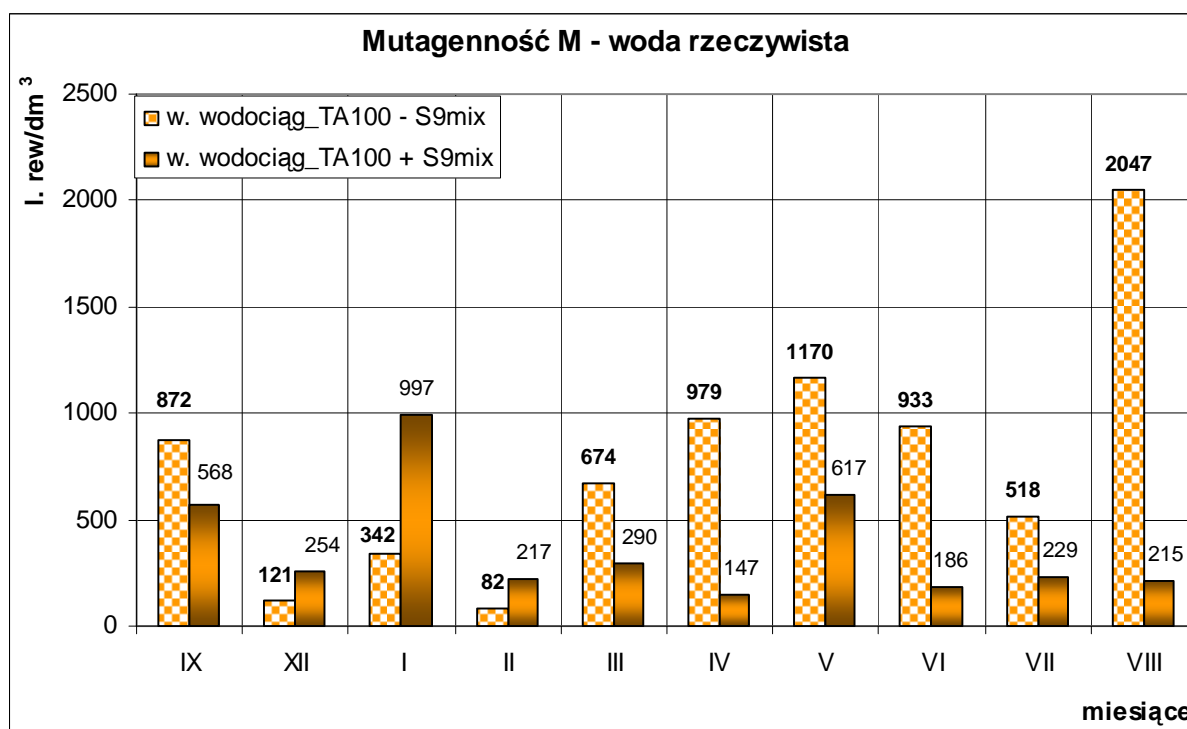
Wykres 48. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem – sierpień

W okresie wiosenno-letnim tylko w jednym przypadku stwierdzono występowanie w badanych wodach związków o charakterze mutagennym. Wskaźnik mutagenności MR w wodzie pobranej z ZOW „Mokry Dwór” w sierpniu badanej przy użyciu szczepu *S. typhimurium* TA100 (Wykres 48) przekroczył znacząco wartość 2,0 osiągając przy zateżeniu 400x wartość 3,1 a przy 500x najwyższą wartość spośród wszystkich badanych wód powierzchniowych niezależnie od sposobu dezynfekcji wynoszącą - 4,2. Natomiast przy zateżeniu 800x wartość wskaźnika mutagenności, uzyskana również dla szczepu TA100 była bliska 2,0, przyjmując wartość 1,9. Pozostałe wody dezynfekowane chlorem, badane w okresie wiosenno-letnim tak jak wody badane w okresie jesienno-zimowym, przy użyciu testu Ames bez zastosowaniem frakcji mikrosomalnej wątroby szczurów i wszystkie z jej obecnością, nie wykazywały potencjalnych właściwości mutagennych.

Z reguły w tym czasie z uwagi na warunki klimatyczne, wzrasta ilość związków zanieczyszczających wodę zarówno pochodzenia naturalnego jak i antropogenicznego. W wyniku chlorowania zmieniają się własności toksykodynamiczne powstających zanieczyszczeń, czego efektem jest podwyższenie wskaźnika mutagenności dla szczepu *S. typhimurium* TA100 [30]. Uzyskane wartości wskaźnika mutagenności dowodziły znacznego jej zanieczyszczenia związkami o aktywności biologicznej.

2.1.2.5. Mutagenność M wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem

Ze względu na to, iż w większości przypadków dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem nie udało się wyliczyć mutagenności M na podstawie wyników uzyskanych testem Ames z użyciem szczepu testowego *Salmonella typhimurium* TA98, ponieważ współczynnik kierunkowy β_1 często osiągał wartość ujemną a przez to również mutagenność M uzyskiwała wartość ujemną, w pracy zamieszczono tylko wyniki mutagenności M dla szczepu testowego TA100 zarówno z jak i bez zastosowania frakcji. Poza tym jak wynika z badań prowadzonych przez Vartiainen model do prognozowania mutagenności wody do picia opracowany został na podstawie wyników testu Ames uzyskanych z zastosowaniem szczepu *S. typhimurium* TA100 (bez aktywacji metabolicznej) [21]. Uzyskaną dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem mutagenność M przedstawiono na Wykresie 49.



Wykres 49. Obserwowana mutagenność M wody rzeczystwej dezynfekowanej chlorem

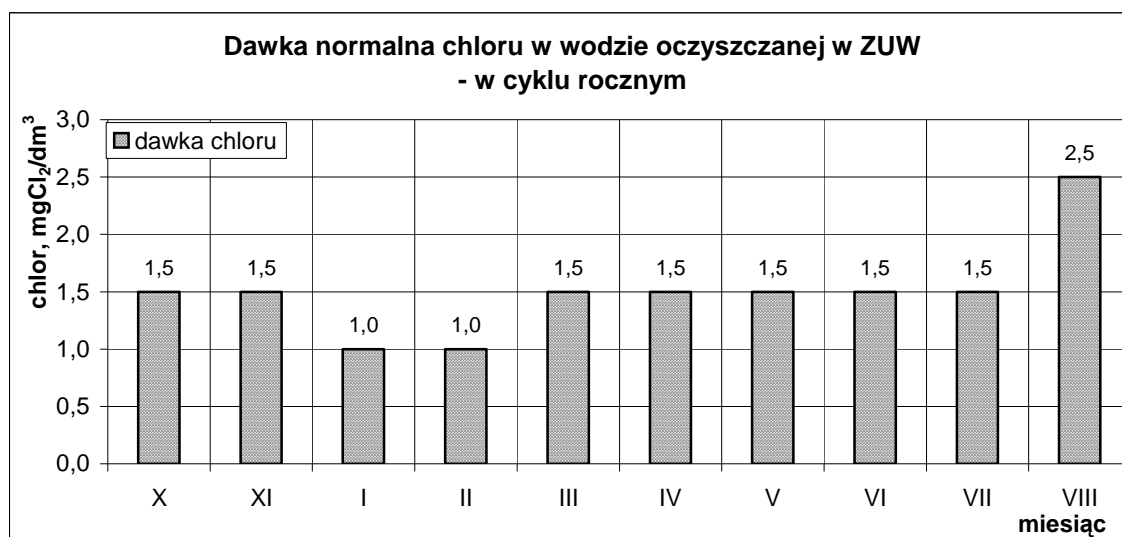
Mutagenność M próbek wody uzyskana dla szczepu TA100 bez zastosowania frakcji mikrosomalnej w okresie jesienno-zimowym (Wykres 49) osiągnęła wartość od 82 rew/dm³ dla wody pobranej w lutym do 872 rew/dm³ dla wody pobranej w październiku. W okresie wiosenno-letnim najwyższą wartość mutagenności M osiągnięto dla wody badanej w sierpniu – 2047 a najniższą w lipcu – 518 rew/dm³. Na podstawie uzyskanych wyników widać, iż w okresie wiosenno-letnim następował wyraźny wzrost mutagenności wody badanej testem *Salmonella* z użyciem szczepu TA100 bez frakcji. Mutagenność M uzyskana dla tych samych próbek wód badanych testem Ames z zastosowaniem frakcji osiągnęła również w lutym (217 rew./dm³) najniższą wartość dla okresu jesienno-zimowego a najwyższą 997 w styczniu (w obu przypadkach przewyższając wartość M osiągniętą w badaniu bez zastosowania frakcji). W okresie wiosenno-letnim mutagenność M badana z zastosowaniem frakcji w każdym przypadku była znacznie niższa od mutagenności uzyskanej w testach bez frakcji i osiągnęła wartość najniższą dla wody badanej w kwietniu (147 rew./dm³), a najwyższą w lipcu (229 rew./dm³). Analizując wyniki dla mutagenności M uzyskane szczepem TA100 w teście Ames dla rzeczystwej dezynfekowanej chlorem badanej w cyklu rocznym w porównaniu z wynikami chemicznymi wody takimi jak: zawartość OWO, stężenie azotu amonowego, dawka chloru czy też stężenia chloropochodnych (AOX i HAA), nie zauważono

jakiegokolwiek regularności i zależności, którą wykazano w wodzie modelowej dezynfekowanej chlorem.

2.2. Woda rzeczywista po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem – etap IIB

W celu ustalenia wpływu zawartości OWO, stężenia azotu amonowego i dawki chloru na aktywność mutageną wody po zastosowaniu dwutlenku chloru jako utleniacza, do wody rzeczywistej w tym etapie badań przed dezynfekcją chlorem wprowadzono dwutlenek chloru w dawce $0,4 \text{ mgClO}_2/\text{dm}^3$.

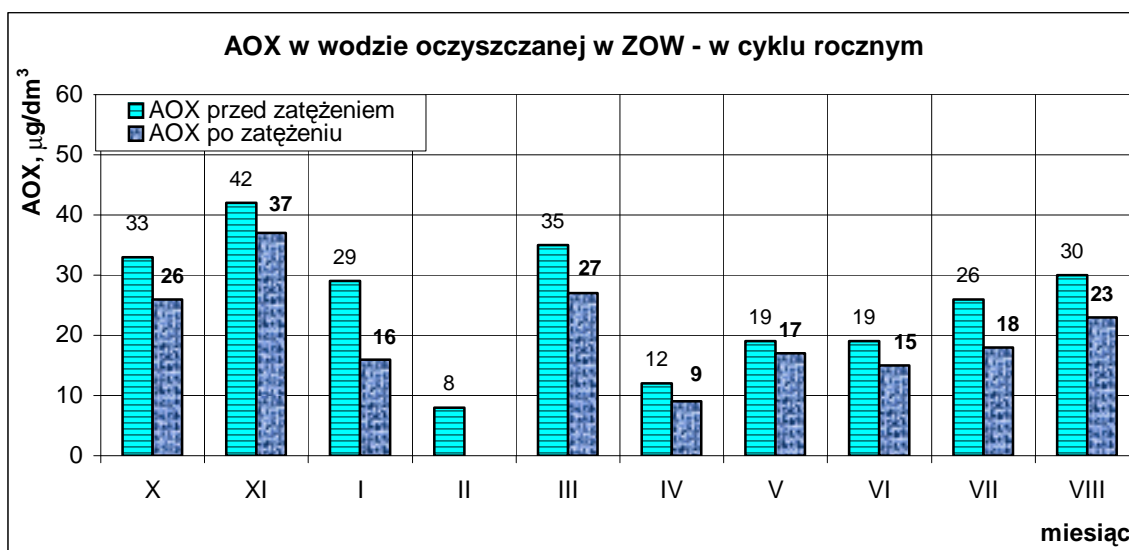
Przy wstępnym utlenianiu dwutlenkiem chloru woda rzeczywista wykazywała zapotrzebowanie na chlor w ilości od 1,0 do $2,5 \text{ mgCl}_2/\text{dm}^3$ – Wykres 50.



Wykres 50. Dawka normalna chloru zastosowana do chlorowania wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru

2.2.1. Uboczne produkty dezynfekcji wody rzeczywistej - etap IIB

W rezultacie chlorowania wody zawierającej związki organiczne po wstępnym dawkowaniu dwutlenku chloru również powstaje szereg produktów ubocznych procesu. Chlorowanie wody rzeczywistej po zastosowaniu ClO_2 również jak w przypadku wody modelowej powodowało wytworzenie ubocznych produktów tego procesu, które oznaczane były jako AOX (Wykres 51) i HAA (Wykres 52 a,b).

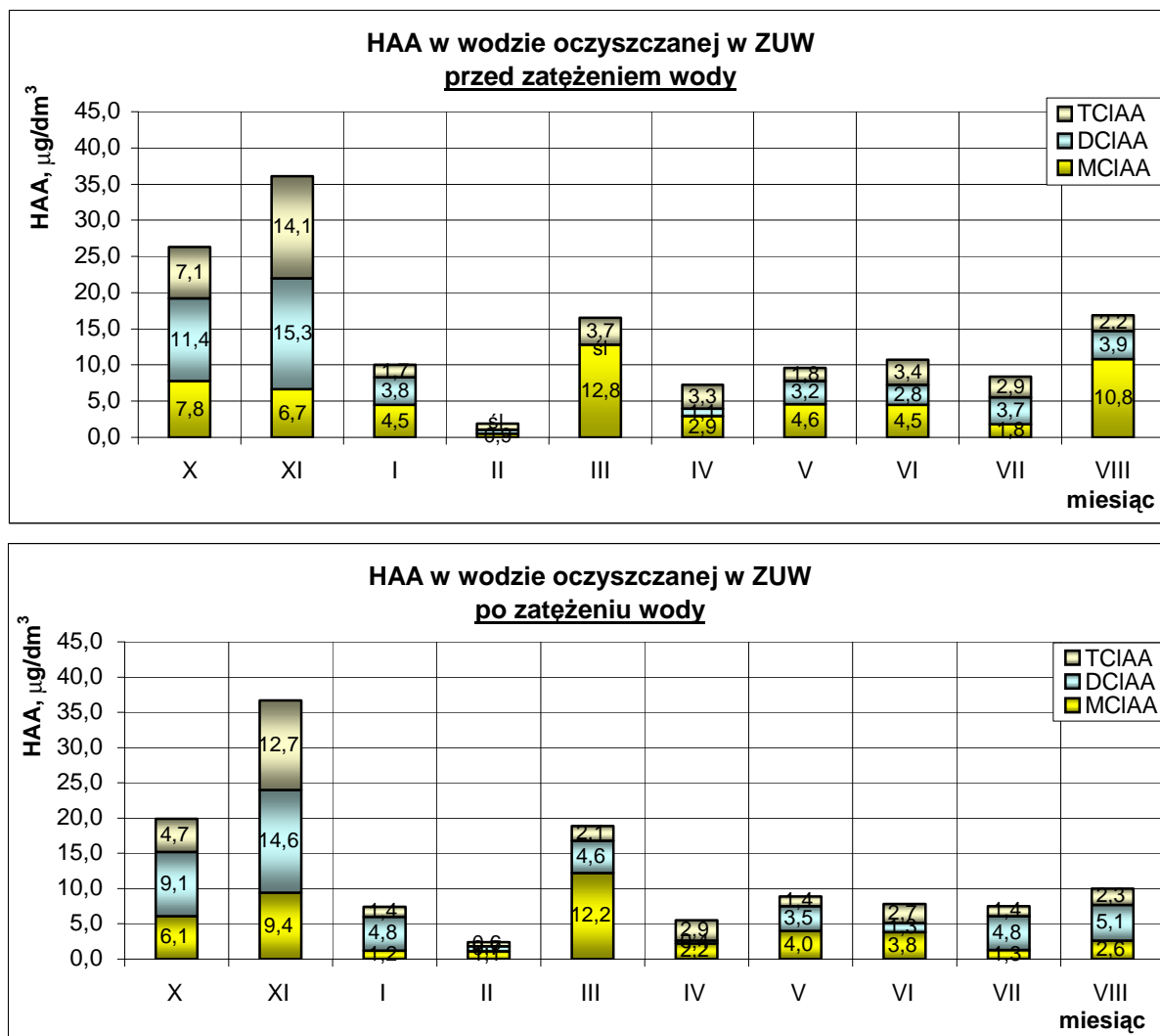


Wykres 51. AOX powstałe w wodzie rzeczynistej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed chlorowaniem

Ilość powstałych AOX w wodzie – wahała się w granicach od 8 do 42 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ przy średniej wartości 25 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, natomiast w ekstrakcie z wód zmieniała się od 9 do 37 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, czyli była niższa średnio o 31 % - Wykres 51. Udział kwasów chlorooctowych w AOX w wodzie wynosił dla: MCAA – 21 % (6-37 %), DCAA – 16 % (6-36 %) a dla TCAA – 16 % (6-34) dla sumy HAA – 53 % (24-86 %) a po jej zateżeniu był podobny w przypadku kwasów mono- i di-chlorooctowego i wynosił odpowiednio: 21 % (8-45 %) i 23 % (9-39 %) a dla kwasu trichlorooctowego wynosił średnio - 16 % (8-34 %). Po procesie zateżania udział sumy kwasów chlorooctowych w absorbowlalnych halogenowych związkach organicznych wynosił średnio 60 % (42-99 %).

Sumaryczne stężenie HAA w wodzie przed zateżeniem (Wykres 52a) wahało się w dość szerokich granicach 1,9 - 36,1 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, przy średniej wartości 14,4 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Najwyższy 41 % (19-78 %) udział w ich sumarycznym stężeniu miał kwas monochlorooctowy a udziały pozostałych dwóch kwasów były podobne i wynosiły odpowiednio 29 % (15-44 %) i 30 % (13-45 %). Zbliżone rezultaty uzyskano dla próbek wody po zateżeniu (Wykres 52b) . Sumaryczne stężenie HAA w ekstrakcie wahało się w granicach od 2,4 - 36,7 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, przy średniej wartości 12,5 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Największy udział w sumie kwasów chlorooctowych miał kwas dichlorooctowy – średnio 38 % (7-65 %), mniejszy - kwas mono- i trichlorooctowy i wynosił odpowiednio: 36 % (16-65%) i 26 % (11-35 %). Średnia skuteczność zateżania próbek wody dla sumy HAA wynosiła 77 % (59-93 %) a dla poszczególnych kwasów chlorooctowych osiągnęła wartości: 68 % (24-95%) dla MCAA, 52 % (36-95 %) dla DCAA – a dla TCAA – 73 % (48-90).

W wodzie nie stwierdzono obecności pochodnych bromowych kwasu octowego.



Wykres 52 a i b. HAA powstałe w wodzie rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed chlorowaniem

2.2.2. Badania bioindykacyjne – test Ames – etap IIB

Celem badań na wodzie wodociągowej była ocena jakości zdrowotnej wrocławskiej wody wodociągowej w aspekcie powstających pochodnych chlorowych, również po zastosowaniu dwutlenku chloru. Jak również określenie mutagenności M badanych wód w celu weryfikacji modelu Vartiainen. Podobnie jak w etapie IIA w badaniach zastosowano szczepy testowe *Salmonella typhimurium* TA100 i TA98 a testy wykonano zarówno z frakcją mikrosomalną S9-mix jak i bez jej zastosowania. Liczbę rewertantów spontanicznych i indukowanych dla TA98 i TA100, w badaniach prowadzonych bez i z zastosowaniem frakcji S9-mix zamieszczono poniżej:

Szczep	LR spontanicznych		LR indukowanych (pozytywnych)	
	- S9 – mix	+ S9 - mix	- S9 – mix	+ S9 - mix
TA98	21-34	27-40	3300-4149 dla 2,4,7-TNFon	1658-2670 dla 2-AF
TA100	99-128	122-165	1000-1299 dla NQNO	859-869 dla 2-AF

Przy przedstawianiu i obróbce wyników przy użyciu podstawowej statystyki opisowej jak również testowej w tabelach i na wykresach ramka-wąsy (box-plotach) użyto oznaczeń próbek wody według schematów przedstawionych w punkcie 2.1.2 .

2.2.2.1. Wyniki testu Amesa wraz z podstawową statystyką opisową – etap IIB

Poniżej przedstawiono podstawową statystykę opisową wyników testu Amesa zarówno z jak i bez aktywacji metabolicznej dla wariantów z zastosowanymi szczepami *S. typhimurium* TA100 i TA98 (Tabela 30-33), czyli wyliczono średnią liczbę rewertantów dla danej próbki wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem wraz z odchyleniem standardowym jak również określono minimum i maximum, medianę oraz rangę i współczynnik zmienności CV.

Tabela 30. Statystyka opisowa – woda rzeczywista IIB - TA100-S9 mix

Statystyka opisowa	W1_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W2_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W3_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W4_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W5_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W6_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W7_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W8_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W9_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W10_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100
średnia	105	92	102	79	78	61	69	90	107	147
odchylenie standardowe	17	11	10	21	24	31	37	10	28	41
min	55	66	84	46	46	28	31	79	78	79
max	130	113	120	131	132	131	188	121	173	229
mediana	107	93	103	75	70	49	58	87	98	149
ranga	75	47	36	85	86	103	157	42	95	150
CV	16%	12%	9%	26%	31%	51%	53%	11%	26%	28%

Tabela 31. Statystyka opisowa – woda rzeczywista IIB - TA100 +S9 mix

Statystyka opisowa	W1_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W2_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W3_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W4_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W5_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W6_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W7_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W8_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W9_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100	W10_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA100
średnia	110	109	66	89	84	57	71	77	80	90
odchylenie standardowe	12	11	13	14	16	9	11	5	15	14
min	78	83	45	60	62	42	50	67	53	50
max	127	130	98	108	119	73	96	87	106	115
mediana	110	109	66	91	82	57	71	76	80	92
ranga	49	47	53	48	57	31	46	20	53	65
CV	11%	10%	20%	15%	19%	15%	15%	7%	19%	15%

Tabela 32. Statystyka opisowa – woda rzeczywista IIB - TA98-S9 mix

Statystyka opisowa	W1_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W2_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W3_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W4_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W5_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W6_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W7_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W8_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W9_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W10_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98
średnia	20	20	16	20	16	17	13	12	16	14
odchylenie standardowe	6	10	3	5	5	5	4	3	4	4
min	7	11	10	12	7	8	6	7	9	8
max	30	66	23	29	29	26	25	19	24	23
mediana	21	18	16	19	15	15	13	11	15	13
ranga	23	55	13	17	22	18	19	12	15	15
cv	31%	51%	19%	24%	33%	32%	30%	29%	25%	26%

Tabela 33. Statystyka opisowa – woda rzeczywista IIB - TA98+S9 mix

Statystyka opisowa	W1_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W2_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W3_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W4_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W5_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W6_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W5_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W8_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W9_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98	W10_f_ ClO ₂ iCl ₂ _ TA98
średnia	22	29	21	26	21	23	24	17	23	24
odchylenie standardowe	4	16	4	5	7	5	9	3	4	6
min	15	4	15	15	13	12	9	11	15	14
max	29	59	26	38	38	33	53	24	31	39
mediana	22	25	22	26	19	22	23	17	23	23
ranga	14	55	11	23	25	21	44	13	16	25
cv	18%	53%	19%	21%	31%	22%	36%	20%	20%	26%

Dla próbek wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru badanej w teście Amesa szczepem *S. typhimurium* TA100 bez zastosowania frakcji (Tabela 30) w okresie jesienno-zimowym zaobserwowano spadek wartości średniej rewertantów od 105 do 78, wyjątek stanowiła próbka W3. W okresie wiosenno-letnim następuje wzrost średniej liczby rewertantów od 61 do 147. Analiza wartości pozostałych statystyk opisowych, wykazała, iż wyróżniają się próbki W6, W7, tak jak w przypadku wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem, gdzie zarówno odchylenie standardowe, jak i wartości rang były znacznie większe niż dla pozostałych próbek.

Dla próbek wody po zastosowaniu frakcji (Tabela 31) nie zaobserwowano dużych różnic w wartościach statystyk. Zarówno odchylenie standardowe, ranga jak i współczynnik zmienności były do siebie zbliżone. Natomiast wartości średnie układały się w sposób charakterystyczny podobny jak dla próbek z wód badanych bez zastosowania frakcji. Dla próbek W1 do W5 zaobserwowano spadek wartości średniej od 110 do 84 rewertanów, a dla próbek od W6 do W10 miał miejsce wzrost średniej liczby rewertanów od 57 do 90.

W przypadku tych samych próbek wody wodociągowej badanej testem Amesa z zastosowaniem szczepu TA98 bez frakcji (Tabela 32) analizując wartości średnie nie zauważono żadnej tendencji wzrostowej czy spadkowej. Ze względu na wyróżniające się wartości rangi oraz odchylenia standardowego w próbce W2, które były prawie dwukrotnie większe niż dla pozostałych próbek, można wnioskować, że miał miejsce duży rozrzut

w danych i średnia słabo opisywała próbkę. Dla pozostałych wyników wartości odchylenia standardowego, rangi jak również współczynnika zmienności dla poszczególnych próbek były do siebie zbliżone.

Podobnie jak dla wody rzeczywistej badanej szczepem TA98 z zastosowaniem frakcji (Tabela 33), wyróżnia się próbka W2, gdzie wartości odchylenia standardowego, rangi i współczynnika zmienności były dużo większe niż dla pozostałych próbek. Również wartość średniej dla W2 była największa, ale ze względu na charakter tych danych (duża wartość średniej dla tej próbki była spowodowane dużym rozrzutem i dużą zmiennością danych), średnia dla W2 słabo opisywała próbkę. Dla pozostałych rezultatów wartości średnie były do siebie zbliżone i nie zaobserwowano żadnych charakterystycznych tendencji.

2.2.2.2. Rozkład prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody rzeczywistej - IIB

W analizie wyników dotyczących rozkładu prawdopodobieństwa liczby rewertantów dla wody rzeczywistej wzięto pod uwagę również tak jak w przypadku wody modelowej wyniki uzyskane testem Shapiro-Wilka, ponieważ pozostałe dwa testy są testami asymptotycznymi, czyli działającymi poprawnie dla próbek o dużej liczności. Statystyka testowa wyników testu Ames dla szczepu testowego TA100 z i bez zastosowania aktywacji metabolicznej została zamieszczona w Tabeli 34, a dla szczepu TA98 również z i bez frakcji S9-mix w Tabeli 35.

Tabela 34. Statystyka testowa – woda rzeczywista IIB - TA100 ±S9 mix

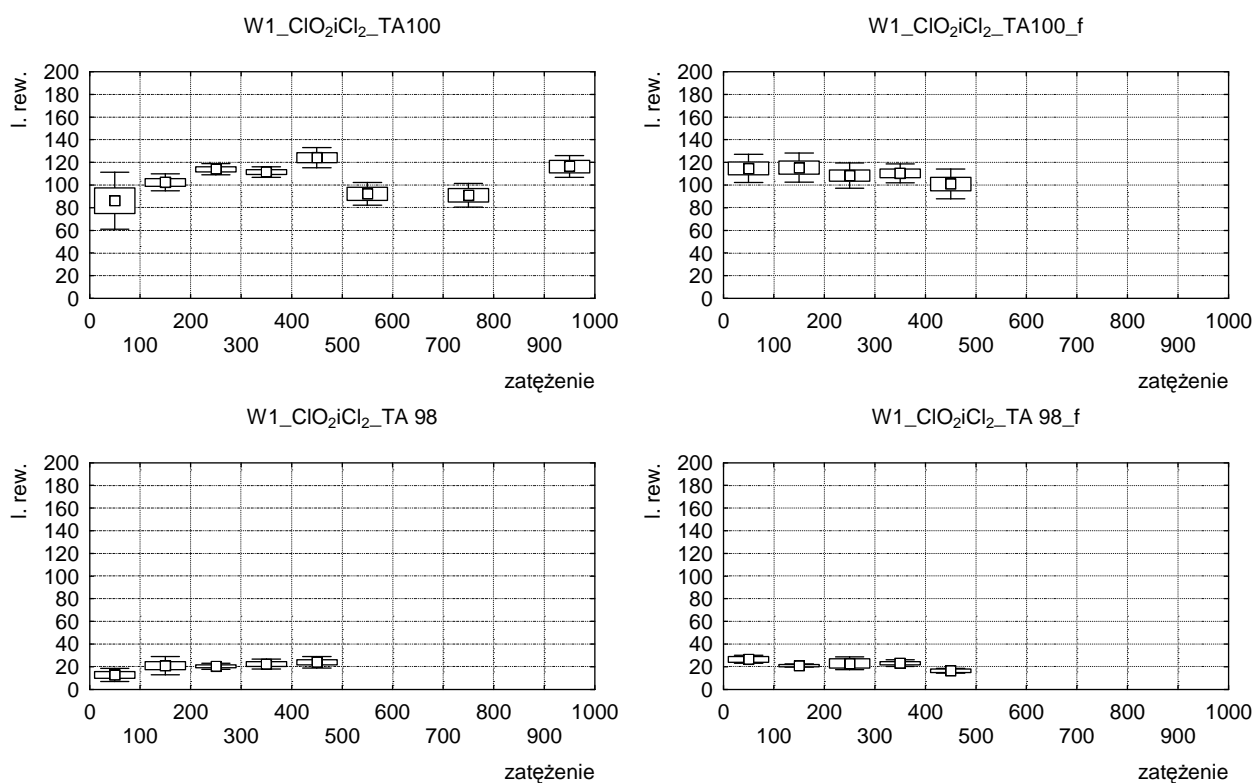
Próba	N	Testy normalności			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnova	Lilieforsa	Shapiro-Wilka	
W1_CIO2iCl2_TA100	33	p > 0,20	p < 0,10	0,079266	normalny
W1_CIO2iCl2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,290114	normalny
W2_CIO2iCl2_TA100	28	p > 0,20	p > 0,20	0,429079	normalny
W2_CIO2iCl2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,921336	normalny
W3_CIO2iCl2_TA100	34	p > 0,20	p > 0,20	0,19564	normalny
W3_CIO2iCl2_TA100f	24	p > 0,20	p > 0,20	0,105147	normalny
W4_CIO2iCl2_TA100	34	p > 0,20	p < 0,15	0,029068	brak normalności
W4_CIO2iCl2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,085897	normalny
W5_CIO2iCl2_TA100	32	p < 0,10	p < 0,01	0,010912	brak normalności
W5_CIO2iCl2_TA100f	25	p > 0,20	p < 0,10	0,065062	normalny
W6_CIO2iCl2_TA100	34	p < 0,05	p < 0,01	0,000106	brak normalności
W6_CIO2iCl2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,515424	normalny
W7_CIO2iCl2_TA100	34	p < 0,05	p < 0,01	0,000066	brak normalności
W7_CIO2iCl2_TA100f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,880880	normalny
W8_CIO2iCl2_TA100	31	p < 0,05	p < 0,01	0,00001	brak normalności
W8_CIO2iCl2_TA100f	24	p > 0,20	p > 0,20	0,74230	normalny
W9_CIO2iCl2_TA100	34	p < 0,01	p < 0,01	0,00001	brak normalności
W9_CIO2iCl2_TA100f	24	p > 0,20	p > 0,20	0,652893	normalny
W10_CIO2iCl2_TA100	34	p < 0,05	p < 0,01	0,00161	brak normalności
W10_CIO2iCl2_TA100f	24	p > 0,20	p < 0,10	0,07352	normalny

Tabela 35. Statystyka testowa – woda rzeczywista IIB - TA98 ±S9 mix

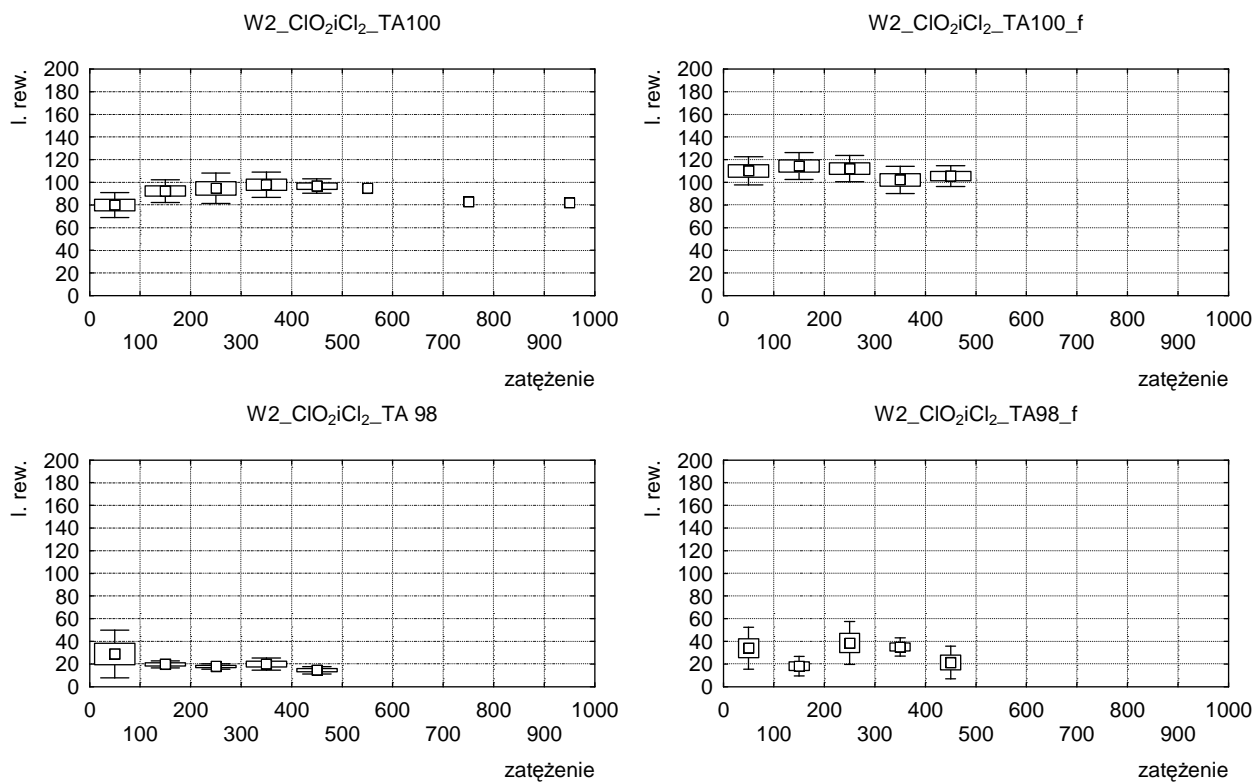
Próba	N	Testy normalności			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnova	Lilieforsa	Shapiro-Wilka	
W1_CIO2iCl2_TA 98	24	p > 0,20	p > .20	0,538199	normalny
W1_CIO2iCl2_TA 98f	13	p > 0,20	p > 0,20	0,909597	normalny
W2_CIO2iCl2_TA 98	25	p < 0,05	p < 0,01	0,000000	normalny
W2_CIO2iCl2_TA 98f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,33354	normalny
W3_CIO2iCl2_TA 98	25	p > 0,20	p > 0,20	0,626967	normalny
W3_CIO2iCl2_TA 98f	24	p > 0,20	p < 0,05	0,005712	brak normalności
W4_CIO2iCl2_TA 98	23	p > 0,20	p > 0,20	0,361238	normalny
W4_CIO2iCl2_TA 98f	24	p > 0,20	p > 0,20	0,962018	normalny
W5_CIO2iCl2_TA 98	25	p > 0,20	p > 0,20	0,582026	normalny
W5_CIO2iCl2_TA 98f	25	p > 0,20	p < 0,05	0,045600	brak normalności
W6_CIO2iCl2_TA 98	25	p > 0,20	p < 0,20	0,422260	normalny
W6_CIO2iCl2_TA 98f	24	p < 0,15	p < 0,01	0,149611	normalny
W7_CIO2iCl2_TA 98	24	p > 0,20	p < 0,15	0,034536	brak normalności
W7_CIO2iCl2_TA 98f	25	p > 0,20	p < 0,05	0,004362	brak normalności
W8_CIO2iCl2_TA 98	25	p < 0,20	p < 0,01	0,023000	brak normalności
W8_CIO2iCl2_TA 98f	23	p > 0,20	p > 0,20	0,956640	normalny
W9_CIO2iCl2_TA 98	25	p > 0,20	p > 0,20	0,766501	normalny
W9_CIO2iCl2_TA 98f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,692354	normalny
W10_CIO2iCl2_TA 98	25	p > 0,20	p > 0,20	0,484461	normalny
W10_CIO2iCl2_TA 98f	25	p > 0,20	p > 0,20	0,192497	normalny

W badaniach przy zastosowaniu szczepu TA100 (Tabela 34) głównie odrzucona została hipoteza o tym, że dane pochodzą z rozkładu normalnego w przypadku wody badanej bez zastosowania frakcji. Natomiast dla rezultatów uzyskanych z użyciem szczepu TA98 (Tabela 35) z zastosowaniem frakcji stwierdzono więcej próbek, które nie pochodzą z populacji o rozkładzie normalnym (cztery z pięciu). Pozostałe próbki badane szczepem TA98 wykazywały rozkład normalny.

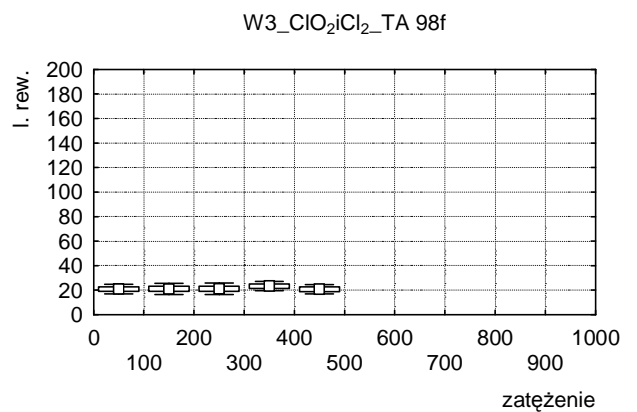
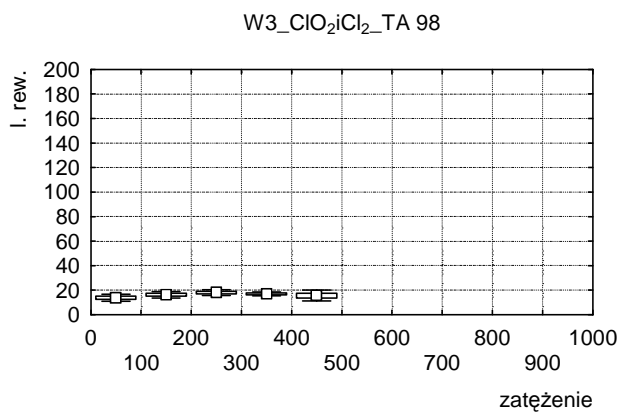
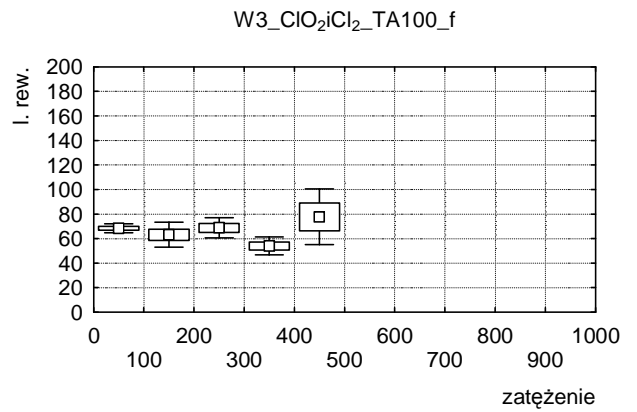
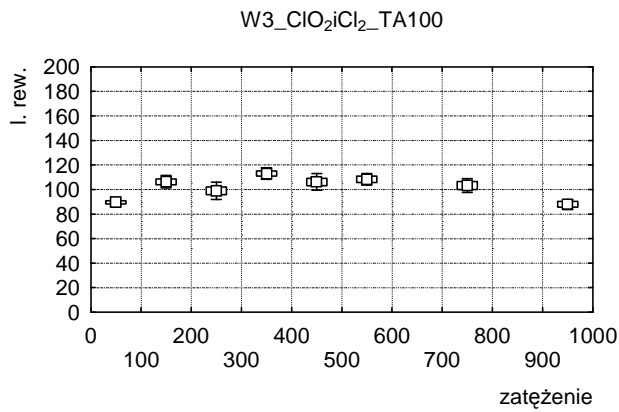
2.2.2.3. Krzywa zależności dawka–odpowieź dla wody rzeczywistej – etap IIB



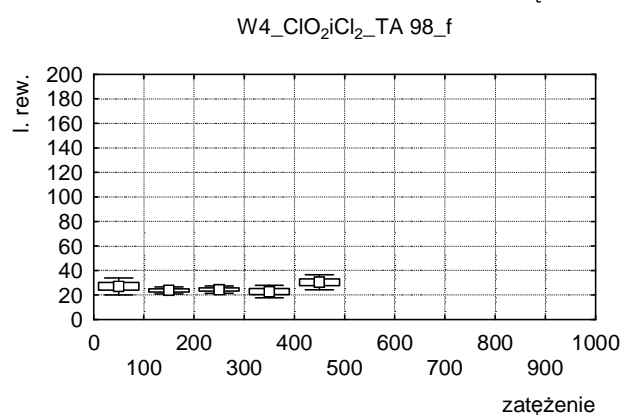
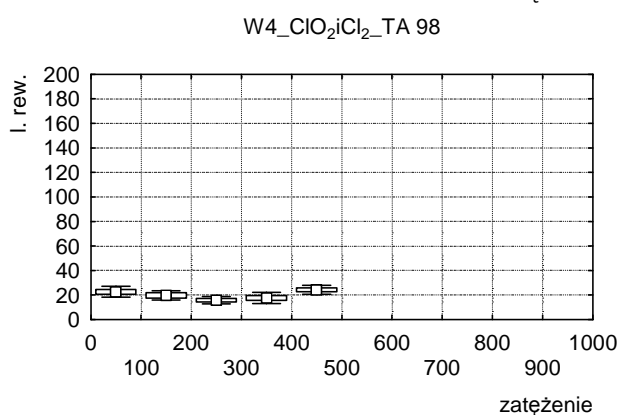
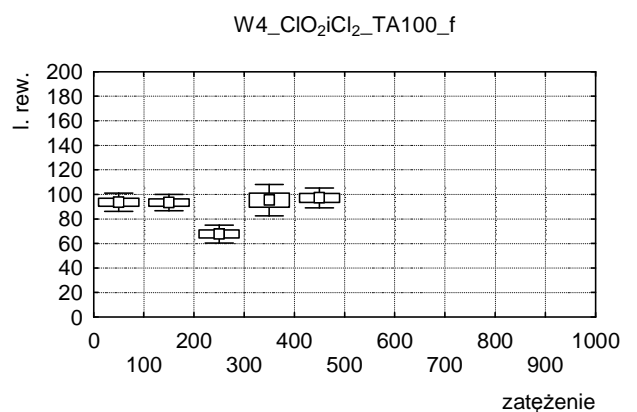
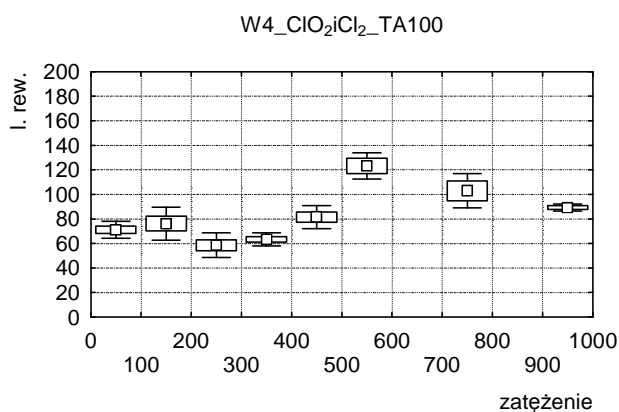
Wykres 53. Zależność dawka-odpowieź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – październik



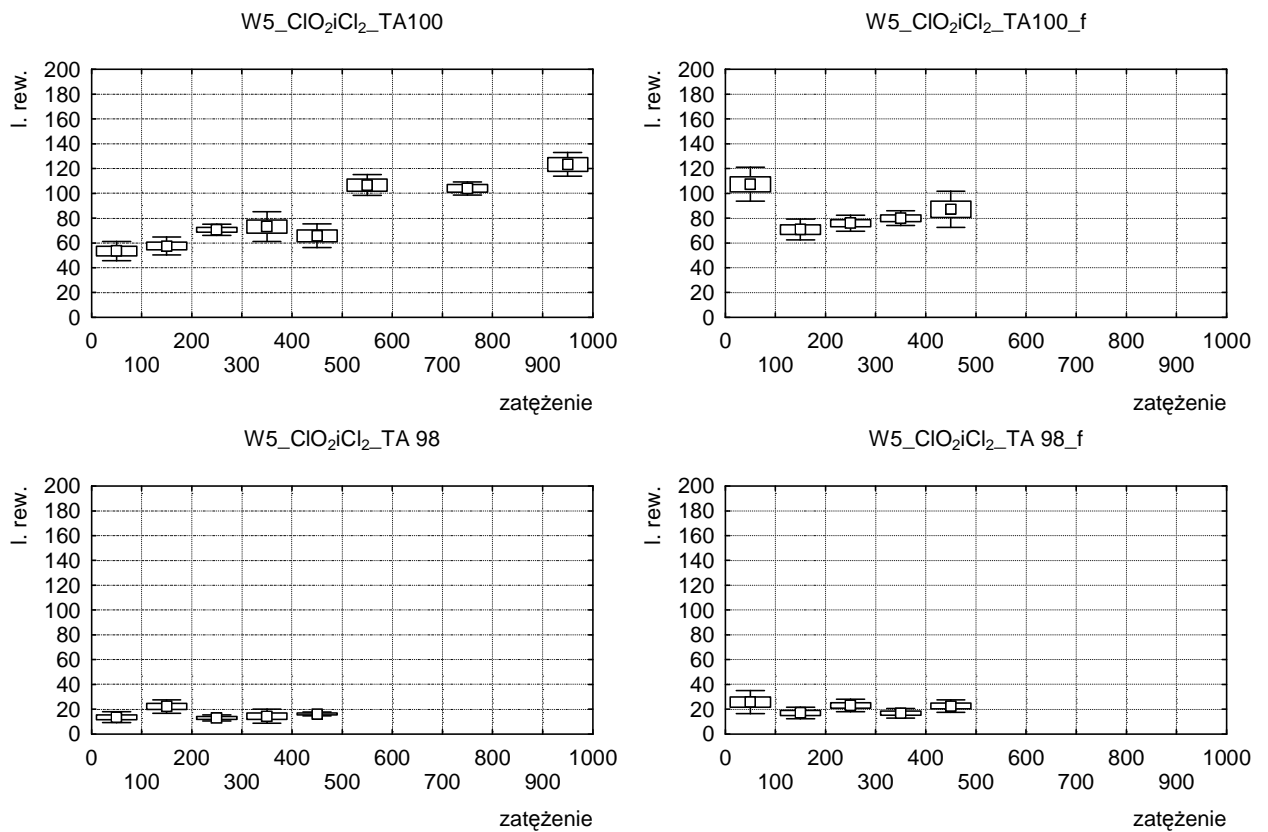
Wykres 54. Zależność dawka-odpowieź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – grudzień



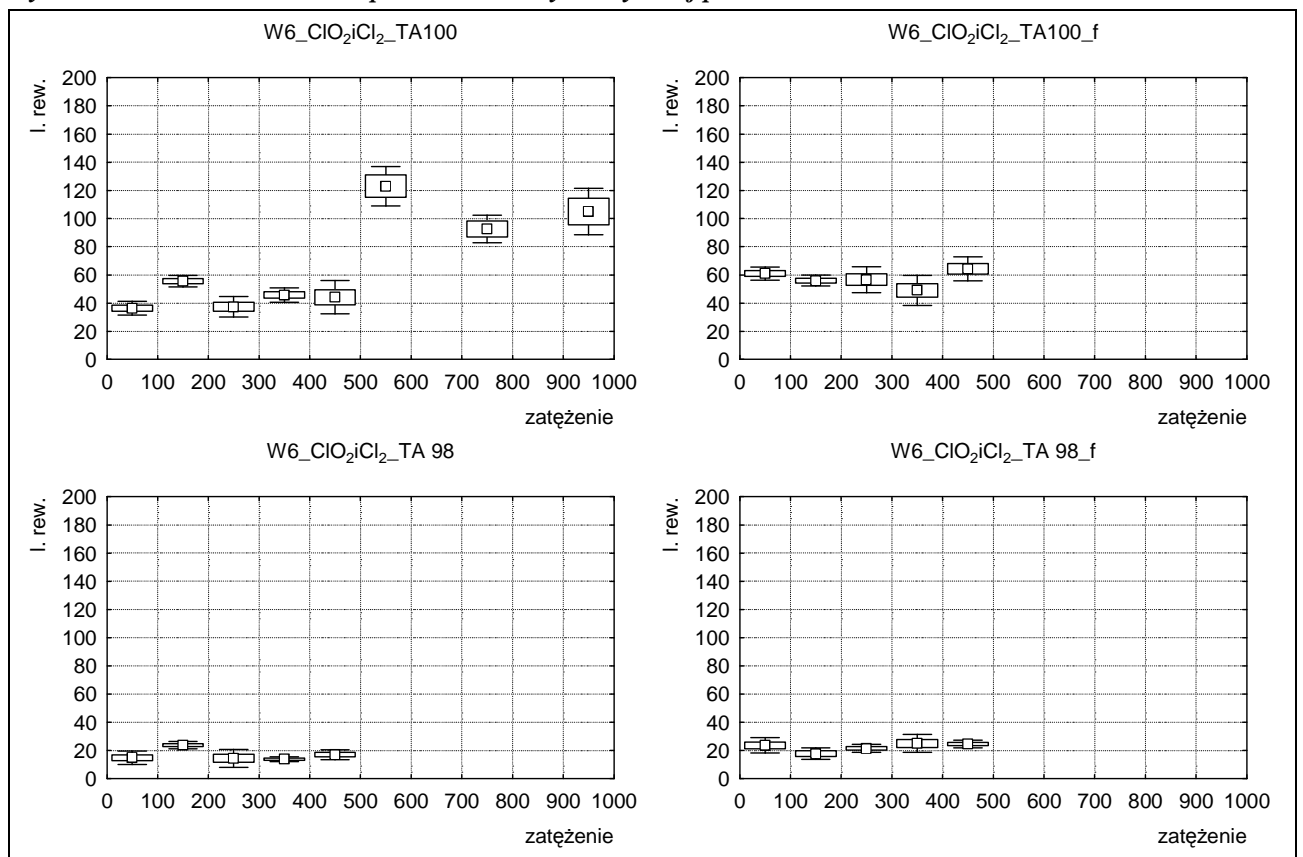
Wykres 55. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – styczeń



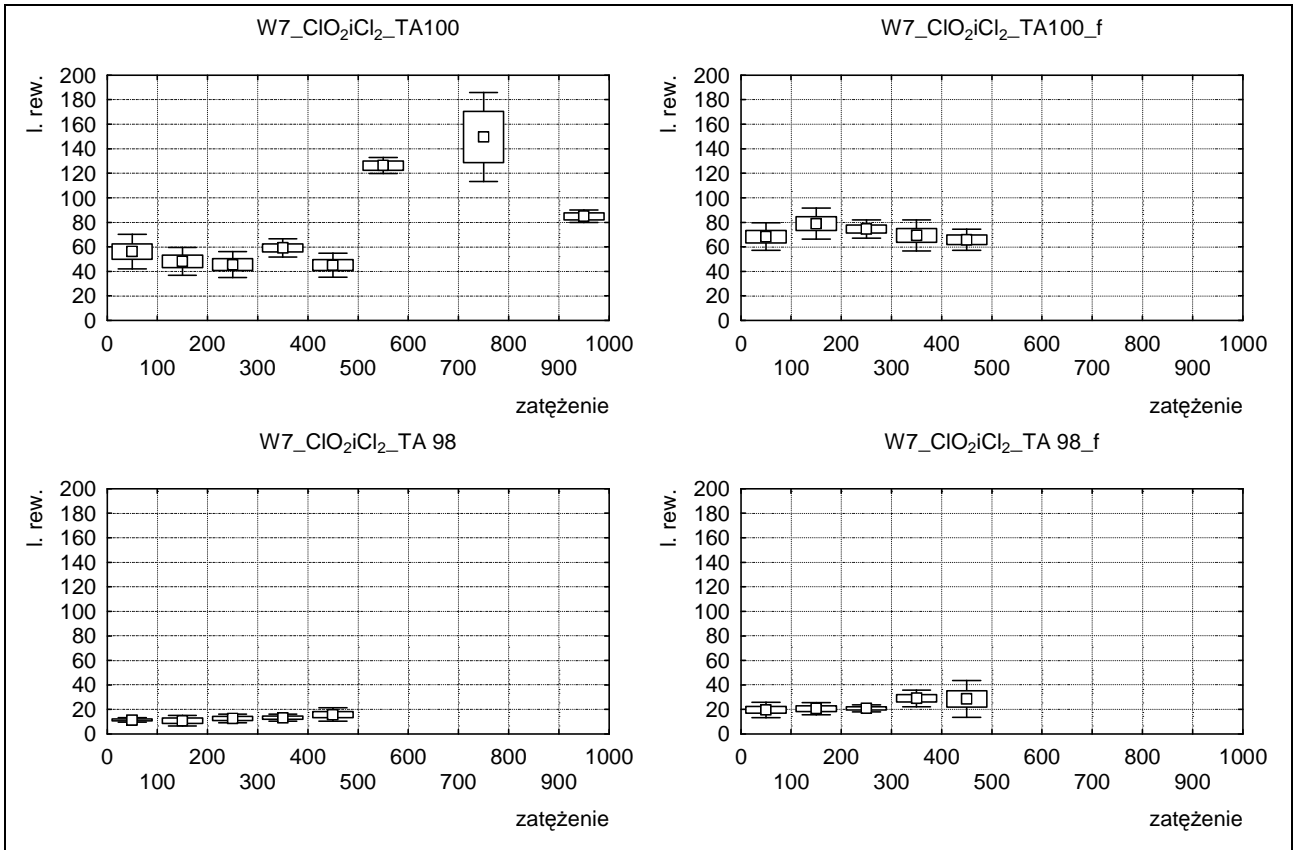
Wykres 56. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – luty



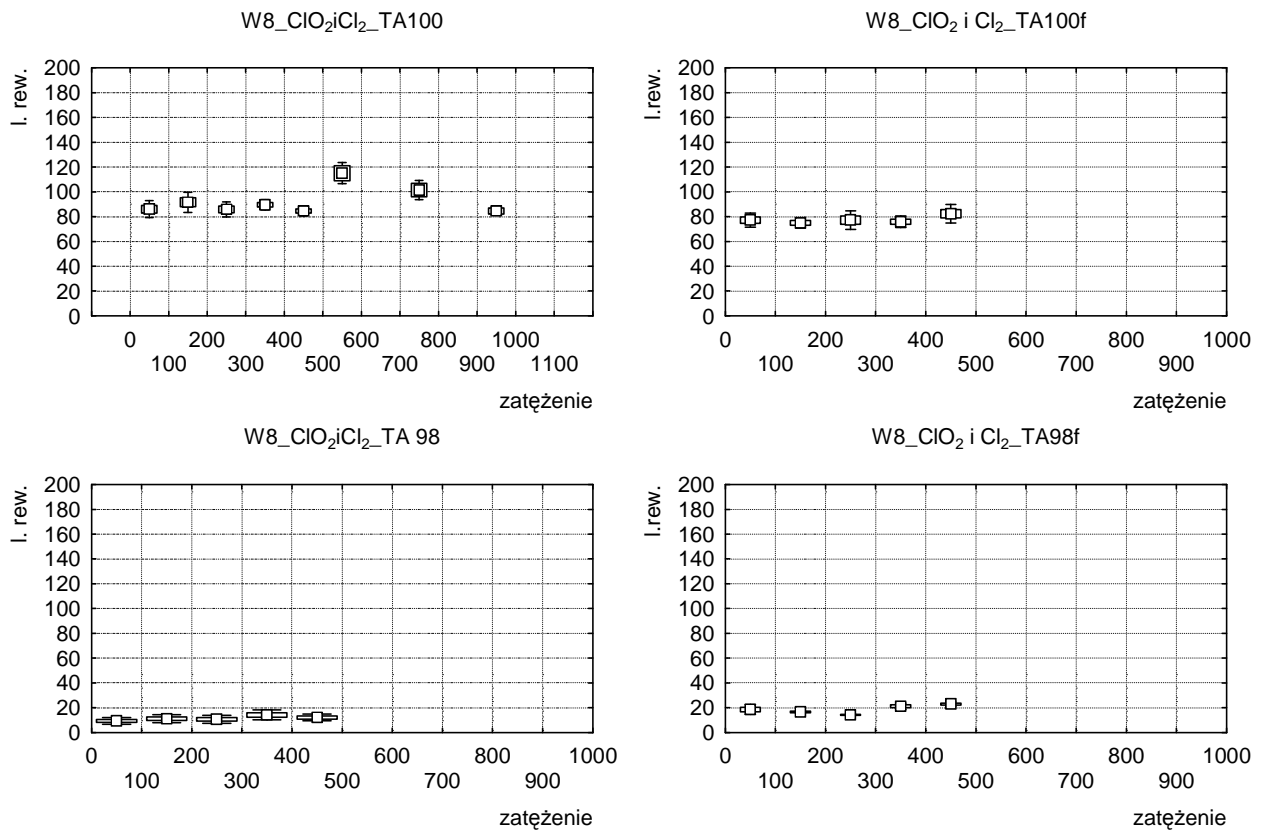
Wykres 57. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – marzec



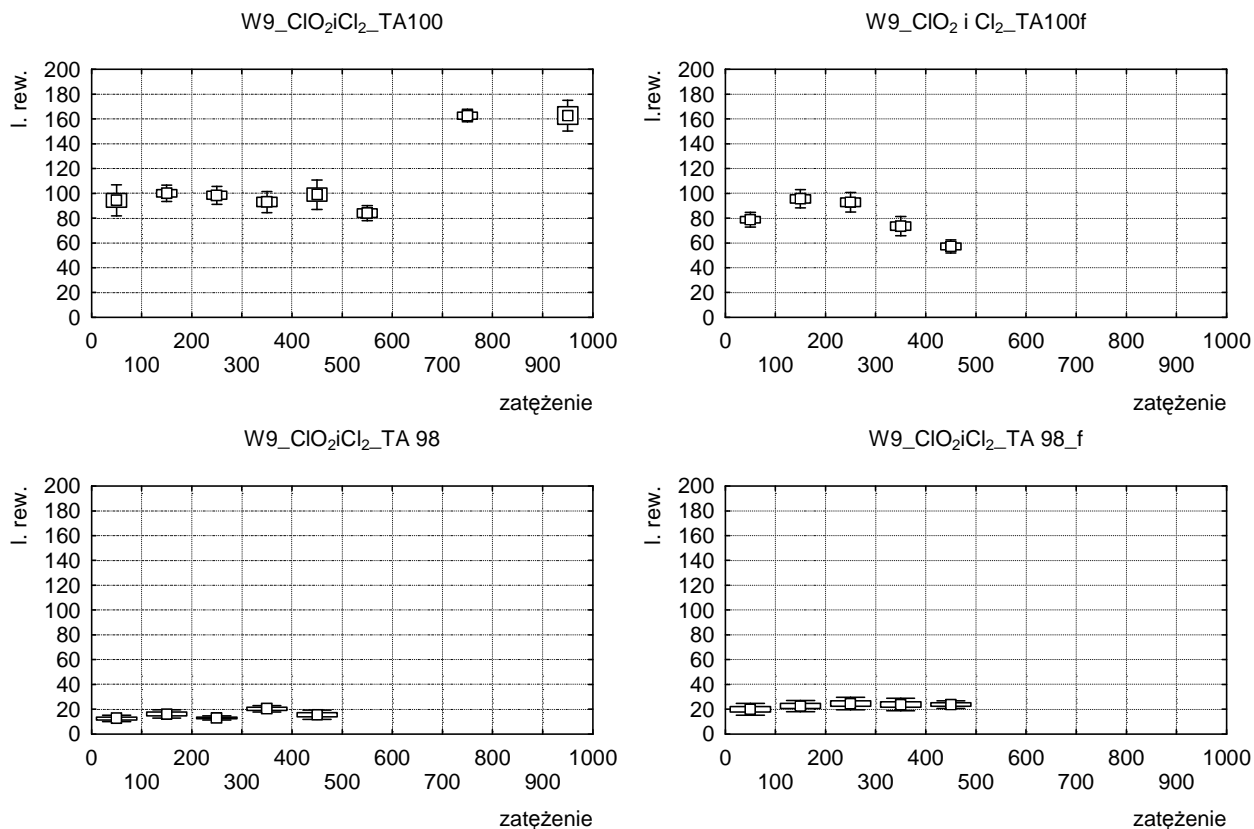
Wykres 58. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – kwiecień



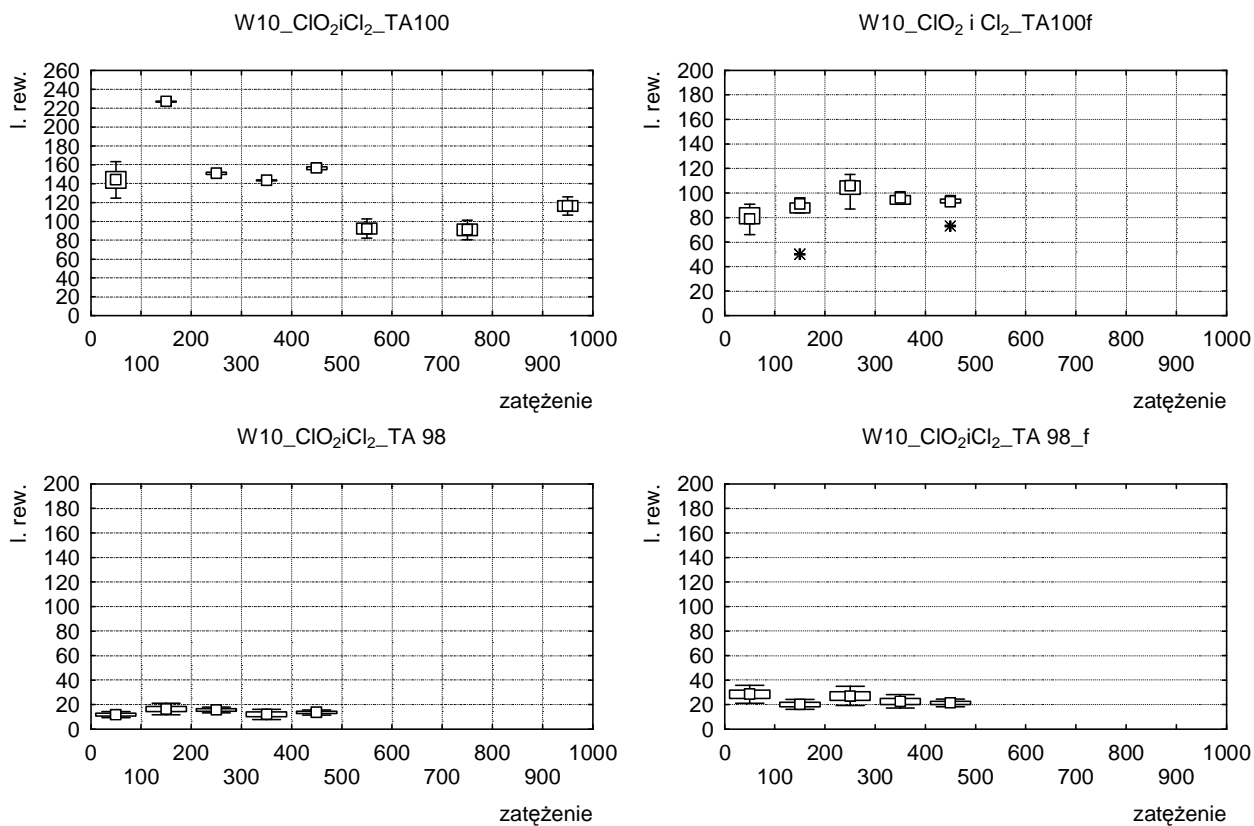
Wykres 59. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – maj



Wykres 60. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – czerwiec



Wykres 61. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – lipiec



Wykres 62. Zależność dawka-odpowiedź dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru – sierpień

Na Wykresach od 53 do 62 przedstawiono charakter krzywej zależności dawka –odpowiedź dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym dawkowaniu do wody dwutlenku chloru badanej w cyklu rocznym przy użyciu szczepów testowych *Salmonella typhimurium* TA100 i TA98 zarówno z jak i bez frakcji S9-mix.

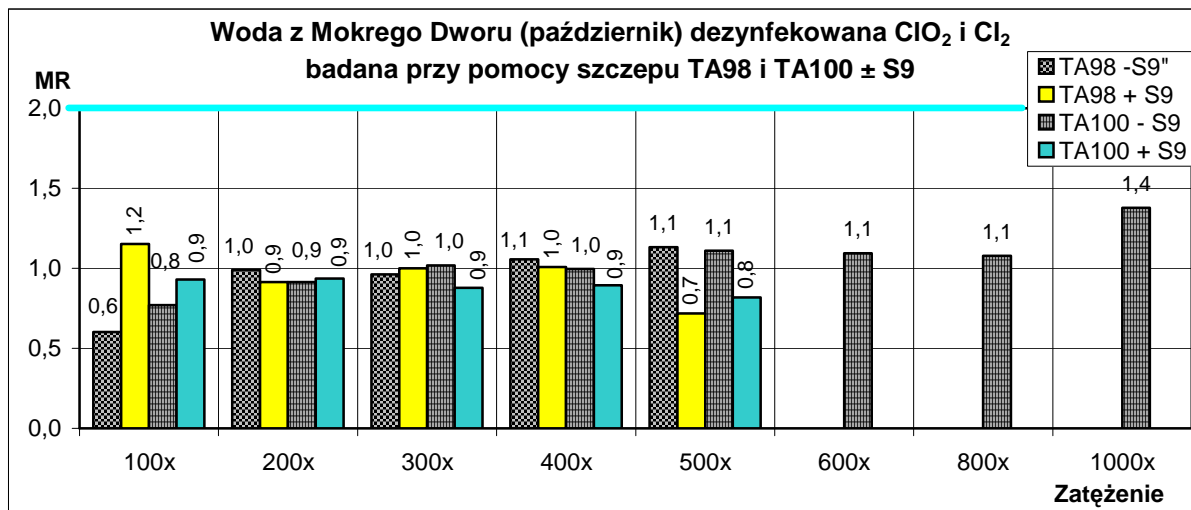
W przypadku dwóch próbek wody, czyli dla próbki pobranej w marcu (dla szczepu TA98 bez frakcji) -Wykres 57 i w sierpniu (TA100-S9-mix) – Wykres 62 krzywa zależności dawka-odpowiedź miała charakterystyczny dla testu *Salmonella* przebieg - wraz ze wzrostem zateżenia wody rosła liczba rewertantów, aż do osiągnięcia wartości maksymalnej, po której dalsze zateżanie wody powodowało spadek ilości rewertantów, czyli pojawiał się tzw. efekt toksyczny. Podobny przebieg miała również woda badana testem Ames z zastosowaniem szczepu TA100 bez frakcji pobrana w maju (Wykres 59), z tą różnicą, że osiągnięta maksymalna ilość rewertantów nie wskazywała potencjalnego efektu mutagennego (czyli nie była większa dwukrotnie od rewersji spontanicznej). Na jednym z wykresów ramka-wąsy przedstawiającym wyniki próbki wody pobranej w lipcu (Wykres 61) wraz ze wzrostem zateżania próbki rosła liczba rewertantów osiągając w zateżeniu 1 000 wartość maksymalną. Dla pozostałych próbek wody niezależnie od wzrostu zateżenia próbki nie rosła liczba rewertantów, czyli uzyskane wyniki układały się w postaci linii prostej.

Podobnie jak dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem na podstawie wykresów ramka-wąsy również dla próbek wody w tym wariantcie dezynfekcji badanej szczepem TA100 wartości średnie liczby rewertantów dla wody bez zastosowania frakcji są raz mniejsze raz większe w porównaniu do wartości średnich z zastosowaniem frakcji. Dla wody bez zastosowania frakcji zaobserwowano również dużo większą zmienność w danych niż dla wody z zastosowaniem frakcji. I również dla próbek wody badanych szczepem TA98, nie zaobserwowano zależności podobnych jak dla wody badanej szczepem TA100. Analizując wykresy ramka-wąsy dla wody rzeczywistej badanej w teście Ames szczepem TA98 porównując wyniki dla wody z zastosowaniem i bez zastosowania frakcji stwierdzono, że dla wszystkich próbek średnia dla wody z zastosowaniem frakcji jest podobna do średniej bez zastosowania frakcji.

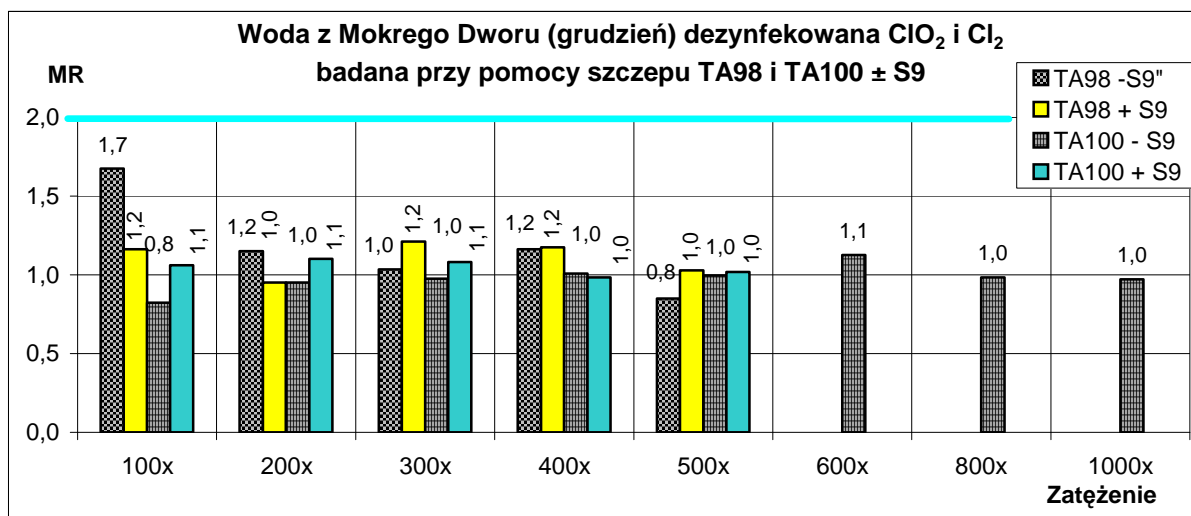
2.2.2.4. Współczynnik mutagenności (MR) wody rzeczywistej – etap IIB

Wyniki testów Ames przeprowadzonych na ekstraktach wód rzeczywistych dezynfekowanych chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru, badanych za pomocą szczepów testowych bakterii *Salmonella typhimurium* TA100 i TA98 zarówno z jak i bez aktywacji metabolicznej przedstawiono na Wykresach od 63 do 72.

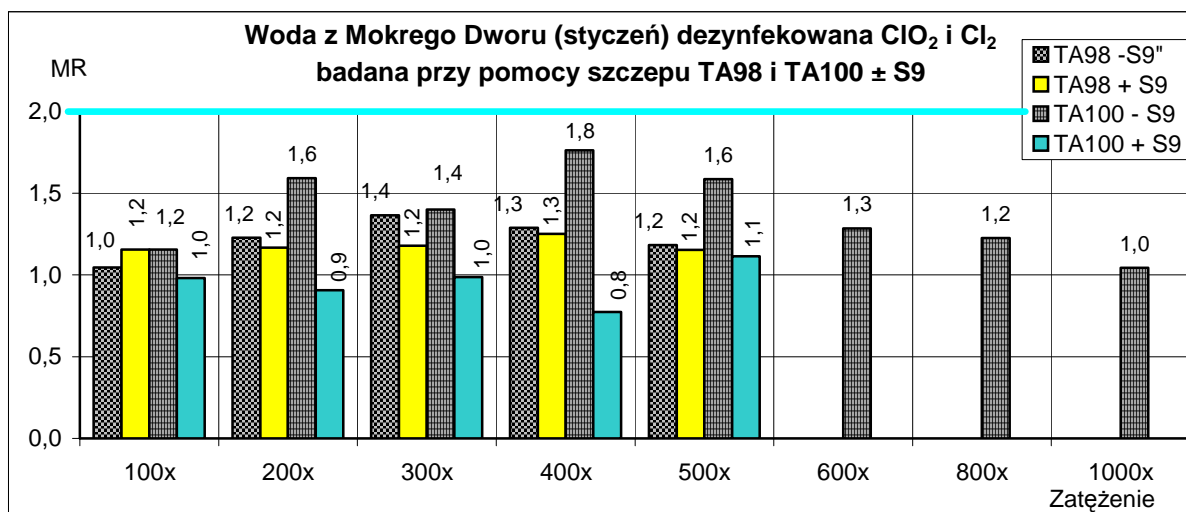
- a) Wyniki testów Ames dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru jako utleniacza przed dezynfekcją chlorem, badanej w okresie jesienno-zimowym (Wykresy 63-67)



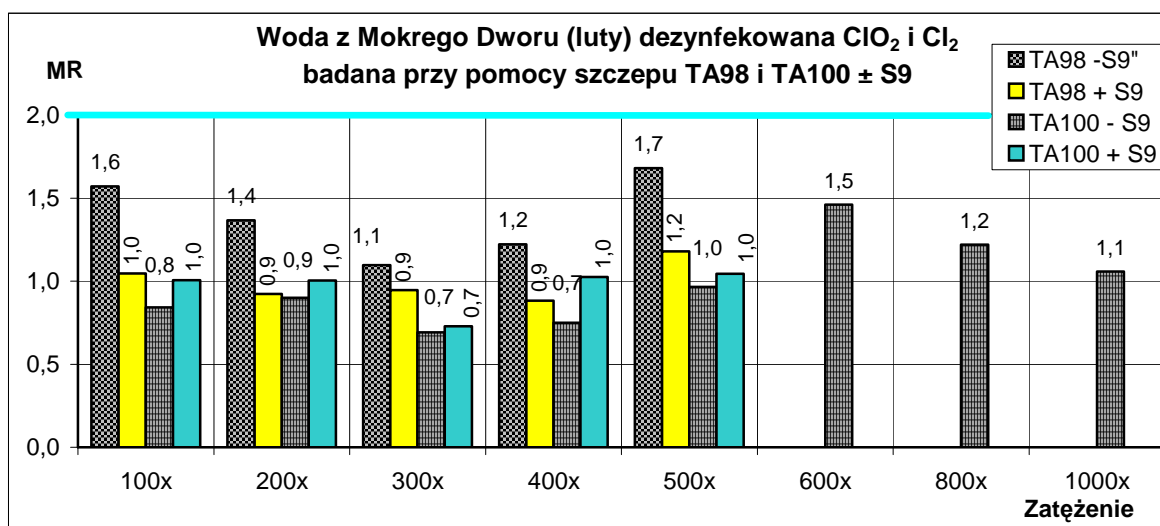
Wykres 63. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru –październik



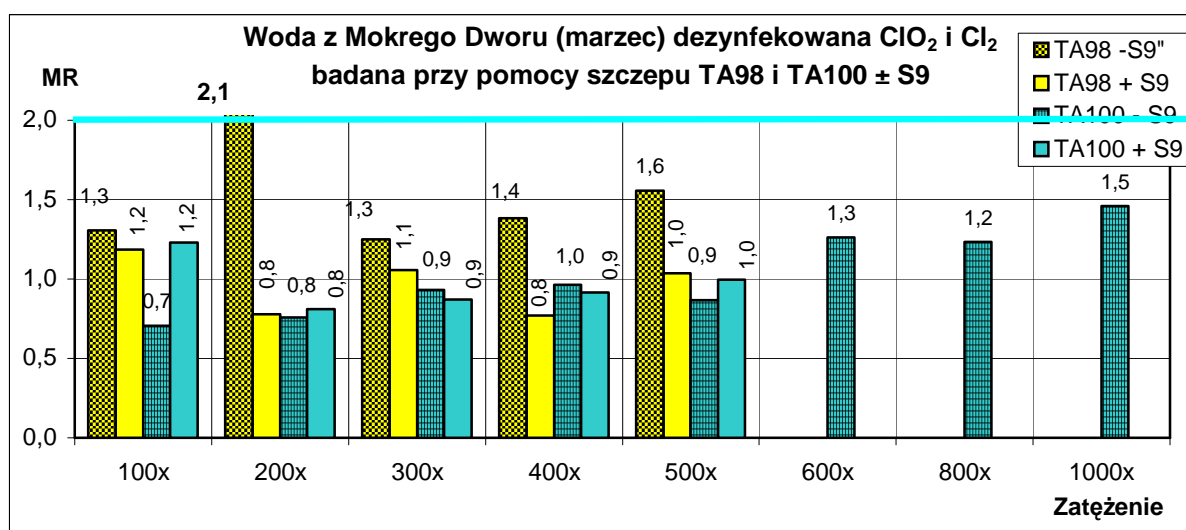
Wykres 64. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru- grudzień



Wykres 65. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru- styczeń



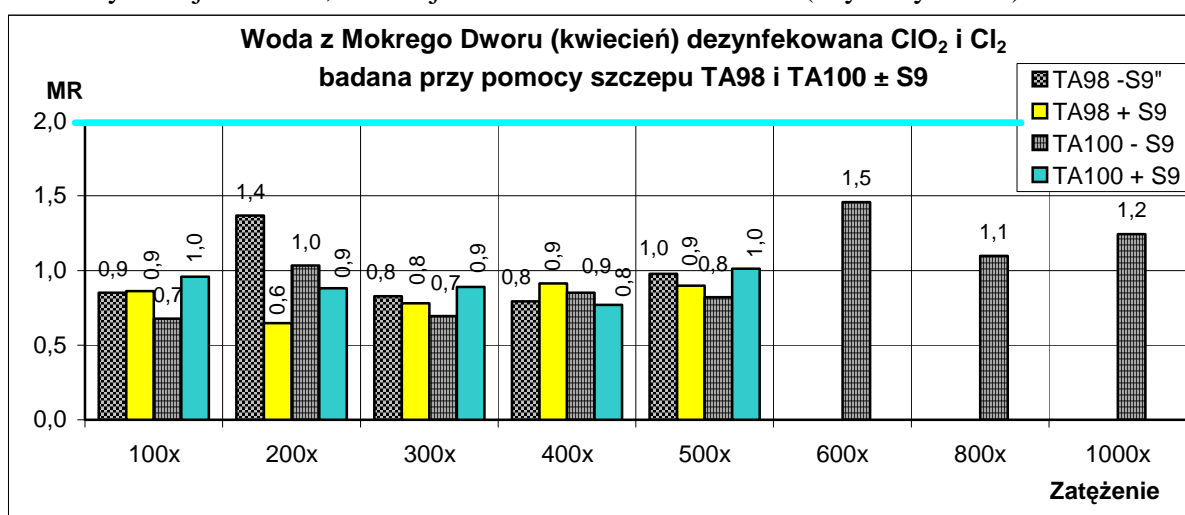
Wykres 66. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru- luty



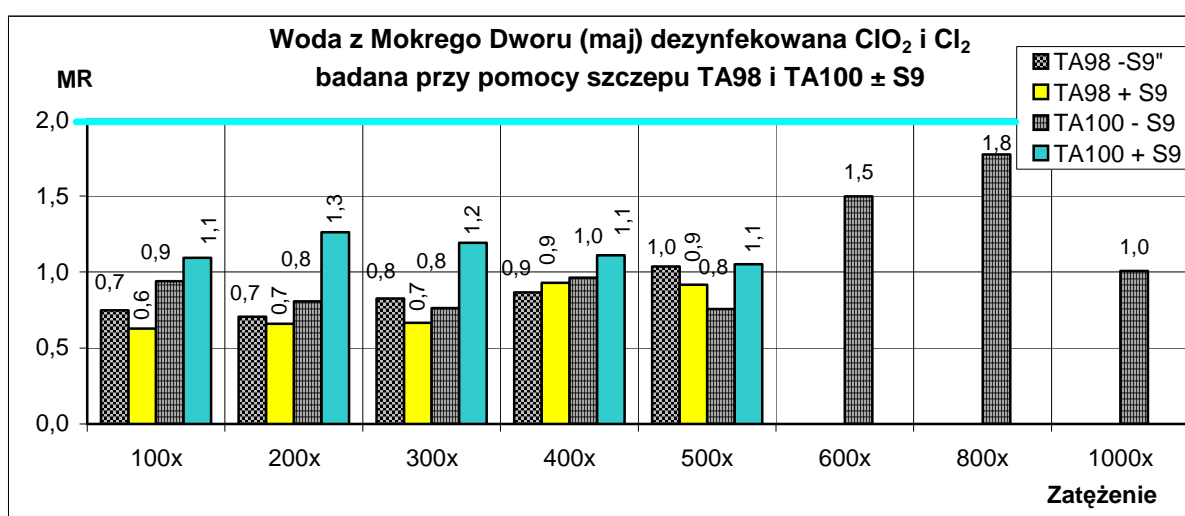
Wykres 67. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru- marzec

Wyniki testu Ames, zastosowanego bez użycia frakcji mikrosomalnej S9-mix, w okresie jesienno-zimowym w jednym przypadku, dla wody pobranej w miesiącu marcu (Wykres 67), świadczyły o potencjalnie mutagennym jej charakterze. Wartość MR w tym przypadku osiągnęła wartość 2,1 przy zateżeniu 200x, przy zastosowaniu do testu Ames szczepu *Salmonella typhimurium* TA98. W styczniu wskaźnik mutagenności MR przy zateżeniu wody 400x zbliżył się do wartości 2,0, osiągając dla szczepu TA100 użytym w teście Ames bez frakcji wartość 1,8 (przy zateżeniu 400x). Poza tym woda pobrana w tym okresie, badana przy użyciu szczepów TA 98 i TA100 zarówno z frakcją jak i bez niej, nie wykazywała potencjalnych właściwości mutagennych.

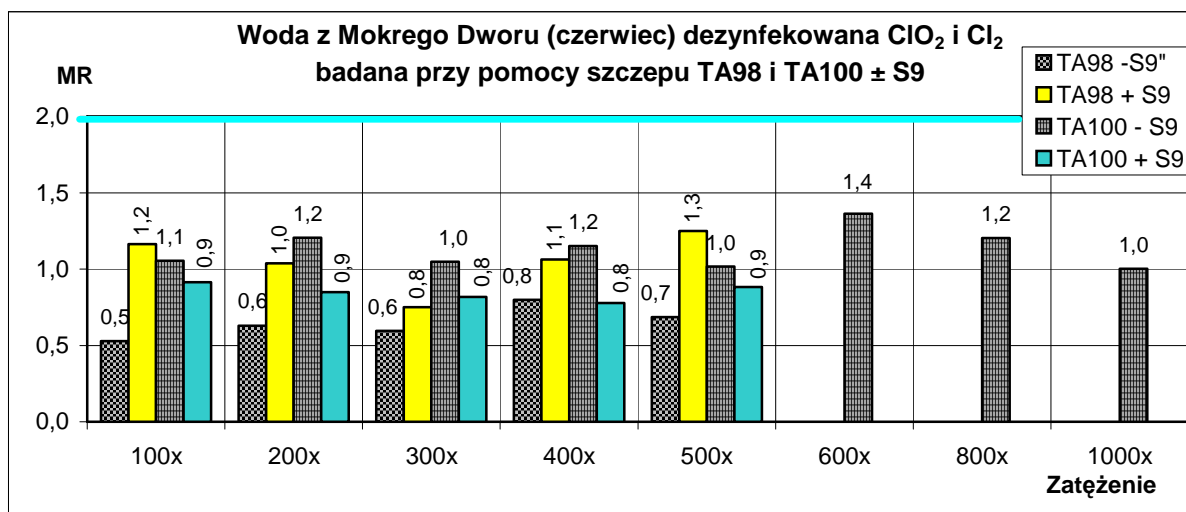
b) Wyniki testów Ames dla wody rzeczywistej po dawkowaniu dwutlenku chloru i dezynfekcji chlorem, badanej w okresie wiosenno-letnim (Wykresy 68-72)



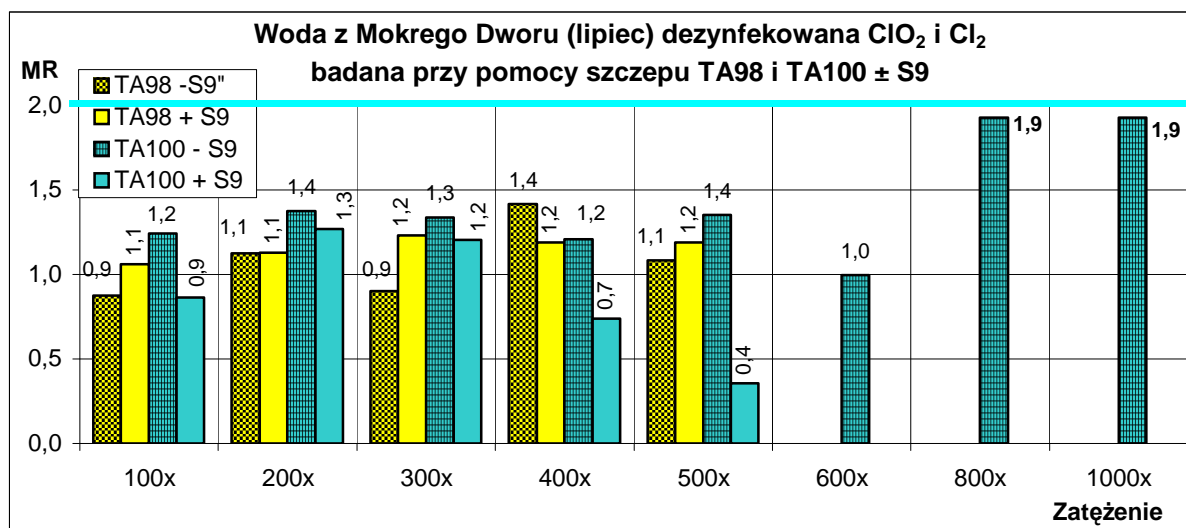
Wykres 68. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – kwiecień



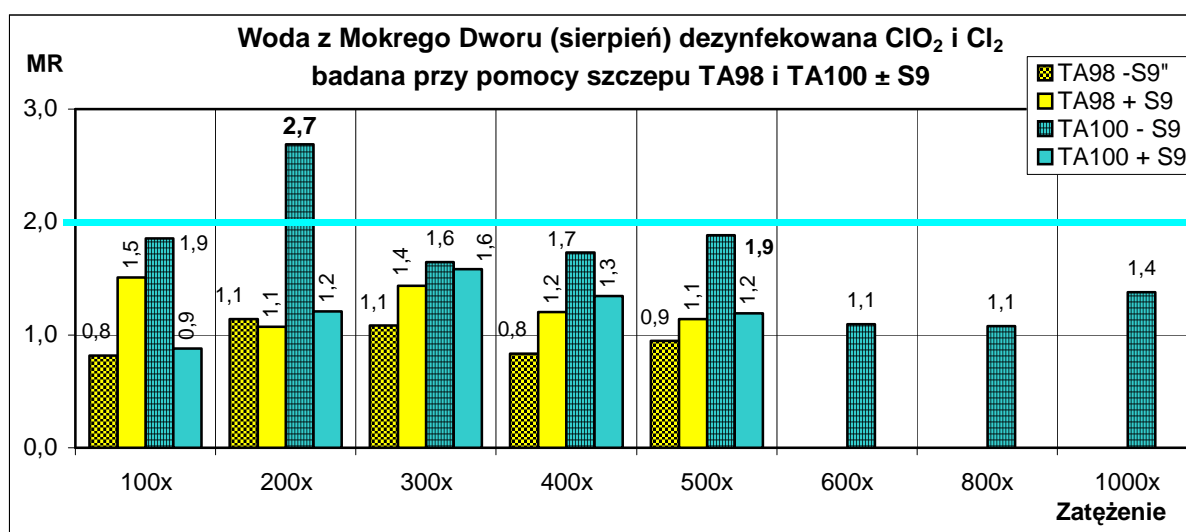
Wykres 69. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – maj



Wykres 70. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – czerwiec



Wykres 71. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – lipiec

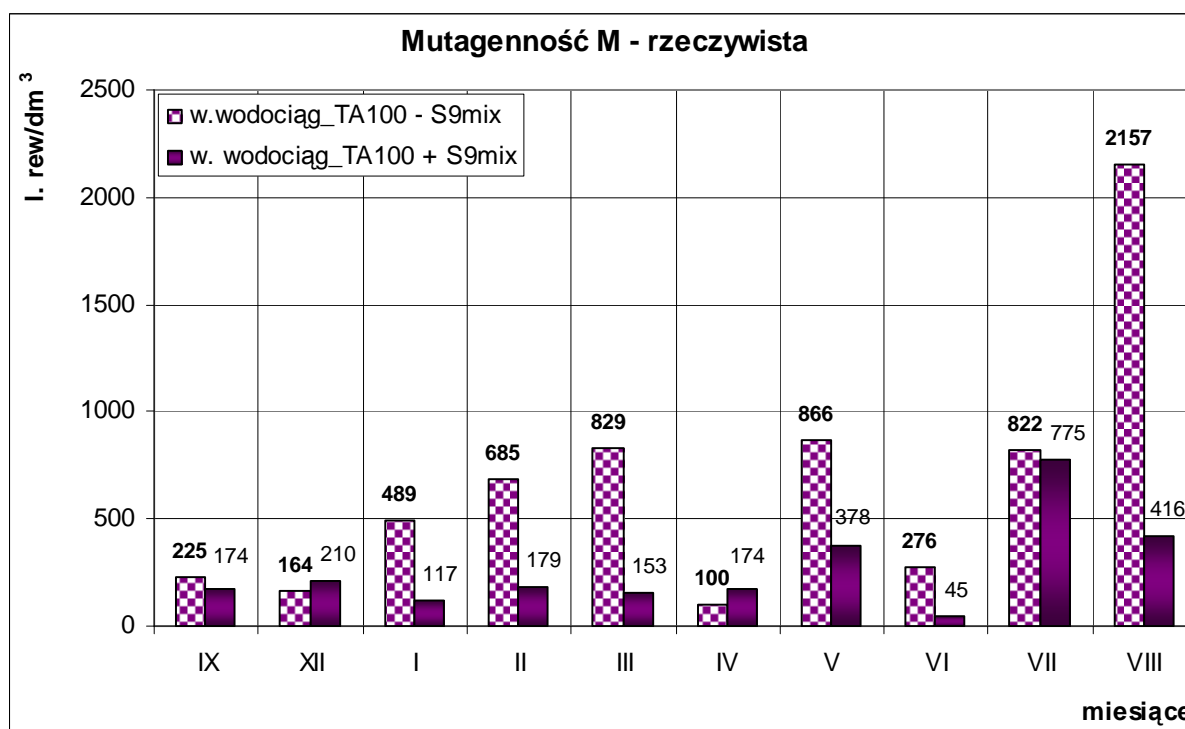


Wykres 72. MR wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru – sierpień

W okresie wiosenno-letnim również tylko dla wody pobranej w miesiącu sierpniu, (Wykres 72), uzyskano wynik dodatni testu Ames. Wskaźnik mutagenności dla tej wody osiągnął wartość 2,7 przy zateżeniu 200x w teście z zastosowaniem szczepu TA 100 bez aktywacji metabolicznej. Również dla tej wody badanej w tych samych warunkach i tym samym szczepem wskaźnik MR dwukrotnie zbliżył się do wartości 2,0, osiągając wartość 1,8 dla wody pobranej w maju (Wykres 69) zateżonej 800x i 1,9 dla wody pobranej w lipcu (Wykres 71) zateżonej 800 i 1000x. W pozostałych miesiącach nie stwierdzono występowania w badanych wodach związków o charakterze mutagennym, które miałyby istotny wpływ na podwyższenie rewersji indukowanej szczepu *S. typhimurium* TA100 użytego bez zastosowania frakcji. Dla wszystkich wód badanych w tym okresie w teście Ames szczepem TA98 z zastosowaniem i bez zastosowania frakcji mikrosomalnej jak również dla wszystkich wód badanych szczepem TA100 z zastosowaniem S9-mix nie zaobserwowano wartości wskaźnika mutagenności MR większych lub równych a nawet zbliżonych do 2,0.

2.2.2.5. Mutagenność M wody rzeczywistej – etap IIB

Ze względu na to, iż w większości przypadków dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru przed dezynfekcją chlorem tak samo jak w przypadku wody chlorowanej nie udało się wyliczyć mutagenności M na podstawie wyników uzyskanych testem Ames z użyciem szczepu testowego *Salmonella typhimurium* TA98, ponieważ współczynnik kierunkowy β_1 często osiągał wartość ujemną a przez to również wartość M osiągała wartość ujemną, w pracy zamieszczono tylko wyniki mutagenności M dla szczepu testowego TA100 zarówno z jak i bez zastosowania frakcji. Poza tym jak wynika z badań prowadzonych przez Vartiainen model do prognozowania mutagenności wody do picia opracowany został na podstawie wyników testu Ames uzyskanych z zastosowaniem szczepu *S. typhimurium* TA100 (bez zastosowania frakcji mikrosomalnej S9-mix) [21].



Wykres 73. Obserwowana mutagenność M chlorowanej wody rzeczywistej po wcześniejszym wprowadzeniu dwutlenku chloru

Uzyskana dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru badanej w cyklu rocznym mutagenność M mierzona w teście Amesza szczepem TA100 bez zastosowania frakcji mikrosomalnej (Wykres 73) osiągnęła w okresie jesienno-zimowym wartość najniższą 164 rew/dm³ dla wody pobranej w grudniu i wzrastała osiągając wartość maksymalną 829 rew/dm³ w lutym. W okresie wiosenno-letnim najniższą wartość mutagenności M osiągnięto dla wody badanej w kwietniu – 100 a najwyższą w sierpniu – 2157 rew/dm³. I wartość ta była najwyższą wartością mutagenności M uzyskaną w rocznym cyklu badań. Mutagenność M uzyskana dla tych samych wód badanych testem Amesza z zastosowaniem frakcji osiągnęła w styczniu najniższą wartość dla okresu jesienno-zimowego -117 rew./dm³ a najwyższą 210 rew./dm³ w grudniu, natomiast w okresie wiosenno-letnim mieściła się w granicy od 45 rew./dm³ w czerwcu do 416 rew./dm³ w sierpniu. Mutagenność M badana z zastosowaniem frakcji w każdym przypadku (wyjątek próbka wody z grudnia i kwietnia) była znacznie niższa od mutagenności uzyskanej w testach bez frakcji. Analizując wyniki dla mutagenności M uzyskane szczepem TA100 dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru (podobnie jak w przypadku tych samych próbek wód dezynfekowanych chlorem) nie zauważono jakiegokolwiek regularności i zależności jaką zauważono w wodzie modelowej dezynfekowanej w ten sam sposób

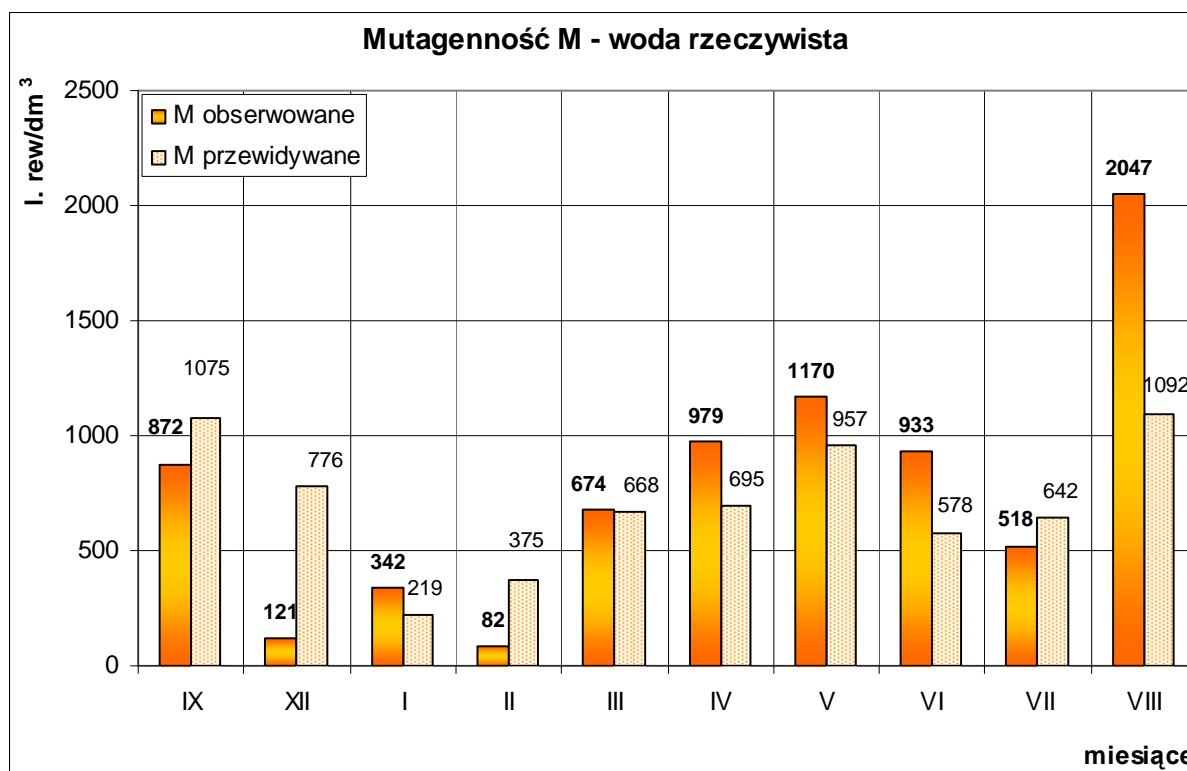
w porównaniu z wynikami chemicznymi wody takimi jak: zawartość OWO, stężenie azotu amonowego, dawka chloru czy też stężenia chloropochodnych (AOX i HAA).

2.3. Próba weryfikacji modelu fińskiego na podstawie badań na wodzie rzeczywistej

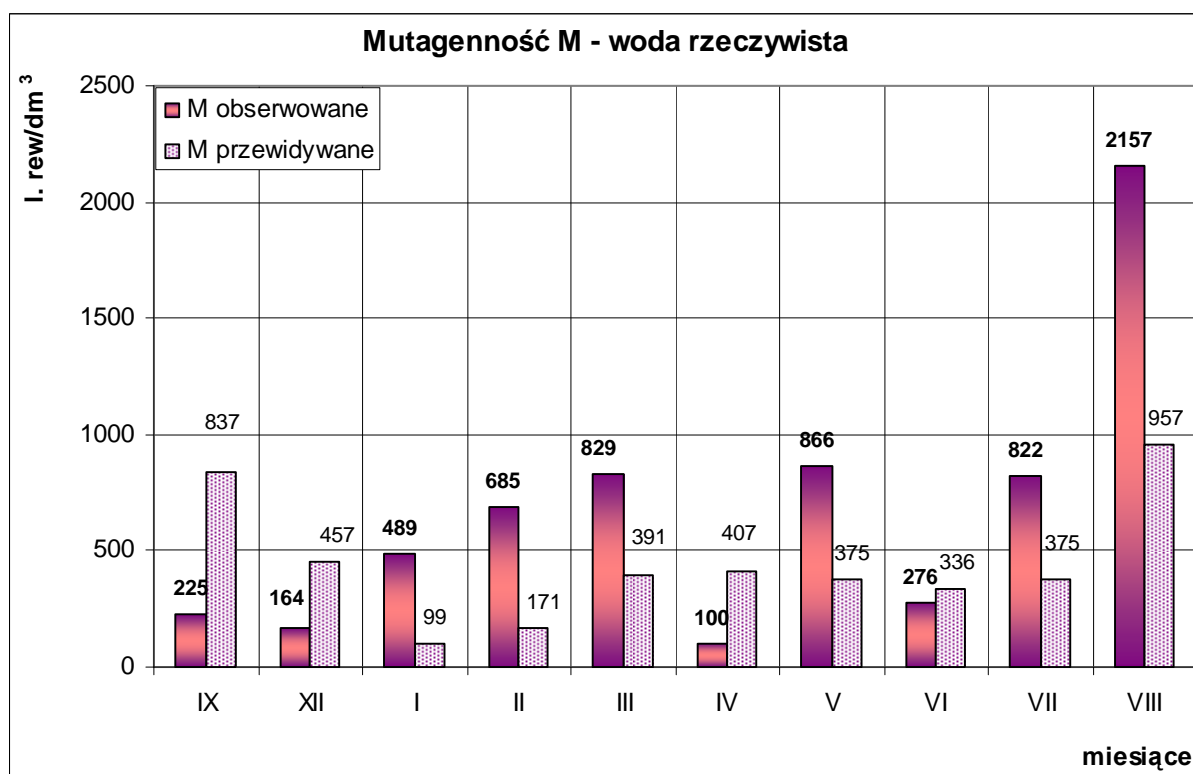
W celu weryfikacji modelu Vartiainena do prognozowania potencjalnej mutagenności wody do picia za pomocą tego modelu obliczono mutagenność M wody powierzchniowej uzdatnianej w ZOW „Mokry Dwór” badanej w cyklu rocznym w dwóch wariantach dezynfekcji i porównano z mutagennością M obserwowaną w teście Amesa wykonanym przy użyciu szczepu *S. typhimurium* TA100 bez aktywacji metabolicznej.

2.3.1. Zastosowanie fińskiego modelu do obliczenia mutagenności wody rzeczywistej

Wyniki mutagenności M prognozowanej modelem i przewidywanej testem Amesa zamieszczono na Wykresach 74 i 75.



Wykres 74. Mutagenność M wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem



Wykres 75. Mutagenność M chlorowanej wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru

Na przedstawionych powyżej wykresach wyraźnie widać, iż uzyskane testem Ames wyniki odbiegają od uzyskanych modelem do prognozowania potencjalnej mutagenności wody do picia. W przypadku wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem (Wykres 74) mutagenność M obserwowana w teście Ames dla wody ze stycznia, marca i lipca była zbliżona do mutagenności M przewidywanej modelem, natomiast w przypadku wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po dawkowaniu dwutlenku chloru (Wykres 75) mutagenność M obserwowana w teście Ames tylko w czerwcu była zbliżona do mutagenności M przewidywanej modelem Vartiainena.

2.4. Korelacja wyników uzyskanych dla wody rzeczywistej

Przed przystąpieniem do wykazania zależności lub jej braku pomiędzy podstawowymi parametrami wody rzeczywistej takimi jak stężenie OWO, azotu amonowego i organicznego, dawka chloru a ubocznymi produktami procesu dezynfekacji chlorem (również po zastosowaniu dwutlenku chloru) takimi jak AOX czy HAA jak również mutagennością M obserwowaną w teście Ames i przewidywaną modelem Vartiainena przeprowadzono weryfikację założenia o rozkładzie normalnym danych za pomocą testów normalności:

Shapiro-Wilka, Lillieforsa oraz Kołmogorowa-Smirnowa. Wyniki przedstawiono w Tabelach 36 i 37.

W celu oceny współzależności zastosowano korelację Pearsona dla danych o rozkładzie normalnym a dla danych nie wykazujących rozkładu normalnego badano istotność korelacji porządku rang Spearmana. W Tabelach 38 i 39 przedstawiono wyniki korelacji dla uzyskanych w pracy wyników. Na czerwono zaznaczone zostały współczynniki korelacji istotne statystycznie.

W przypadku wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem (Tabela 36) brak normalności wykazywały dane dotyczące stężenia azotu amonowego i organicznego oraz pH i dawki chloru. Pozostałe wyniki charakteryzowały się rozkładem normalnym. Dla wody rzeczywistej po dawkowaniu dwutlenku chloru przed chlorowaniem (Tabela 37) mniej niż połowa wyników miała rozkład normalny, natomiast znaczna ich część wykazywała brak normalności.

Tabela 36. Statystyka testowa wyników dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem

Oznaczenia	N	Testy normalności – wartości p			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnowa	Lillieforsa	Shapiro-Wilka	
OWO	10	p > 0,20	p < 0,15	0,328576	normalny
utlenialność	10	p > 0,20	p > 0,20	0,801968	normalny
absorbancja	10	p > 0,20	p < 0,10	0,147439	normalny
barwa	10	p > 0,20	p > 0,20	0,288591	normalny
mętność	10	p > 0,20	p > 0,20	0,595503	normalny
przewodnictwo	10	p > 0,20	p > 0,20	0,461452	normalny
N-NH₄⁺	10	p < 0,15	p < 0,01	0,006290	brak normalności
N-org	10	p < 0,15	p < 0,01	0,001178	brak normalności
pH	10	p > 0,20	p < 0,01	0,026074	brak normalności
Cl₂	10	p > 0,20	p < 0,01	0,041190	brak normalności
AOX	10	p > 0,20	p > 0,20	0,378176	normalny
AOX_ekst.	10	p > 0,20	p > 0,20	0,594994	normalny
HAA	10	p > 0,20	p > 0,20	0,285388	normalny
HAA_ekstr	10	p > 0,20	p < 0,20	0,275546	normalny
MCIAA	10	p > 0,20	p > 0,20	0,725128	normalny
MCIAA_ekstr.	10	p > 0,20	p > 0,20	0,591034	normalny
DCIAA	10	p > 0,20	p < 0,05	0,017238	brak normalności
DCIAA_ekst	10	p > 0,20	p > 0,20	0,221355	normalny
TCIAA	10	p > 0,20	p > 0,20	0,218267	normalny
TCIAA_ekstr.	10	p > 0,20	p < 0,10	0,117443	normalny
M bez frakcji_ obserw.	10	p > 0,20	p > 0,20	0,360868	normalny
M z frakcją_ obserw.	10	p > 0,20	p < 0,01	0,006305	brak normalności
M_przewidyw. - model	10	p > 0,20	p > 0,20	0,718577	normalny

Tabela 37. Statystyka testowa wyników dla wody rzeczywistej po zastosowaniu jako utleniacza dwutlenku chloru

Oznaczenia	N	Testy normalności – wartości p			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnowa	Lillieforsa	Shapiro-Wilka	
OWO	10	p > 0,20	p < 0,15	0,328576	normalny
utlenialność	10	p > 0,20	p > 0,20	0,801968	normalny
absorbancja	10	p > 0,20	p < 0,10	0,147439	normalny
barwa	10	p > 0,20	p > 0,20	0,288591	normalny
mętność	10	p > 0,20	p > 0,20	0,595503	normalny
przewodnictwo	10	p > 0,20	p > 0,20	0,461452	normalny
N-NH₄⁺	10	p < 0,15	p < 0,01	0,006290	brak normalności
N-org	10	p < 0,15	p < 0,01	0,001178	brak normalności
pH	10	p > 0,20	p < 0,01	0,026074	brak normalności
Cl₂	10	p < 0,10	p < 0,01	0,000893	brak normalności
AOX	10	p > 0,20	p > 0,20	0,905590	normalny
AOX_ekst.	10	p > 0,20	p > 0,20	0,964145	normalny
HAA	10	p > 0,20	p < 0,10	0,175289	normalny
HAA_ekstr	10	p > 0,20	p < 0,01	0,003829	brak normalności
MCIAA	10	p > 0,20	p > 0,20	0,619231	normalny
MCIAA_ekstr.	10	p > 0,20	p < 0,10	0,042539	brak normalności
DCIAA	10	p < 0,15	p < 0,01	0,010265	brak normalności
DCIAA_ekst	10	p > 0,20	p < 0,05	0,073753	Normalny??
TCIAA	10	p < 0,20	p < 0,01	0,001552	brak normalności
TCIAA_ekstr.	10	p < 0,20	p < 0,01	0,000229	brak normalności
M bez frakcji_obserw.	10	p > 0,20	p < 0,05	0,014337	brak normalności
M z frakcją_obserw.	10	p > 0,20	p < 0,01	0,015133	brak normalności
M_przewidyw. - model	10	p > 0,20	p < 0,05	0,086421	brak normalności

Dla próbek wody niezależnie od sposobu dezynfekcji (Tabela 38 i 39) większość uzyskanych wyników wykazywała niską korelację zarówno dodatnią jak i ujemną, nieistotną statystycznie. W przypadku mutagenności M dla wody po zastosowaniu dwutlenku chloru obserwowanej w teście Amesa zarówno z jak i bez zastosowania frakcji oraz przewidywanej modelem (Tabela 39) miała miejsce tylko w jednym przypadku korelacja dodatnia, istotna statystycznie – pomiędzy wodą badaną testem Amesa bez zastosowania frakcji a stężeniem azotu organicznego. Dla wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem (Tabela 38) dodatnia, dość wysoka korelacja, istotna statystycznie miała miejsce dla mutagenności M obserwowanej w teście *Salmonella* bez frakcji z chlorem (0,83) i mutagennością M przewidywaną modelem (0,69) oraz dla mutagenności M przewidywanej modelem i dawką chloru (0,84). Dla wody dezynfekowanej chlorem (Tabela 38) istotną statystycznie wysoką i dość wysoką korelację uzyskano pomiędzy: OWO a utlenialnością (0,63), OWO a azotem amonowym (0,82), oraz w większości przypadków pomiędzy badanymi ubocznymi produktami dezynfekcji wody AOX i sumą jak również i poszczególnymi kwasami chlorooctowymi.

Tabela 38. Korelacja wyników dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem

	OWO	Utlenial.	Absorb	Barwa	N-NH ₄ ⁺	N-org	Cl ₂	AOX	AOX_ekst.	HAA	HAA_ekstr.	MCAA	MCAA_ekstr.	DCAA	DCAA_ekst.	TCAA	TCAA_ekstr.	M bez frakcji_obserw.	M z frakcją_obserw.	M przewidyw-model
OWO	1,00	0,63	0,47	0,41	0,82	0,05	0,22	-0,16	-0,32	-0,30	-0,22	-0,23	-0,29	-0,33	-0,32	-0,14	0,09	0,38	0,06	0,00
utlenial	0,63	1,00	-0,03	0,31	0,59	0,49	0,27	-0,13	-0,26	-0,27	-0,17	-0,23	-0,36	-0,20	-0,28	-0,09	0,17	0,41	-0,24	0,18
absorb	0,47	-0,03	1,00	0,02	0,45	-0,31	0,33	0,03	-0,10	-0,01	0,01	0,03	0,08	-0,33	-0,15	0,10	0,08	0,45	0,39	0,32
barwa	0,41	0,31	0,02	1,00	0,17	-0,05	0,21	0,59	0,61	0,49	0,53	0,37	0,23	0,48	0,45	0,53	0,60	0,00	0,09	0,28
N-NH ₄ ⁺	0,82	0,59	0,45	0,17	1,00	0,38	-0,20	-0,16	-0,34	-0,29	-0,31	-0,24	-0,18	-0,39	-0,48	-0,17	0,10	0,04	0,16	-0,49
N-org	0,05	0,49	-0,31	-0,05	0,38	1,00	0,03	-0,16	-0,23	-0,28	-0,31	-0,14	-0,22	-0,20	-0,25	-0,33	-0,33	-0,12	0,02	-0,24
Cl ₂	0,22	0,27	0,33	0,21	-0,20	0,03	1,00	0,38	0,09	-0,02	-0,01	0,27	0,16	0,05	-0,08	-0,07	0,02	0,83	-0,15	0,84
AOX	-0,16	-0,13	0,03	0,59	-0,16	-0,16	0,38	1,00	0,94	0,87	0,83	0,84	0,75	0,85	0,75	0,75	0,76	0,22	0,25	0,46
AOX_ekst.	-0,32	-0,26	-0,10	0,61	-0,34	-0,23	0,09	0,94	1,00	0,93	0,90	0,81	0,75	0,92	0,81	0,84	0,75	-0,08	0,30	0,34
HAA	-0,30	-0,27	-0,01	0,49	-0,29	-0,28	-0,02	0,87	0,93	1,00	0,98	0,83	0,82	0,90	0,90	0,92	0,86	-0,04	0,42	0,42
HAA_ekstr	-0,22	-0,17	0,01	0,53	-0,31	-0,31	-0,01	0,83	0,90	0,98	1,00	0,73	0,71	0,95	0,93	0,95	0,92	-0,03	0,27	0,45
MCAA	-0,23	-0,23	0,03	0,37	-0,24	-0,14	0,27	0,84	0,81	0,83	0,73	1,00	0,97	0,67	0,59	0,63	0,59	0,17	0,02	0,36
MCAA_ekstr.	-0,29	-0,36	0,08	0,23	-0,18	-0,22	0,16	0,75	0,75	0,82	0,71	0,97	1,00	0,61	0,60	0,61	0,54	0,09	0,08	0,29
DCAA	-0,33	-0,20	-0,33	0,48	-0,39	-0,20	0,05	0,85	0,92	0,90	0,95	0,67	0,61	1,00	0,95	0,81	0,77	-0,25	0,18	0,41
DCAA_ekst	-0,32	-0,28	-0,15	0,45	-0,48	-0,25	-0,08	0,75	0,81	0,90	0,93	0,59	0,60	0,95	1,00	0,80	0,81	-0,11	0,27	0,41
TCAA	-0,14	-0,09	0,10	0,53	-0,17	-0,33	-0,07	0,75	0,84	0,92	0,95	0,63	0,61	0,81	0,80	1,00	0,91	-0,09	0,33	0,36
TCAA_ekstr.	0,09	0,17	0,08	0,60	0,10	-0,33	0,02	0,76	0,75	0,86	0,92	0,59	0,54	0,77	0,81	0,91	1,00	0,18	0,14	0,50
M bez frakcji_obser	0,38	0,41	0,45	0,00	0,04	-0,12	0,83	0,22	-0,08	-0,04	-0,03	0,17	0,09	-0,25	-0,11	-0,09	0,18	1,00	-0,25	0,69
M z frakcją_obser	0,06	-0,24	0,39	0,09	0,16	0,02	-0,15	0,25	0,30	0,42	0,27	0,02	0,08	0,18	0,27	0,33	0,14	-0,25	1,00	-0,02
M przew-model	0,00	0,18	0,32	0,28	-0,49	-0,24	0,84	0,46	0,34	0,42	0,45	0,36	0,29	0,41	0,41	0,36	0,50	0,69	-0,02	1,00

Tabela 39. Korelacja wyników dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym dawkowaniu dwutlenku chloru

	OWO	Utlenial	Absorb	Barwa	N-NH ₄ ⁺	N-org	Cl ₂	AOX	AOX_ekst.	HAA	HAA_ekstr.	MCAA	MCAA_ekstr.	DCAA	DCAA_ekst.	TCAA	TCAA_ekstr.	M bez frakcji_observ.	M z frakcją_observ.	M przewidyw-model
OWO	1,00	0,63	0,47	0,41	0,41	0,48	-0,13	0,13	-0,25	-0,22	-0,32	-0,31	-0,18	-0,44	-0,10	-0,31	-0,32	-0,29	0,07	-0,12
utleniaj	0,63	1,00	-0,03	0,31	0,31	0,16	0,25	0,30	-0,43	-0,41	-0,42	-0,38	-0,35	-0,70	-0,08	-0,28	-0,39	-0,32	0,48	0,28
absorb	0,47	-0,03	1,00	0,02	0,02	0,21	-0,76	0,22	0,21	0,33	0,23	0,14	0,44	0,29	0,11	0,08	0,07	0,10	-0,02	-0,44
barwa	0,41	0,31	0,02	1,00	1,00	-0,02	0,22	0,23	0,53	0,52	0,45	0,47	0,09	0,08	0,61	0,57	0,41	0,36	0,08	0,35
N-NH ₄ ⁺	0,48	0,16	0,21	-0,02	1,00	0,38	-0,32	-0,11	-0,32	-0,44	-0,46	-0,16	-0,57	-0,06	-0,32	-0,66	-0,61	0,39	-0,19	-0,66
N-org	-0,13	0,25	-0,76	0,22	0,38	1,00	-0,12	-0,23	-0,31	-0,41	-0,38	-0,48	-0,52	-0,28	-0,20	-0,72	-0,85	0,73	0,59	-0,36
Cl ₂	0,13	0,30	0,22	0,23	-0,32	-0,12	1,00	0,29	0,40	0,24	0,56	0,58	0,51	0,28	0,15	0,45	0,51	0,27	0,41	0,81
AOX	-0,25	-0,43	0,21	0,53	-0,11	-0,23	0,29	1,00	0,95	0,88	0,79	0,70	0,67	0,67	0,87	0,67	0,62	0,08	0,06	0,40
AOX_ekst.	-0,22	-0,41	0,33	0,52	-0,32	-0,31	0,40	0,95	1,00	0,93	0,86	0,70	0,74	0,72	0,87	0,77	0,72	0,04	0,06	0,48
HAA	-0,32	-0,42	0,23	0,45	-0,44	-0,41	0,24	0,88	0,93	1,00	0,97	0,59	0,77	0,85	0,94	0,91	0,87	-0,15	-0,13	0,44
HAA_ekstr.	-0,31	-0,38	0,14	0,47	-0,46	-0,38	0,56	0,79	0,86	0,97	1,00	0,38	0,79	0,58	0,95	0,81	0,63	-0,02	0,20	0,67
MCAA	-0,18	-0,35	0,44	0,09	-0,16	-0,48	0,58	0,70	0,70	0,59	0,38	1,00	0,72	0,16	0,39	0,25	0,21	0,41	-0,17	0,59
MCAA_ekstr.	-0,44	-0,70	0,29	0,08	-0,57	-0,52	0,51	0,67	0,74	0,77	0,79	0,72	1,00	0,18	0,55	0,81	0,62	-0,03	-0,08	0,56
DCAA	-0,10	-0,08	0,11	0,61	-0,06	-0,28	0,28	0,67	0,72	0,85	0,58	0,16	0,18	1,00	0,92	0,31	0,48	-0,18	0,36	0,46
DCAA_ekst.	-0,31	-0,28	0,08	0,57	-0,32	-0,20	0,15	0,87	0,87	0,94	0,95	0,39	0,55	0,92	1,00	0,88	0,85	-0,12	0,06	0,36
TCAA	-0,32	-0,39	0,07	0,41	-0,66	-0,72	0,45	0,67	0,77	0,91	0,81	0,25	0,81	0,31	0,88	1,00	0,86	-0,48	-0,15	0,60
TCAA_ekstr.	-0,29	-0,32	0,10	0,36	-0,61	-0,85	0,51	0,62	0,72	0,87	0,63	0,21	0,62	0,48	0,85	0,86	1,00	-0,62	-0,16	0,71
M bez frakcji_observ.	0,07	0,48	-0,02	0,08	0,39	0,73	0,27	0,08	0,04	-0,15	-0,01	0,41	-0,03	-0,18	-0,12	-0,48	-0,62	1,00	0,44	-0,04
M z frakcją_observ.	-0,12	0,28	-0,44	0,35	-0,19	0,59	0,41	0,06	0,06	-0,13	0,20	-0,17	-0,08	0,38	0,06	-0,15	-0,16	0,44	1,00	0,40
M przewidyw-model	-0,26	-0,11	-0,09	0,18	-0,66	-0,36	0,81	0,54	0,63	0,61	0,67	0,64	0,57	0,46	0,52	0,60	0,71	-0,04	0,40	1,00

W przypadku wody, do której przed chlorowaniem wprowadzono dwutlenek chloru (Tabela 39) również zaobserwowano podobne korelacje pomiędzy OWO a utlenialnością oraz AOX i HAA, jak również pomiędzy mutagennością M a dawką chloru (0,81), czy też kwasami chlorooctowymi HAA w ekstrakcie (0,67), oraz z kwasem trichlorooctowym TCIAA również w ekstrakcie (0,71). Dodatkowo ujemną korelację, istotną statystycznie zaobserwowano pomiędzy mutagennością M przewidywaną modelem a azotem amonowym (-0,66) oraz pomiędzy np. absorbancją a azotem organicznym.

2.5. Propozycja wstępnego modelu prognozowania mutagenności wody do picia na podstawie wyników z wody rzeczywistej

W przypadku wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem wykazano w miarę wysoką korelację (Tabela 38), istotną statystycznie pomiędzy mutagennością M obserwowaną w teście Ames bez frakcji a przewidywaną modelem (0,69) i dość wysoką pomiędzy mutagennością M obserwowaną w teście Ames bez frakcji a dawką chloru (0,84). Natomiast dla wody wodociągowej, do której dawkowano dwutlenek chloru (Tabela 39) praktycznie nie wykazano korelacji pomiędzy mutagennością M obserwowaną w teście Ames bez frakcji a przewidywaną modelem (-0,04), jedynie dość wysoką i istotnie statystyczną (0,73) dla azotu organicznego. Na podstawie uzyskanych wyników badań, jak również wyników korelacji spróbowano sprawdzić czy model regresji liniowej dla mutagenności M wody rzeczywistej obserwowanej w teście Ames oparty o zmienną niezależną jaką jest dawka chloru dla wody dezynfekowanej chlorem i azot organiczny dla wody dezynfekowanej chlorem po dawkoawaniu dwutlenku chloru może być zastosowany do przewidywania mutagenności M wody do picia.

2.5.1. Dopasowanie modelu regresji liniowej do danych z wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem

Poniżej przedstawiono wyniki dopasowywania modelu regresji wielorakiej dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem:

- Błąd standardowy estymacji = 319,44
- Wyraz wolny (β_0) = -1925
- Współczynnik kierunkowy (β_1) = 1336
- $R^2 = 0,73$

- Skorygowany $R^2 = 0,70$

Uzyskany model regresji wielorakiej miał następującą postać:

$$f = -1925 + 1336 * Cl_2 \text{ l. rew./dm}^3$$

Na podstawie uzyskanego wyniku widać, iż współczynniki determinacji R^2 , oraz R^2 – skorygowany były dość wysokie i nieco różne co do wartości, natomiast współczynnik kierunkowy i wyraz wolny były istotne statystycznie.

2.5.2. Dopasowanie modelu regresji wielorakiej do danych z wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru

Wyniki dopasowywania modelu regresji wielorakiej dla wody chlorowanej wody rzeczywistej po dawkowaniu dwutlenku chloru przedstawiono poniżej:

- Błąd standardowy estymacji: 618,57

- Wyraz wolny (B_0) = 36,96

- Współczynnik regresji = 1256

- $R^2 = 0,06$

- Skorygowany $R^2 = -0,05$

Uzyskany model regresji wielorakiej miał następującą postać:

$$f = 36,96 + 1256 * N\text{-org} \text{ l. rew./dm}^3$$

Na podstawie uzyskanych wyników zauważono, iż współczynniki determinacji R^2 , oraz R^2 – skorygowany były bardzo niskie i różne co do wartości, jak również współczynnik regresji i wyraz wolny nie były istotne statystycznie, dlatego też model nie mógł być stosowany do przewidywania potencjalnej mutagenności wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem po wstępnym zastosowaniu dwutlenku chloru jako utleniacza.

2.6. Weryfikacja wstępnych modeli regresji wielorakiej do prognozowania potencjalnej mutagenności wody do picia

W celu weryfikacji wstępnych modeli uzyskanych na podstawie wyników badań prowadzonych zarówno na wodzie modelowej jak również i rzeczywistej mutagenność M przewidywaną tymi modelami porównano z mutagennością M przewidywaną modelem Vartiainenena i mutagennością M dla wody rzeczywistej obserwowaną w teście Ames wykonanym przy użyciu szczepu *S. typhimurium* TA100 bez aktywacji metabolicznej.

Przed przystąpieniem do wykazania zależności lub jej braku pomiędzy uzyskanymi wynikami mutagenności M przeprowadzono weryfikację założenia o rozkładzie normalnym tych danych za pomocą testów normalności: Shapiro-Wilka, Lillieforsa oraz Kołmogorowa-Smirnowa. Wyniki przedstawiono w Tabelach 40 i 41.

W celu wykazania współzależności lub jej braku pomiędzy mutagennością M wody rzeczywistej obserwowaną w teście Ames a przewidywaną modelami zastosowano korelację Pearsona dla danych o rozkładzie normalnym a dla danych nie wykazujących rozkładu normalnego badano istotność korelacji porządku rang Spearmana. Wyniki korelacji przedstawiono w Tabelach 42 i 43. Na czerwono zaznaczone zostały współczynniki korelacji istotne statystycznie.

Badaniom statystycznym poddano mutagenność M

obliczoną przy użyciu:

1) modelu uzyskanego na podstawie wyników z wody modelowej dezynfekowanej chlorem badanej testem Ames przy użyciu szczepu TA100 bez frakcji S9-mix

$$M_{f_w.model_Cl_2} = -932,3 + 368,1 * OWO + 1618 * N-NH_4^+ \quad 1. \text{ rew./dm}^3$$

2) modelu uzyskanego na podstawie wyników z wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem badanej testem Ames przy użyciu szczepu TA100 bez frakcji S9-mix

$$M_{f_w.wodoc_Cl_2} = -1925 + 1336 * Cl_2 \quad 1. \text{ rew./dm}^3$$

3) modelu uzyskanego na podstawie wyników z wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru badanej testem Ames przy użyciu szczepu TA100 bez frakcji S9-mix

$$M_{f_w.model_ClO_2 \text{ i } Cl_2} = -81,5 + 171,7 * OWO + 744,7 * N-NH_4^+ \quad 1. \text{ rew./dm}^3$$

4) modelu Vartiainen

$$M_{f_Vartiainen} = A * (1 - e^{-k * [OWO] * [Cl_2] * (1 - NH_3)^2}) \quad 1. \text{ rew./dm}^3$$

obliczoną na podstawie testu Ames z zastosowaniem szczepu TA100-S9-mix:

1) dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem

$$M_{\text{test Ames}_\text{ bez frakcji_dla } Cl_2} \quad 1. \text{ rew./dm}^3$$

2) dla wody rzeczywistej po zastosowaniu dwutlenku chloru

$$M_{\text{test Ames}_\text{ bez frakcji_dla } ClO_2 \text{ i } Cl_2} \quad 1. \text{ rew./dm}^3$$

Na podstawie uzyskanych w punkcie 2.5.2 pracy wyników wstępny model oparty o wyniki uzyskane dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu

dwutlenku chloru nie mógł być stosowany do przewidywania potencjalnej mutagenności wody wodociągowej.

W przypadku wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem i dezynfekowanej chlorem po dawkowaniu dwutlenku chloru (Tabela 40 i 41) wyniki mutagenności M obliczone przy użyciu funkcji matematycznych i na podstawie testu Amesa wykazywały rozkład normalny oprócz mutagenności M przewidywanej przy zastosowaniu wstępnego modelu opartego na wynikach z wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem.

Tabela 40. Statystyka testowa wyników mutagenności M dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem

Mutagenność M	N	Testy normalności			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnova	Lilieforsa	Shapiro-Wilka	
M_test Amesa_bez frakcji_dla Cl ₂	10	p > 0,20	p > 0,20	0,36	normalny
M_f_Vartiainen	10	p > 0,20	p > 0,20	0,72	normalny
M_f_w.model_Cl ₂	10	p > 0,20	p > 0,20	0,53	normalny
M_f_w.wodoc_Cl ₂	10	p > 0,20	p < 0,01	0,04	brak normalności

Tabela 41. Statystyka testowa wyników mutagenności M dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru

Mutagenność M	N	Testy normalności			Rozkład
		Kołmogorowa-Smirnova	Lilieforsa	Shapiro-Wilka	
M_test Amesa_bez frakcji dla ClO ₂ i Cl ₂	10	p > 0,20	p < 0,05	0,80	normalny
M_f_Vartiainen	10	p > 0,20	p < 0,05	0,86	normalny
M_f_w.model_ClO ₂ i Cl ₂	10	p > 0,20	p > 0,20	0,94	normalny
M_f_w.model_Cl ₂	10	p > 0,20	p > 0,20	0,94	normalny

W przypadku wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem mutagenność M obserwowana testem Amesa skorelowana była z mutagennością M przewidywaną modelem Vartiainena (M_f_Vartiainen) i wstępnym modelem opartym o wyniki z wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem (M_f_w.wodoc_Cl₂) - Tabela 42. W pierwszym przypadku współczynnik korelacji był dodatni, istotny statystycznie, dość wysoki i wynosił 0,69, w przypadku drugim również był dodatni, istotny statystycznie, dość wysoki (nieco wyższy od poprzedniego) i osiągnął wartość równą 0,83. Jednocześnie miała miejsce pomiędzy mutagennością M przewidywaną tymi modelami dodatnia, dość wysoka, istotna statystycznie korelacja wynosząca 0,84. Mutagenność M przewidywana modelem opartym o wyniki

z wody modelowej dezynfekowanej chlorem (M_f_w.model_Cl₂) nie wykazywały korelacji istotnej statystycznie ani z mutagennością M obserwowaną w teście Ames a ani z mutagennością M przewidywaną pozostałymi modelami. W przypadku mutagenności M obserwowanej testem Ames współczynnik korelacji był niski, dodatni i osiągnął wartość 0,24, dla funkcji opartej o wyniki z wody rzeczywistej osiągnął wartość również dodatnią, ale najniższą spośród badanych przypadków i wynosił 0,11, natomiast dla mutagenności M przewidywanej modelem Vartiainen był niski i ujemny i wynosił -0,25.

Korelacja wyników pomiędzy mutagennością M dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru obserwowaną w teście Ames a przewidywaną modelami (Tabela 43) w żadnym badanym przypadku nie była istotna statystycznie. Dla mutagenności M przewidywanej modelem Vartiainen współczynnik korelacji był niski i ujemny i osiągnął wartość -0,04. Natomiast w pozostałych dwóch przypadkach (M_f_w.model_ClO₂iCl₂ oraz M_f_w.model_Cl₂) był dodatni, również niski i wynosił 0,28). Jedynie pomiędzy funkcjami opisującymi mutagenność M opartymi na wynikach uzyskanych dla wody modelowej zarówno dezynfekowanej chlorem jak również chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru miała miejsce doskonała korelacja dodatnia, czyli współczynnik korelacji wynosił 1,0.

Tabela 42. Korelacja wyników pomiędzy mutagennością M wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem obserwowaną w teście Ames a przewidywaną modelami

	M_test Ames bez frakcji dla Cl ₂	M_f_Vartiainen	M_f_w.model_Cl ₂	M_f_w.wodoc_Cl ₂
M_test Ames bez frakcji dla Cl ₂	1,00	0,69	0,24	0,83
M_f_Vartiainen	0,69	1,00	-0,25	0,84
M_f_w.model_Cl ₂	0,24	-0,25	1,00	-0,05
M_f_w.wodoc_Cl ₂	0,83	0,84	0,11	1,00

Tabela 43. Korelacja wyników pomiędzy mutagennością M wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym zastosowaniu dwutlenku chloru obserwowaną w teście Ames a przewidywaną modelami

	M_test Ames bez frakcji dla ClO ₂ i Cl ₂	M_f_Vartiainen	M_f_w.model_ClO ₂ i Cl ₂	M_f_w.model_Cl ₂
M_test Ames bez frakcji dla ClO ₂ i Cl ₂	1,00	-0,04	0,28	0,28
M_f_Vartiainen	-0,04	1,00	-0,15	-0,15
M_f_w.model_ClO ₂ i Cl ₂	0,28	-0,15	1,00	1,00
M_f_w.model_Cl ₂	0,28	-0,15	1,00	1,00

PODSUMOWANIE I Dyskusja Wyników

W celu oceny możliwości zastosowania modelu Vartiainena w warunkach polskich do prognozowania na podstawie trzech parametrów chemicznych bezpieczeństwa zdrowotnego wody do picia zawierającej mikrozanieczyszczenia powstające w wyniku jej dezynfekcji chlorem, przeprowadzono badania w dwóch niezależnych wariantach:

I etap – z wykorzystaniem wody modelowej – w celu ustalenia wpływu zawartości OWO pochodzącego z obecności humusów naturalnych i stężenia azotu amonowego na aktywność mutagenną powstających w rezultacie dezynfekcji pochodnych chlorowych. Do badań wybrano trzy wartości OWO (2,0; 4,0 i 6,0 mgC/dm³) i trzy stężenia azotu amonowego (0,1; 0,5; 1,0 mgNH₄⁺/dm³). Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [80], dopuszczalny zakres wartości dla OWO mieści się w granicach od 0 do 5,0 mgC/dm³ a dla jonu amonowego od 0 do 0,5 mgNH₄⁺/dm³. Zostało to uwzględnione w badaniach własnych. Górną wartość zakresu stężeń dla azotu amonowego wybrano uwagi na to, iż w modelu Vartiainena opisywanym funkcją $f = A \cdot (1 - e^{-k \cdot [OWO] \cdot [Cl_2] \cdot (1 - NH_3)^2})$ dla stężenia azotu amonowego równego 1,0 mgNH₄⁺/dm³ niezależnie od zawartości OWO i dawki chloru potencjalna mutagenność osiąga zawsze wartość 0.

II etap – na rzeczywistej, uzdatnionej wodzie powierzchniowej po procesie jej dezynfekcji - w celu oceny jakości zdrowotnej wrocławskiej wody wodociągowej w aspekcie powstających pochodnych chlorowych. Z uwagi na sezonową zmienność składu jakościowego wody badania prowadzone były w cyklu rocznym. Ten etap badań miał na celu również weryfikację modelu Vartiainena, który powstał w oparciu o około 100 próbek wody wodociągowej pochodzącej z 39 zlokalizowanych na terenie Finlandii zakładów uzdatniania wody (pobierających wodę zarówno powierzchniową jak również i podziemną oraz infiltracyjną) [21]. Model ten był weryfikowany również w Stanach Zjednoczonych [151] gdzie prowadzono badania wód pochodzących z czterech zakładów oczyszczania wody (z tym, że trzy pobierały do uzdatniania wodę powierzchniową, a jeden gruntową).

Dezynfekcję wody modelowej i rzeczywistej prowadzono w warunkach laboratoryjnych wyznaczoną dawką chloru oraz chloru po wprowadzeniu do wody dwutlenku chloru (w celu obniżenia ilości UPCh, czyli obniżenia potencjalnej mutagenności wody) [52, 58, 69, 84].

Do badań bioindykacyjnych testem Amesa próbki wody zateżano na żywicach epoksydowych XAD, metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE), w szeregowym układzie kolumn

zawierających żywice. Drugi taki sam zestaw służył do oznaczeń ubocznych produktów chlorowania jako AOX i HAA (MCAA, DCAA, TCAA). Nie ma ujednoliconej standardowej procedury zateżania i odzysku zaadsorbowanych związków. Do zateżania próbek wody stosowane są różnego rodzaju żywice epoksydowe XAD [65, 156-158], żywice jonowymienne Serdolit Pad [46], oraz sorbenty (blue cotton rye, blue rayon i blue chitin) [159, 160]. Ze względu, iż praca miała na celu weryfikację modelu Vartiainena, opracowanego na podstawie analizy próbek wody zateżanych na żywicach epoksydowych XAD metodą SPE, dlatego też w badaniach własnych do badań testem *Salmonella* zastosowano tą metodę. Zarówno badania własne, fińskie i amerykańskie różniły się między sobą rodzajem jak i ilością żywic oraz ilością zateżanej wody, szybkością jej przepływu jak również ilością oraz rodzajem zastosowanego eluentu [21, 151]. W badaniach fińskich stosowano tylko żywicę XAD-8, natomiast w amerykańskich XAD-8 i XAD-2. Na podstawie doniesień literaturowych [113, 161-163] i prowadzonych wcześniej w ramach grantu KBN badań [30] ustalono optymalny układ szeregowy żywic Amberlite złożony z XAD-16, XAD-7, XAD-2 gwarantujący wysoką sprawność zateżania związków organicznych.

W badaniach własnych do zateżania brano 10 dm³ wody. Podczas gdy w fińskich zateżano 4,0 dm³ wody, a amerykańskich o dwadzieścia razy więcej. Najwolniejsza prędkość przepływu zateżanej wody przez kolumnę wynosiła w badaniach fińskich 0,64 objętości złoża na minutę tj. 84 cm³/min i 200 cm³/min w badaniach amerykańskie, natomiast w badaniach własnych wynosiła 15 objętości złoża na minutę, czyli 135 cm³/min. Sposób upakowania kolumny w badaniach fińskich wynosił 50 cm³, w badaniach amerykańskich 104 cm³ dla XAD-8 i XAD-2 a w badaniach własnych w sumie 27,0 cm³. użytym eleuntem w badaniach fińskich i amerykańskich był octan etylu różniący się objętością i wynosił odpowiednio: 300 cm³ i 630 cm³. Na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań ustalono wydajność odzysku OWO (wydajność sumaryczna adsorpcji i ekstrakcji) i wykazano, iż najlepszym eleuntem był aceton. Odpowiednio odzysk OWO wynosił dla: acetonu – 68%, metanolu – 56% i 35% dla octanu etylu [30].

Proponowany zestaw zapewniał średnio około 80% sprawność odzysku chlorowanych związków organicznych (AOX i HAA), przy niewielkich ilościach użytych żywic oraz odczynników do ich oczyszczania i ekstrakcji. Procedura uzyskiwania ekstraktów związków organicznych z wód na żywicach XAD wykazała ich wysoką sprawność adsorpcyjną i łatwość ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Wyższą sprawność wykazały żywice XAD7 i XAD16 przeznaczone do adsorpcji związków organicznych o wysokich masach

cząsteczkowych, a nieco niższą (o ok. 10% żywica XAD-2). Na podstawie badań i uzyskanych wyników uznano, iż był to optymalny zestaw do ustalania wpływu zawartości OWO (pochodzącego z obecności humusów naturalnych i stężenia azotu amonowego) na aktywność mutageną powstających w rezultacie dezynfekcji pochodnych chlorowych.

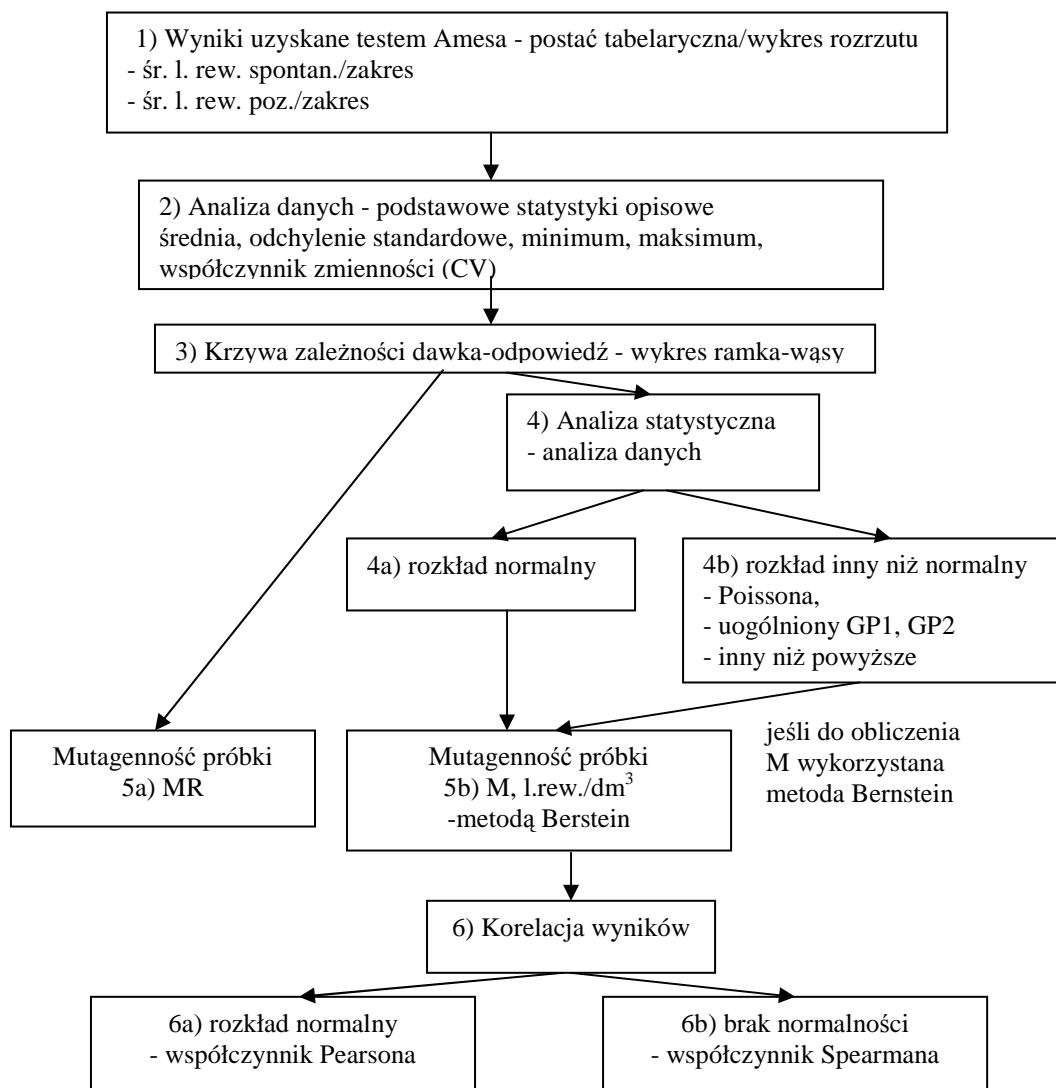
W badania bioindykacyjnych wody modelowej testem Ames, zgodnie z procedurą Vartiainen, zastosowano jedynie szczep testowy *Salmonella typhimurium* TA100, natomiast badania potencjalnej mutagenności wody powierzchniowej uzdatnianej w ZOW „Mokry Dwór” wykonano standardowym do tego typu badań zestawem szczepów TA100 i TA98, w celu bliższego rozpoznania potencjalnej mutagenności organicznych pochodnych chlorowych. Zarówno w pierwszym jak i w drugim etapie badań próbki wód były badane z zastosowaniem i bez frakcji mikrosomalnej S9mix, co pozwoliło na ocenę potencjalnych właściwości mutagennych mikrozanieczyszczeń wody zarówno o charakterze mutagenów jak i promutagenów. Dla wód rzeczywistych nie wyliczono mutagenności M dla szczepu testowego TA98 z i bez zastosowania frakcji mikrosomalnej ze względu na to, iż współczynnik kierunkowy β_1 (funkcji regresji wyrażonej wzorem $\beta_0 + \beta_1 \cdot d$) w większości wypadków przyjmował wartość ujemną, a przez to wyniki mutagenności M osiągały również wartość ujemną.

Oprócz badań bioindykacyjnych wykonano również szereg badań fizyczno-chemicznych podstawowych parametrów wody rzeczywistej. W okresie rocznych badań woda powierzchniowa oczyszczana w ZOW „Mokry Dwór” charakteryzowała się stabilnym składem fizyczno-chemicznym i w zakresie badanych wskaźników jakości, odpowiadała wymaganiom określonym Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.

W badaniach fińskich i amerykańskich uboczne produkty dezynfekcji oznaczano jako THM. Zarówno w I jak i II etapie badań mierzono adsorbowane halogenowe związki organiczne jako AOX oraz kwasy chlorooctowe (MCAA, DCAA, TCAA) w wodzie przed jak i po procesie zateżania, przyjęte na podstawie danych literaturowych [102, 164, 166] jako markery powstających ubocznych produktów chlorowania.

Kolejną kwestią nieuporządkowaną i niejednoznaczną a niezbędną przy porównywaniu wyników jest procedura przedstawiania i obliczania wyników uzyskiwanych testem Ames. W ostatnim czasie panuje tendencja do przedstawiania wyników jako mutagenność M (liczba rewertantów/1 dm³), przy czym niejednoznaczny jest sposób ich obliczania. W badaniach prowadzonych w latach ubiegłych wyniki testu *Salmonella* były głównie przedstawiane jako współczynnik mutagenności MR. Ponadto w wielu publikacjach brakuje

podstawowych informacji dotyczących zastosowanych szczepów a mianowicie nie podawana jest liczba rewertantów spontanicznych jak również odpowiedź szczepów na stuprocentowe mutageny. Dlatego też w celu możliwości porównywania uzyskiwanych testem *Salmonella* wyników podjęto próbę ujednoczenia i uporządkowania sposobu przedstawiania i analizy uzyskanych tym testem wyników. Zaproponowany wstępny schemat, zastosowany w pracy obejmował [Rys. 8]:



Rysunek 8. Schemat przedstawiania i analizy uzyskanych wyników testów Ames

1) Podanie średnich wartości rewersji spontanicznej (lub zakresu) szczepu *Salmonella typhimurium*, oraz wartości średnich (lub zakresu) mutacji pozytywnych uzyskanych po zastosowaniu odpowiednich czynników mutagennych charakterystycznych dla danego szczepu testowego. Stwierdzono, że przedstawianie wyników testu Ames z wykorzystaniem

formy tabelarycznej lub wykresów rozrzutu, gdzie umieszczone są wszystkie dane, przy dużych ich ilościach można pominąć.

2) Analiza uzyskanych danych - określenie wartości podstawowych statystyk opisowych tj. średniej, odchylenia standardowego, minimum, maksimum czy współczynnika zmienności (CV) dla danej dawki, w celu podsumowania zbioru danych i wyciągnięcie podstawowych wniosków i uogólnień na temat zbioru. W przypadku, gdy w analizie danych uzyskanych testem Amesa potrzebny jest bardziej szczegółowy opis wyników dla konkretnej dawki/konkretnego zateżenia (stężenia), to wówczas można wykorzystać wykres ramka-wąsy, który pozwala na porównanie wartości podstawowych statystyk opisowych dla poszczególnych dawek/konkretnych zateżeń (stężeń). Wykres ten pozwala również określić charakter krzywej zależności dawka-odpowiedź.

3) Charakter krzywej zależności dawka-odpowiedź – kolejny krok przed przystąpieniem do analizy wyników, prowadzony już na etapie badań, prowadzony w celu oceny istnienia zależności pomiędzy dawką (zateżeniem/stężeniem) - d - badanej próby a liczbą rewertantów, czyli czy uzyskane dane układają się w postaci krzywej zależności dawka-odpowiedź o charakterystycznym przebiegu. Jeśli jest spełniony ten warunek - oznacza to, że zakres zateżeń (dawek/stężeń) w jakim wykonywane było doświadczenie, został prawidłowo dobrany. Tylko w przypadkach uzasadnionych metodyką prowadzonych badań, można odstąpić od tej reguły, co zastosowano w pracy. Do przedstawienia charakteru krzywej dawka-odpowiedź można wykorzystać wykres ramka-wąsy, który jednocześnie pokazuje wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi.

4) Rozkład danych - pierwsza faza analiz statystycznych. Jeśli próbka jest dostatecznie duża wtedy spełnione są założenia rozkładu normalnego i należy rozpocząć analizę danych. W tym przypadku wszystkie potrzebne narzędzia statystyczne, można znaleźć w większości pakietów statystycznych. Kiedy założenie o normalności próbki nie jest spełnione, należy wybrać jedną z kilku propozycji rozkładów danych. Jednakże w trakcie analizy danych uzyskanych testem Amesa może zaistnieć również sytuacja (i z reguły taka sytuacja ma miejsce), kiedy dane nie mają ani rozkładu normalnego, ani rozkładu Poissona ani też uogólnionego rozkładu Poissona GP1 czy GP2. Dlatego też, w tym przypadku, można rozważyć przekształcenie danych, wykorzystując np. transformację Boxa-Coxa, albo nałożyć logarytm na dane, co może doprowadzić do zmniejszenia wariancji próby i rozwiązać problem z dopasowaniem rozkładu prawdopodobieństwa. Również można pominąć fakt braku normalności danych, jeśli do obliczenia mutagenności M zastosowana będzie metoda Bernstein, co zostało zastosowane w pracy.

5) Określanie mutagenności badanej próbki, która powinna być przedstawiona jako:

- MR - współczynnik mutagenności – sposób uzyskania wyniku jest jednoznaczny polega na obliczeniu stosunku średniej wartości rewersji indukowanej do średniej rewersji spontanicznej danego szczepu. W tym przypadku są jasno określone wzory do wyliczenia tego współczynnika jak również reguła według, której jeśli $MR \geq 2,0$ wskazuje, że w badanej próbce wody, przy pewnym jej zateżeniu (w pewnym zakresie zateżeń), czy też w pewnej objętości wody mogą znajdować się mikrozanieczyszczenia o potencjalnych właściwościach mutagennych. Jeżeli $MR < 2,0$ - świadczy to, że albo nie są obecne, albo obecne w danym zateżeniu (objętości) wody mikrozanieczyszczenia prawdopodobnie nie będą wpływać negatywnie na materiał genetyczny bakterii *Salmonella typhimurium*.

- M - mutagenność określona jako liczba rewertantów indukowana przez 1 dm³ badanej próbki – do analizy proponowana jest metoda Bernstein - uwzględniająca tylko początkową część krzywej dawka-odpowiedź - odcinek liniowy. W tym przypadku niezależnie, jaki rozkład mają dane uzyskane testem *Salmonella* funkcja regresji będzie liniowa, a ocenę dopasowania otrzymanych wyników do założonego modelu liniowej zależności dawka-odpowiedź należy przeprowadzać metodą najmniejszych kwadratów, wykorzystując analizę regresji liniowej. Przy założeniu, że krzywa zależności dawka-odpowiedź jest liniowa i kwestia wykrywania punktu zmiany d (momentu, w którym zateżenie/stężenie/dawka zaczyna działać toksycznie) jest nieistotna to oczekiwana liczba rewertantów w zależności od d ma postać:

$$E(N) = \beta_0 + \beta_1 * d.$$

Opierając się na modelu prostej regresji liniowej należy estymować wartości współczynników β_0 oraz β_1 . Estymator współczynnika β_0 przybliża liczbę rewertantów spontanicznych, natomiast wartość estymatora współczynnika β_1 określa o ile wzrośnie liczba rewertantów indukowanych, jeżeli d wzrośnie o jeden poziom.

6) W celu określenia współzależności pomiędzy dwiema lub większą liczbą zmiennych powinna być zastosowana korelacja. Dla zmiennych nie wykazujących rozkładu normalnego obliczany jest współczynnik korelacji Spearmana, a dla zmiennych o rozkładzie normalnym - współczynnik Pearsona. Przed obliczeniem współczynników korelacji dokonywana jest ocena rozkładu zmiennych.

Woda modelowa dezynfekowana chlorem zawierająca OWO na poziomie od 4,0 do 6,0 mgC/dm³, niezależnie od stężenia azotu amonowego (bez próby OWO=4,0 mgC/dm³ i N-NH₄⁺=0,1 mgNH₄⁺/dm³), wykazywała potencjalne właściwości mutagenne. Wartość

wskaźnika mutagenności MR, dla tych wód, zwiększała się wraz ze wzrostem zawartości ogólnego węgla organicznego i stężeniem azotu amonowego do wartości $MR=4,9$. Woda modelowa o niskiej zawartości węgla organicznego ($2,0 \text{ mgC/dm}^3$), niezależnie od stężenia azotu amonowego nie wykazywała potencjalnych właściwości mutagennych. W wyniku aktywacji metabolicznej oraz biotransformacji mikrozanieczyszczeń o charakterze mutagennym zaobserwowano wyraźny spadek MR do wartości równej bądź bliskiej 1,0. Uzyskana dla dziewięciu wariantów wody modelowej mutagenność M badana testem Ames bez zastosowania frakcji mikrosomalnej mieściła się w granicach od 327 rew/dm³ dla najniższych wskaźników wody modelowej do 3 157 rew/dm³ dla najwyższych. Wyniki mutagenności M układały się tak samo jak wyniki dla dawki chloru oraz chloropochodnych (AOX i HAA) w zależności od OWO i azotu amonowego, czyli wzrost stężenia azotu amonowego powodował zwiększenie się mutagenności M, dawki normalnej chloru (od 2,5 do 16,0 mgCl₂/dm³), ilości UPCh. Stężenie AOX przed zateżeniem wody wahało się od 44 do 310 µgCl/dm³. Odzysk AOX w procesie ekstrakcji wynosił średnio 72%. Udział kwasów chlorooctowych w AOX przed zateżaniem wody modelowej wynosił w sumie 49% a po jej zateżaniu 42%. Największy udział w sumie kwasów chlorooctowych w wodzie modelowej, przed zateżaniem, miał kwas monochlorooctowy – średnio 52%. Średnia skuteczność zateżania wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla sumy HAA wynosiła 64%. Mutagenność M wody modelowej badanej testem *Salmonella* z zastosowaniem frakcji mikrosomalnej wynosiła od 121 do 618 rew./dm³ i nie wykazywała zależności takiej jak w przypadku wyników uzyskanych testem Ames bez zastosowania frakcji mikrosomalnej.

Zaobserwowano dla poszczególnych statystyk opisowych (mediany, odchylenia standardowego, maksimum, rangi oraz współczynnika zmienności-CV), że im większa wartość średniej tym większy rozrzut obserwowanych danych, tzn. średnia coraz słabiej opisywała próbkę. Wyjątek stanowiła wartość minimalna, która nie rosła wraz ze wzrostem wartości średniej. W testach z zastosowaniem frakcji nie zauważono takich zależności. Wartości podstawowych statystyk opisowych, dla wszystkich próbek, były zbliżone do siebie, czyli że zmienność danych we wszystkich badanych próbkach była niewielka i średnia dobrze opisywała dane. Spośród osiemnastu próbek wody modelowej dezynfekowanej chlorem badanej w teście Ames z i bez frakcji mikrosomalnej tylko dla czterech próbek należało odrzucić hipotezę o normalności danych. Wyniki testów układały się w postaci dwóch różnych zależności dawka–odpowiedź. W przypadku pięciu wód wraz ze wzrostem zateżania próbki wody rosła liczba rewertantów osiągając dla współczynnika koncentracji 1000 wartości maksymalne. Dla pozostałych trzynastu próbek wody uzyskane

wyniki układały się w postaci linii prostej, czyli niezależnie od wzrostu zateżenia próbki nie rosła liczba rewertantów. W żadnym badanym przypadku krzywa nie miała charakterystycznego dla testu *Salmonella* przebiegu.

Według modelu Vartiainenena opartego o badania na fińskiej wodzie wodociągowej [21] wzrost stężenia jonów amonowych powodował zmniejszenie ilości ubocznych produktów chlorowania wody a przez to obniżenie potencjalnej mutagenności wody, nawet do 0, gdy stężenie jonów amonowych było równe $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$, czyli wzrost mutagenności M był uzależniony jedynie od wzrostu zawartości OWO i dawki chloru.

[...] Według ostatnio opublikowanych badań największe skutki genotoksyczne i cytotoksyczne należy przypisać halogenowanym pochodnym acetonitryli i nitrometanów [167]. [...] Z drugiej strony – w literaturze naukowej od wielu lat toczy się dyskusja dotycząca powstawania nitrozoamin w procesie dezynfekcji wody. Wszystkie te produkty utleniania i dezynfekcji łączą obecność azotu w cząsteczce. Stąd też zaczęto zwracać większą uwagę na obecność i rolę azotu organicznego w wodach przeznaczonych do spożycia [168]. [...] Oprócz nitrozodimetyloaminy (NDMA), w wodach wodociągowych wykryto także inne nitrozoaminy, takie jak N-nitrozopiperidyna, N-nitrozopirolidyna, N-nitrozodifenyloamina [169]. W wodzie po dezynfekcji występują oprócz dwóch głównych grup produktów ubocznych tj. trihalometanów, halogenowych kwasów octowych również halogenoacetonitryle powstające podczas chlorowania wody zawierające aminokwasy, proteiny i inne związki organiczne zawierające azot. Związki te pochodzą głównie z substancji humusowych. Chociaż dotychczas nie przeprowadzono długoterminowych badań nad rakotwórczością halogenowanych acetonitryli, jednakże istnieją uzasadnione podejrzenia, co do ich właściwości rakotwórczych. W stosunku do szczurów wykazano działanie teratogenne trihaloacetonitrylu, a działanie mutagenne u bakterii wykazano w przypadku dichloro- i bromochloro-acetonitrylu [166].

Przedstawione powyżej argumenty mogą tłumaczyć uzyskane w wodzie modelowej zależności pomiędzy wzrostem: zawartości OWO, stężenia azotu amonowego i dawki chloru a wzrostem mutagenności M tej wody badanej w teście Amesa szczepem TA100 bez aktywacji metabolicznej.

Analogiczne wyniki MR i M uzyskano dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym zastosowaniu dwutlenku chloru. Zastosowanie do wody modelowej dwutlenku chloru jako wstępnego utleniacza spowodowało obniżenie dawki chloru średnio o 13% (od 6 do 18%), ale nie miało to odzwierciedlenia w obniżeniu się ilości powstających ubocznych produktów dezynfekcji chlorem mierzonych w postaci AOX i HAA (MCAA,

DCAA, TCAA), co jednak nie wpłynęło na wynik potencjalnej mutagenności tej wody, która charakteryzowała się obniżeniem mutagenności M średnio o 36% (od 2 do 63%), poza dwoma przypadkami (dla $OWO=2,0 \text{ mgC/dm}^3$ oraz $N-NH_4^+ =0,1$ i $0,5 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$), gdzie mutagenność M była wyższa w przypadku wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wstępnej dezynfekcji dwutlenkiem chloru, jednakże wody te nie posiadały wskaźnika mutagenności MR powyżej 2,0 w żadnym zateżeniu, czyli nie były potencjalnie mutagenne.

W przypadku wyników testu Ames w wariancie bez zastosowania frakcji mikrosomalnej analizując wartości średnie trudno było stwierdzić ogólną tendencję. Średnia liczba rewertantów dla dziewięciu ekstraktów wody modelowej, do której przed dezynfekcją chlorem wprowadzono dwutlenek chloru była niższa średnio o 16 % (3-37%) w porównaniu do wody modelowej dezynfekowanej chlorem i mieściła się w granicy od 119 do 172 rewertantów. Podobnie układały się wyniki dla wartości minimalnych (od 70 do 122 rewertantów). Rozkład próbek był prawostronnie skośny. W przypadku próbek wody badanych z zastosowaniem frakcji wartości statystyk opisowych były do siebie zbliżone. Zastosowane testy statystyczne wykazały, że aż siedem spośród osiemnastu próbek wody modelowej po wstępnym dawkowaniu dwutlenku chloru i dezynfekcji chlorem nie miały rozkładu normalnego, w tym pięć z nich to wody modelowe badane testem Ames bez zastosowania frakcji. W przypadku dwóch próbek wody, krzywa zależności dawka -odpowiedź miała charakterystyczny dla testu *Salmonella* przebieg. W trzech badanych wodach wraz ze wzrostem zateżenia próbki rosła liczba rewertantów osiągając w zateżeniu 1000 wartości maksymalne. Dla pozostałych trzynastu próbek wody niezależnie od wzrostu zateżenia próbki nie rosła liczba rewertantów, czyli uzyskane wyniki układały się w postaci linii prostej.

Dla wody modelowej niezależnie od sposobu dezynfekcji większość uzyskanych wyników wykazywała wysoką korelację dodatnią, istotną statystycznie. W obu przypadkach wody modelowej współczynniki korelacji były nieistotne dla mutagenności M obserwowanej w teście Ames z zastosowaniem frakcji jak również dla mutagenności M przewidywanej modelem Vartiainen i w większości niskie i ujemne. Mutagenność M wody modelowej dezynfekowanej chlorem badanej w teście Ames bez zastosowania frakcji była skorelowana dodatnio zarówno ze stężeniem OWO, azotu amonowego jak i azotu organicznego, oraz z dawką chloru i ubocznymi produktami chlorowania oznaczonymi w wodzie przed i po jej zateżeniu. W przypadku wody modelowej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym dawkowaniu dwutlenku chloru nieistotną statystycznie niską, dodatnią korelację wykazywała

mutagenność M wody modelowej badanej bez zastosowania frakcji S9-mix z azotem amonowym i organicznym.

Wprowadzenie dwutlenkiem chloru jako utleniacza przed właściwym chlorowaniem wody modelowej miało na celu obniżenie potencjalnej mutagenności wody poprzez obniżenie ilości i stężenia powstających w wyniku dezynfekcji ubocznych produktów. Stosowanie dwutlenku chloru jest metodą alternatywną w stosunku do chlorowania wody.

Dwutlenek chloru reaguje także z substancjami organicznymi, co prowadzi do powstania wielu organicznych produktów ubocznych. Reakcje ClO_2 z substancjami humusowymi [170] polega na rozerwaniu wiązań beta-aryloeterowych, co prowadzi do utworzenia chinonów, kwasów mukonowych i estrów metylowych tych kwasów. Według prac [171-173] głównymi produktami ubocznymi stosowania dwutlenku chloru są kwasy karboksylowe od C4 do C16 oraz pochodne kwasów maleinowych. Wykrywa się także cykliczne ketony. W wodach bogatych w bromki wykryto także związki bromoorganiczne, choć nie wykrywa się bromianów. Według prac [53, 174] wynika, że typowymi organicznymi produktami ubocznymi stosowania dwutlenku chloru są aldehydy i kwasy karboksylowe.

Ponieważ dwutlenek chloru nie powoduje powstawania THM, jak również kwasów chlorooctowych i nie reaguje z azotem amonowym, natomiast jako silny utleniacz powoduje przede wszystkim rozpad wielkocząsteczkowych związków organicznych zawartych w wodzie do kwasów karboksylowych m.in. kwasu octowego, które nie wykazują aktywności biologicznej. Chlorowanie wody po zastosowaniu dwutlenku chloru jako wstępnego utleniacza może spowodować wytworzenie się większej ilości kwasów chloroorganicznych w wyniku reakcji chloru z np. kwasem octowym, co najprawdopodobniej miało miejsce. W wodzie modelowej znajdowało się na pewno znacznie więcej wielkocząsteczkowych związków organicznych, które w wyniku stosowanych w ZOW procesów jednostkowych uzdatniania wody są usuwane, stąd też można tłumaczyć większą ilość ubocznych produktów jako AOX i HAA w wodzie modelowej, do której wprowadzono przed dezynfekcją chlorem dwutlenek chloru. Wykorzystywany do zateżania i ekstrakcji próbek wody zestaw żywic, szczególnie zastosowanie do badań żywic XAD16 i 7 o wysokim powinowactwie do związków o wysokiej masie cząsteczkowej potwierdziło jak istotne w uzdatniania wody są procesy jednostkowe takie jak koagulacja, sedymentacja, filtracja na węglu aktywnym i jak istotne jest ich prawidłowe funkcjonowanie w celu eliminacji związków organicznych szczególnie tych wielkocząsteczkowych, które także mogą być prekursorami UPCh. Jednocześnie badania modelowe wykazały, iż zarówno wzrost zawartości w wodzie OWO jaki i wzrost stężenia azotu amonowego niezależnie od zastosowanej metody dezynfekcji

wody powodowało wzrost dawki chloru a konsekwencją tego było zwiększenie się ilości ubocznych produktów chlorowania i podwyższenie potencjalnej mutagenności wody. Jak również uzyskane wyniki dla wody modelowej zwróciły uwagę na negatywny wpływ na jakość zdrowotną wody zawierającej nie tylko azot amonowy, ale również azot organiczny. Przedstawione zależności uzyskano dzięki przedstawieniu wyników testów Ames dla wody modelowej jako wskaźnik mutagenności MR. Biorąc pod uwagę fakt, iż metoda SPE zateżania nie daje 100% odzysku zawartych w wodzie związków chemicznych szczególnie tych organicznych, na podstawie uzyskanych wyników można spróbować wysunąć wniosek, że tylko woda o zawartości OWO równym lub niższym $2,0 \text{ mgC/dm}^3$ nie generuje potencjalnej mutagenności będącej rezultatem powstających w niej UPCh. Natomiast według Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [80] dopuszczalna zawartość OWO w wodzie do picia może wynosić $5,0 \text{ mgC/dm}^3$, co być może jest wartością za wysoką.

Jednocześnie jak wykazały wyniki korelacji dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem na mutagenność M badaną szczepem TA100 bez zastosowania frakcji S9-mix mają wpływ nie tylko zawartość OWO, czy stężenie azotu amonowego, ale również stężenie azotu organicznego o czym świadczą również wysokie współczynniki korelacji uzyskane dla mutagenności M i chloropochodnych (AOX i HAA). Na podstawie wyników badań uzyskanych na bazie wody modelowej dezynfekowanej chlorem można stwierdzić, iż istnieją przesłanki do stworzenia modelu do prognozowania potencjalnej mutagenności wody w oparciu o OWO, azot amonowy lub organiczny.

W okresie rocznych badań woda powierzchniowa oczyszczana w ZOW „Mokry Dwór” charakteryzowała się stabilnym składem fizyczno-chemicznym i w zakresie badanych wskaźników jakości, odpowiadała wymaganiom określonym Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi [80]. Zawartość ogólnego węgla organicznego wahała się w zakresie $2,6\text{--}4,8 \text{ mgC/dm}^3$, przy średniej wartości $3,5 \text{ mgC/dm}^3$. Stężenie azotu amonowego było w zakresie od $0,06$ do $0,32 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$, średnio przyjmując wartość $0,12 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$.

W przypadku chlorowania wody wodociągowej na podstawie krzywych zapotrzebowania dawki normalne chloru zmieniały się w niewielkim stopniu w zakresie $1,5\text{--}2,7 \text{ mgCl}_2/\text{dm}^3$. Ilość powstałych AOX w wodzie – wahała się w granicach od 21 do $49 \text{ }\mu\text{g/dm}^3$ przy średniej wartości $35 \text{ }\mu\text{g/dm}^3$, natomiast w ekstrakcie z wód była niższa średnio o 23%. Znaczący, średnio 62% udział w AOX, w wodzie przed zateżeniem, miały kwasy chlorooctowe.

Najwyższy – 25% udział miał kwas monochlorooctowy. Sumaryczne stężenie HAA wahało się w dość szerokich granicach 9,5-38,0 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, przy średniej wartości 22,9 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Najwyższy średnio 42 % udział w ich sumarycznym stężeniu miał kwas monochlorooctowy a udziały pozostałych dwóch kwasów były podobne i wynosiły średnio 29%. Podobnie kształtowały się zależności w wodzie po jej zateżeniu. Średnia skuteczność zateżenia wody modelowej dezynfekowanej chlorem dla sumy HAA wynosiła średnio 79 %.

W badaniach bioindykacyjnych niezależnie od sposobu dezynfekcji wody rzeczywistej przy zastosowaniu frakcji mikrosomalnej S9-mix jak i bez niej, zarówno dla szczepu *S. typhimurium* TA98 jak i TA100, poza nielicznymi przypadkami, nie stwierdzono potencjalnej mutagenności wynikającej z występowania związków o charakterze zarówno pro jak i mutagenów, które miałyby istotny wpływ na podwyższenie rewersji indukowanej szczepów testowych.

W wyniku dezynfekcji wody wodociągowej chlorem potencjalną mutagenność uzyskiwaną przy zastosowaniu szczepu TA100 wykazywały próbki wody pobrane w październiku (MR=2,0) i w sierpniu (MR=4,0), a w miesiącu marcu osiągnięto wartość wskaźnika mutagenności MR bliską 2,0. W przypadku dezynfekcji wody chlorem, po wcześniejszym zastosowaniu dwutlenku chloru zaobserwowano dwukrotną ilość rewertantów indukowanych w stosunku do rewersji spontanicznej zarówno dla szczepu TA98 (dla wody pobranej w marcu – MR=2,1) jak i TA100 (w sierpniu MR=2,7) wskazujące na jej potencjalną mutagenność. Również w przypadku badania próbki wody z lipca szczepem TA100 osiągnięto wartość MR bliską 2,0. Na podstawie uzyskanych wyników widać, iż w okresie wiosenno-letnim następuje wyraźny wzrost mutagenności wody badanej testem *Salmonella* z użyciem szczepu TA100 bez frakcji.

Uzyskana dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem badanej w cyklu rocznym mutagenność M mierzona w teście Amesa szczepem TA100 bez zastosowania frakcji mikrosomalnej mieściła się w granicach od 82 rew/dm³ dla wody pobranej w lutym do 2 047 rew/dm³ dla wody pobranej w sierpniu. Mutagenność M uzyskana dla tych samych wód badanych testem Amesa z zastosowaniem frakcji osiągnęła najniższą wartość 147 rew/dm³ w kwietniu, a najwyższą 997 w styczniu.

W przypadku wyników testu Amesa uzyskanych przy zastosowaniu szczepu TA100 bez zastosowania frakcji mikrosomalnej w okresie jesienno-zimowym średnia liczba rewertantów osiągnęła wartość maksymalną 113 w październiku a minimalną w lutym i wynosiła 74. W okresie wiosenno-letnim następował wzrost średniej liczby rewertantów od 61 w kwietniu do 170 w sierpniu. Podobny charakter zmian jak dla wartości średniej zaobserwowano dla

wartości mediany dla poszczególnych próbek i w większości przypadków wartości mediany były bliskie średnim, co oznacza że dane miały rozkład symetryczny. Na podstawie uzyskanych wyników nie zauważono, aby wartości statystyk opisowych zmieniały się podobnie jak średnia. W przypadku wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem badanej w teście Ames z szczepem *S. typhimurium* TA100 z zastosowaniem frakcji nie zaobserwowano dużych różnic w wartościach statystyk dla poszczególnych próbek. Natomiast wartości średnie układały się w sposób charakterystyczny podobny jak dla próbek z wód badanych bez zastosowania frakcji. W przypadku tych samych próbek wody wodociągowej badanej testem Ames z zastosowaniem szczepu TA98 bez frakcji nie zauważono tendencji wzrostowej czy spadkowej w liczbie rewertantów. Dla wszystkich próbek wartości odchylenia standardowego, rangi jak również współczynnika zmienności dla poszczególnych próbek były do siebie zbliżone, a wartości mediany były bliskie średnim, czyli dane miały rozkład symetryczny. Dla wody wodociągowej badanej szczepem TA98 z zastosowaniem frakcji, wartości średnie były do siebie zbliżone i nie zaobserwowano żadnych charakterystycznych tendencji. W przypadku wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem badanej przy zastosowaniu szczepu TA100 ponad połowa danych miała rozkład normalny i dużo częściej odrzucona była hipoteza o tym, że dane pochodzą z rozkładu normalnego w przypadku wody badanej bez zastosowania frakcji niż z zastosowaniem frakcji. Dla wód badanych przy użyciu szczepu TA98 tylko jedna woda badana z zastosowaniem frakcji nie miała rozkładu normalnego. W przypadku dwóch próbek wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem, (październik - dla szczepu TA100 bez frakcji i sierpień - również TA100 bez frakcji) krzywa dawka-odpowiedź miała charakterystyczny dla testu *Salmonella* przebieg. Dla pozostałych próbek wody niezależnie od wzrostu zanieczyszczenia próbki nie rosła liczba rewertantów, czyli uzyskane wyniki układały się w postaci linii prostej.

Uzyskana dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym dawkowaniu dwutlenku chloru mutagenność M badana w teście Ames z szczepem TA100 bez zastosowania frakcji mikrosomalnej mieściła się w granicach od 100 rew/dm³ dla wody pobranej w kwietniu do 2 157 rew/dm³ dla wody pobranej w sierpniu. Mutagenność M uzyskana dla tych samych wód badanych testem Ames z zastosowaniem frakcji osiągnęła najniższą wartość 45 rew/dm³ w czerwcu, a najwyższą 775 w sierpniu.

Dla wody rzeczywistej niezależnie od sposobu dezynfekacji nie zaobserwowano regularności i zależności, jaka miała miejsce w wodzie modelowej, pomiędzy mutagennością M a wynikami chemicznymi wody takimi jak: zawartość OWO, stężenie azotu amonowego czy organicznego, dawka chloru czy też stężenia chloropochodnych takich jak AOX i HAA.

Zastosowanie do wody rzeczywistej dwutlenku chloru jako wstępnego utleniacza spowodowało obniżenie dawki chloru średnio o 26% (od 7 do 40%) i miało to odzwierciedlenia w obniżeniu się ilości powstających ubocznych produktów dezynfekcji chlorem mierzonych w postaci AOX i HAA (MCAA, DCAA, TCAA). Ilość AOX mierzonych w próbkach wody zarówno przed jak i po jej zateżeniu w wyniku zastosowania dwutlenku chloru przed chlorowaniem zmniejszyła się średnio o 32%, natomiast HAA średnio o 43%. W wodzie przed zateżeniem najbardziej obniżyła się ilość kwasu dichlorooctowego o 52% a następnie kwasu tri- i mono-chlorooctowego o 44 i 39%, natomiast w wodzie po zateżeniu najbardziej obniżyła się ilość kwasu trichlorooctowego o 54% a następnie kwasu mono i di-chlorooctowego o 45 i 39%. Natomiast obniżenie dawki chloru a co za tym idzie obniżenie stężenia AOX i HAA niejednoznacznie wpłynęło na wyniki potencjalnej mutagenności tej wody, która charakteryzowała się obniżeniem mutagenności M średnio o 65% (od 26 do 90%), tylko w 4 przypadkach (październik, kwiecień, maj, czerwiec), natomiast w pozostałych miesiącach była średnio o 34% (5-88%) wyższa.

Dla próbek wody badanych w teście Amesa szczepem *S. typhimurium* TA100 bez zastosowania frakcji w okresie jesienno-zimowym widoczny był spadek wartości średniej rewertantów od 105 do 78 (wyjątek stanowiła próbka W3). W okresie wiosenno-letnim następował wzrost średniej liczby rewertantów od 61 do 147. W trakcie badań z zastosowaniem frakcji nie zaobserwowano dużych różnic w wartościach statystyk dla poszczególnych próbek. Natomiast wartości średnie układały się w sposób charakterystyczny podobny jak dla próbek z wód badanych bez zastosowania frakcji. W przypadku tych samych próbek wody wodociągowej badanej testem Ames z zastosowaniem szczepu TA98 bez frakcji analizując wartości średnie nie zauważono żadnej tendencji wzrostowej czy spadkowej. Dla większości próbek wartości odchylenia standardowego, rangi jak również współczynnika zmienności były do siebie zbliżone. Podobnie jak dla wody wodociągowej badanej szczepem TA98 z zastosowaniem frakcji, dla większości próbek wartości średnie były do siebie zbliżone i nie zaobserwowano żadnych charakterystycznych tendencji. Dla próbek wody badanych przy zastosowaniu szczepu TA100 odrzucona została hipoteza o tym, że dane pochodzą z rozkładu normalnego w przypadku wody badanej bez zastosowania frakcji. Dla wody rzeczywistej badanej szczepem TA98 z zastosowaniem frakcji zaobserwowano więcej próbek, które nie pochodzą z populacji o rozkładzie normalnym (cztery na pięć nie wykazujących rozkładu normalnego). Pozostałe próbki badane szczepem TA98 posiadały rozkład normalny. W przypadku dwóch próbek wody rzeczywistej

dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym zastosowaniu dwutlenku chloru, krzywa dawka-odpowiedź miała przebieg charakterystyczny dla testu *Salmonella*. Tylko na jednym z wykresów ramka-wąsy wraz ze wzrostem zateżenia próbki rosła liczba rewertantów osiągając w zateżeniu 1000 wartość maksymalną. Dla pozostałych próbek wody niezależnie od wzrostu zateżenia próbki nie rosła liczba rewertantów, czyli uzyskane wyniki układały się w postaci linii prostej.

Niezależnie od sposobu dezynfekcji większość uzyskanych wyników wykazywała niską korelację zarówno dodatnią jak i ujemną, nieistotną statystycznie. W przypadku wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem wykazano w miarę wysoką korelację, istotną statystycznie pomiędzy mutagennością M obserwowaną w teście Ames bez frakcji a przewidywaną modelem Vartiainena (0,69) i dość wysoką pomiędzy mutagennością M obserwowaną w teście Ames bez frakcji, a dawką chloru (0,84). Natomiast dla po zastosowaniu dwutlenku chloru praktycznie nie wykazano korelacji pomiędzy mutagennością M obserwowaną w teście Ames bez frakcji a przewidywaną modelem Vartiainena (-0,04), a, jedynie dość wysoką i istotnie statystyczną (0,73) wykazano ze stężeniem azotu organicznego.

Wyniki dla wody rzeczywistej nie były tak jednoznaczne jak wyniki dla wody modelowej co może być związane z różnorodnością występujących w wodzie domieszek i zanieczyszczeń oraz zachodzących w niej procesów fizyczno-chemicznych. Jak wykazały wyniki, dla wody rzeczywistej zastosowanie dwutlenku chloru jako wstępnego utleniacza, nie w każdym przypadku dawało obniżenie potencjalnej mutagenności mimo, iż tworzyło się mniej UPCh oznaczanych jako AOX i HAA. Obecnie nie ma możliwości analitycznych, które pozwoliłyby na oznaczenie jakościowe i ilościowe pełnego spektrum związków chemicznych występujących w wodzie. Ze względu na złożoność środowiska wodnego i zachodzących w nim procesów, należałoby zwrócić większą uwagę na testy bioindykacyjne (nie tylko krótkoterminowe testy bakteryjne, ale również na badania na organizmach wyższych jak np. rozwielitkach czy rybach), dzięki którym można określić bezpośrednie oddziaływanie zanieczyszczeń i domieszek wody na organizmy żywe. Rezultaty takich badań można ekstrapolować na organizm ludzki oceniając ryzyko związane z piciem wody poddawanej dezynfekcji chlorem.

Zastosowanie w badaniach wody rzeczywistej również szczepu TA98 potwierdziło, iż nie należy ograniczać badań mutagenności testem Ames tylko do jednego szczepu *Salmonella typhimurium* TA100, gdyż dopiero zestaw tych dwóch szczepów (TA98 i TA100) daje pogląd w jaki sposób mikrozanieczyszczenia znajdujące się w wodzie a szczególnie UPCh

oddziaływają na materiał genetyczny. Również na tym etapie badań potwierdzono zalety przedstawiania wyników testów Amesa jako wskaźnik mutagenności MR, chociażby ze względu na fakt niemożności obliczenia mutagenności M dla wyników testu *Salmonella* uzyskanych dla szczepu TA98 zarówno z jak i bez zastosowania frakcji mikrosomalnej.

Badania fińskie zainicjowały próbę ich weryfikacji na gruncie amerykańskim [151]. Wyniki badań amerykańskich prowadzonych w celu weryfikacji modelu Vartiainena pokazały, że obserwowany poziom mutagenności M wody wodociągowej pochodzącej z tych zakładów, badany testem Ames, był o 1,5 do 2,0-razy wyższy niż obliczony na podstawie modelu Vartiainena. Mimo to korelacja pomiędzy przewidywaną a obserwowaną mutagennością była wysoka ($R=0,96$).

Na podstawie własnych uzyskanych wyników dla wody modelowej i wody rzeczywistej podjęto próbę opracowania da czterech wariantów badań wstępnych modeli regresji wielorakiej:

1) dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem badanej testem Ames przy użyciu szczepu TA100 bez aktywacji metabolicznej model opisywany był funkcją

$$f = -932,3 + 368,1 *OWO + 1618 * NH_4^+ \quad \text{l. rew./dm}^3$$

$$R^2 = 0,92 \text{ i } R^2 \text{ skorygowany} = 0,89$$

2) dla wody modelowej dezynfekowanej chlorem po zastosowaniu dwutlenku chloru badanej testem Ames przy użyciu szczepu TA100 bez aktywacji metabolicznej

$$f = -81,5 + 171,7 *OWO + 744,7 * NH_4^+ \quad \text{l. rew./dm}^3$$

$$R^2 = 0,69 \text{ i } R^2 \text{ skorygowany} = 0,59$$

3) dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem badanej testem Ames przy użyciu szczepu TA100 bez aktywacji metabolicznej

$$f = -1925 + 1336 *Cl_2 \quad \text{l. rew./dm}^3$$

$$R^2 = 0,73 \text{ i } R^2 \text{ skorygowany} = 0,70$$

4) dla wody rzeczywistej po wprowadzeniu dwutlenku chloru przed dezynfekacją chlorem badanej testem Ames przy użyciu szczepu TA100 bez aktywacji metabolicznej

$$f = 36,96 + 1256 *N\text{-org} \quad \text{l. rew./dm}^3$$

$$R^2 = 0,06 \text{ i } R^2 \text{ skorygowany} = -0,05$$

Po przeanalizowaniu wyników zauważono, iż współczynniki determinacji R^2 oraz R^2 - skorygowany dla modelu numer 4 były bardzo niskie i różne co do wartości, jak również

współczynnik regresji i wyraz wolny nie były istotne statystycznie, dlatego też ten model regresji wielorakiej nie był brany pod uwagę w dalszych analizach.

Pozostałe wstępne modele (1, 2, 3) poddano weryfikacji z wynikami mutagenności M uzyskanymi testem Ames z zastosowaniem szczepu TA100 bez aktywacji metabolicznej dla badanej w cyklu rocznym wody wodociągowej. W przypadku wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem i dezynfekowanej chlorem po dawkowaniu dwutlenku chloru wyniki mutagenności M obliczone przy użyciu funkcji matematycznych i na podstawie testu Ames wykazywały rozkład normalny oprócz mutagenności M przewidywanej przy zastosowaniu wstępnego modelu opartego na wynikach z wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem.

Ze względu na to, iż korelacja wyników pomiędzy mutagennością M, dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem po zadawkowaniu dwutlenku chloru, obserwowaną w teście Ames a przewidywaną modelami w żadnym badanym przypadku nie była istotna statystycznie, jak również była niska, dlatego też uznano, iż żaden z zaproponowanych wstępnych modeli regresji wielorakiej jak również model Vartiainena nie może być stosowany do przewidywania potencjalnej mutagenności uzdatnianej wody powierzchniowej dezynfekowanej chlorem po wcześniejszym dawkowaniu dwutlenku chloru.

W przypadku wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem korelacja pomiędzy mutagennością M przewidywaną modelem opartym o wyniki z wody modelowej dezynfekowanej chlorem była niska i nieistotna statystycznie ani z mutagennością M obserwowaną w teście Ames ani z mutagennością M przewidywaną pozostałymi modelami. Mimo, iż w badaniach na wodzie modelowej wykazano zależności pomiędzy wzrostem stężenia OWO, azotu amonowego i dawką chloru a wzrostem mutagenności M badanej testem *Salmonella* przy zastosowaniu szczepu TA100 bez frakcji, co również potwierdziły wyniki korelacji (które były dodatnie, wysokie lub dość wysokie i istotne statystycznie). W przypadku wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem mutagenność M obserwowana testem Ames skorelowana była dodatnio i dość wysoko a współczynnik korelacji był istotny statystycznie z mutagennością M przewidywaną modelem Vartiainena ($R=0,69$) i wstępnym modelem regresji wielorakiej opartym o wyniki z wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem ($R=0,83$). Jednocześnie współczynnik korelacji pomiędzy mutagennością M przewidywaną tymi modelami był również dodatni, dość wysoki ($0,84$) i istotny statystycznie stąd można by wnioskować, iż oba modele mogłyby być zastosowane do przewidywania potencjalnej mutagenności uzdatnionej wody powierzchniowej dezynfekowanej chlorem.

Jednakże należy zwrócić uwagę na kilka ważnych elementów, które wpłynęły na uzyskane wyniki i modele regresji i które mogą mieć znaczącą rolę przy interpretacji tych wyników:

- Woda powierzchniowa mimo stosowanych procesów uzdatniania polegających na obniżeniu zawartości domieszek i zanieczyszczeń jest środowiskiem o olbrzymiej ilości śladowych nie do końca zidentyfikowanych związków chemicznych, pozostających między sobą w różnych zależnościach zarówno synergistycznych jak również antagonistycznych, natomiast wstępny model regresji dopasowany na podstawie wyników z wody wodociągowej dezynfekowanej chlorem opisany funkcją $f = -1925 + 1336 \cdot Cl_2$ (l. rew./dm³) oparty był tylko na dawce chloru choć był dość wysoko skorelowany (0,83) z mutagennością M obserwowaną w teście Ames dla szczepu TA100 bez frakcji. Natomiast według modelu Vartiainena $f = A \cdot (1 - e^{-k \cdot [OWO] \cdot [Cl_2] \cdot (1 - NH_3)^2})$ wzrost stężenia w wodzie azotu amonowego powoduje obniżenie potencjalnej mutagenności M wody osiągając wartość 0 dla stężenia azotu amonowego równego 1,0 mgNH₄⁺/dm³. Czemu zaprzeczają wyniki uzyskane dla wody modelowej, w których wzrost zawartości OWO i stężenia azotu amonowego powodował wzrost dawki chloru i mutagenności M wody.

- Zateżnianie wody prowadzone na żywicach epoksydowych XAD, jak również odzysk zaadsorbowanych na żywicach związków nie jest 100% (w prowadzonych badaniach wynosił średnio około 80%), stąd też badana testem Ames mutagenność może być wyższa. Poza tym w trakcie procesów zateżniania dochodzi [...] do wzrostu stężeń poszczególnych związków chemicznych w próbce wody, w tym także i tych, które w stężeniach wykrywalnych w wodzie naturalnej nie są toksyczne, a w wyższych wykazują szkodliwość. Zateżnianie może także powodować zmiany w rozpuszczalności, zasoleniu, napięciu powierzchniowym ciśnieniu osmotycznym i lepkości. W zależności od przyjętej metody mogą być zatrzymywane określone grupy związków a „tracone” inne substancje np. lotne lub polarne, zachodzić także mogą wtórne reakcje chemiczne pomiędzy składnikami wody [113].

- Dodatkowo zależności i oddziaływanie pomiędzy zawartymi w wodzie związkami chemicznymi szczególnie w przypadku badania testem *Salmonella* tak złożonej próbki jaką jest woda rzeczywista może mieć wpływ na wyniki tego testu. Obecność w badanej próbce wody związków toksycznych, czy metali ciężkich może wywierać negatywny wpływ na bakterie *Salmonella typhimurium*.

Na podstawie przeprowadzonych na wodzie modelowej badaniach można potwierdzić część tezy pracy mianowicie, iż po procesie dezynfekcji wody chlorem powstają produkty

uboczne charakteryzujące się aktywnością mutagenną wykazaną testem Amesa przy zastosowaniu szczepu TA100 bez frakcji i istnieje możliwość prognozowania takiej potencjalnej mutagenności na podstawie zawartości ogólnego węgla organicznego i jonów amonowych. Jednakże uzyskany na podstawie wyników dla wody modelowej model regresji wielorakiej nie został potwierdzony na wodzie rzeczywistej, dlatego też nie może być przyjęty. Również model Vartiainena jak i model regresji oparty o wyniki dla wody rzeczywistej ze względu na podane powyżej ograniczenia nie mogą być stosowane do prognozowania potencjalnej mutagenności powierzchniowej wody do picia dezynfekowanej chlorem.

Ze względu na wykazywane pewne niedoskonałości w procedurach przygotowywania próbek wody [113] jak również w samych dostępnych analizach wykorzystywanych w celu określenia potencjalnej mutagenności wody do picia, jak również ze względu na skomplikowany i niejednorodny skład wody przed ewentualnym wprowadzeniem i stosowaniem do prognozowania potencjalnej mutagenności wody do picia modeli należałoby uwzględnić szereg parametrów wyznaczanych empirycznie.

Mimo rozwoju nauki na dzień dzisiejszy znane metody analityczne nie pozwalają na zidentyfikowanie części znajdujących się w wodzie związków chemicznych szczególnie ubocznych produktów chlorowania. Wiele badań genotoksyczności i mutagenności wykazało wysoką szkodliwość pojedynczych związków chemicznych. Jednakże woda jako środowisko o ogromnej różnorodności składników i zależności pomiędzy nimi powinna być traktowana jako całość. Dlatego też należy zwrócić szczególną uwagę na metody biologiczne tj. biomonitoring wykorzystujący materiał biologiczny (biowskaźniki, biotesty, bioczuJNIKI), które są lepsze od klasycznych metod analitycznych dzięki ich specyficzności, szybkości, możliwości zastosowania *in situ* jak również w układzie on-line pozwalają ocenić rzeczywisty wpływ na organizmy. Dodatkowo ich zastosowanie umożliwia dokonanie sumarycznego pomiaru oddziaływania próbki środowiskowej na organizmy żywe bez wstępnego przygotowywania próbek [175].

WNIOSKI

1) Na podstawie wyników z wody modelowej:

- Wzrost zawartości w wodzie OWO pochodzącego z obecności humusów naturalnych jak również wzrost stężenia azotu amonowego powodowały wzrost dawki chloru (podczas dezynfekcji wody chlorem jak również po wstępnym dawkowaniu dwutlenku chloru) a przez to wpływały na podwyższenie potencjalnej mutagenności badanej wody;
- Zastosowanie wstępnego utleniania dwutlenkiem chloru przed właściwą dezynfekcją wody chlorem skutkuje obniżeniem potencjalnej mutagenności wody mimo, że powstaje większa ilość ubocznych produktów chlorowania oznaczanych jako AOX oraz kwasy chlorooctowe MCAA, DCAA, TCAA;
- Niezależnie od wartości OWO i stężenia azotu amonowego badana woda modelowa nie wykazywała aktywności mutagennej po zastosowaniu w teście Amesa aktywacji metabolicznej;
- Po procesie dezynfekcji wody chlorem powstają produkty uboczne charakteryzujące się aktywnością mutageną wykazaną testem Amesa przy zastosowaniu szczepu TA100 bez frakcji;
- Istnieje możliwość prognozowania potencjalnej mutagenności wody modelowej o ściśle określonych parametrach na podstawie zawartości ogólnego węgla organicznego i jonów amonowych, ale nie według zaproponowanego przez Vartiainenę;
- W wodzie o zawartości OWO do $2,0 \text{ mgC/dm}^3$ i o stężeniu azotu amonowego nawet do $1,0 \text{ mgNH}_4^+/\text{dm}^3$ po dezynfekcji chlorem tworzące się uboczne produkty nie wykazywały potencjalnej aktywności mutagennej.

2) Na podstawie wyników dla wody rzeczywistej:

- Na podstawie wyników uzyskanych w cyklu rocznym dla wody rzeczywistej dezynfekowanej chlorem i wstępnie utlenianej dwutlenkiem chloru nie wykazano zależności pomiędzy zawartością OWO, stężeniem azotu amonowego, dawką chloru a potencjalną mutagennością wody obserwowaną w teście Amesa
- Wstępne utlenianie wody dezynfekowanej chlorem nie wpłynęło jednoznacznie na obniżenie potencjalnej mutagenności wody rzeczywistej mimo niższych wartości ubocznych produktów chlorowania oznaczanych jako AOX, HAA.
- Badanie wody rzeczywistej testem Amesa wykazało, iż mimo że spełnione były zgodnie z aktualnym Rozporządzeniem Ministra Zdrowia wymagania stawiane wodzie do picia to

woda wykazywała aktywność mutageną w teście Amesa zarówno przy zastosowaniu szczepu TA100 jak i TA98. Niezależnie od wartości OWO i stężenia azotu amonowego badana woda rzeczywista nie wykazywała aktywności mutagennej po zastosowaniu w teście Amesa aktywacji metabolicznej

- Nie można przyjąć modelu Vartiainen do prognozowania potencjalnej mutagenności wody powierzchniowej dezynfekowanej chlorem, również nie mogą być przyjęte do tego celu modele uzyskane w pracy na podstawie wyników z wody modelowej i rzeczywistej

3) W celu możliwości porównywania wyników uzyskanych testem *Salmonella* zaproponowano ujednolicony sposób przedstawiania i obliczania wyników jako mutagenność M (liczba rewertantów/dm³ próbki) i jako wskaźnik mutagenności MR, z podaniem informacji charakteryzujących dany szczep *Salmonella typhimurium* w warunkach testu

4) Spełnienie wymogów dotyczących jakości wody do picia zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, najprawdopodobniej nie gwarantuje bezpieczeństwa wody do picia z uwagi na możliwość jej potencjalnej mutagenności generowanej w procesie dezynfekcji

5) Rezultaty testów Amesa wspartych wybranymi podstawowymi analizami fizykochemicznymi i metodami analitycznymi nie mogą być podstawą do stworzenia modelu, do szybkiego określania bezpieczeństwa zdrowotnego (jakości zdrowotnej) wody do picia.

LITERATURA

- [1] *Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals*. Environmental Health Criteria 51. World Health Organization, Geneva 1985.
- [2] *Zastosowanie testów bakteryjnych w badaniach przesiewowych mutagenności wody do picia*. M. Wróbel, G. Kaćka, E. Jachimczak A. Trusz, Ogólnopolskie Seminarium Studentów i Doktorantów „Biotechnologia Środowiska, Wisła-Jarzębata, referat.
- [3] *Toksykologia*, W. Seńczuk i in., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- [4] *Biomonitoring mutagenności mikrozanieczyszczeń wody do picia*. T.M. Traczewska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2002.
- [5] *Modyfikacje testu Salmonella do oceny mutagenności pyłowych zanieczyszczeń powietrza atmosferycznego*. K. Piekarska, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej Wrocław 2008.
- [6] *Możliwość oceny jakości zdrowotnej wody do picia dezynfekowanej chlorem*. T. M. Traczewska, A. Trusz, PTMS Medycyna Środowiskowa, Kraków 2005.
- [7] *Toksyczne związki organiczne w ściekach i wodach powierzchniowych*, A. Żelechowska, Ochrona Środowiska 1(60)15-19, 1996.
- [8] *Wytyczne WHO dotyczące jakości wody do picia. Tom 1. Zalecenia*. PZiTS, Warszawa 1998.
- [9] *Badania wpływu jakości wody na powstawanie adsorbowanych chlorowcopochodnych związków organicznych (AOX)*, J. Czarniecka, A. M. Dziubek, J. Czarniecka, Ochrona, Środowiska, 2(29) 2007.
- [10] *Mikrozanieczyszczenia organiczne w wodach warszawskich wodociągów*, J. Dojlido, E. Zbieć, Ochrona Środowiska 3(50) 1993.
- [11] *Wpływ chlorowania na jakość zdrowotną wody do picia*, M. Pawlaczyk-Szpilowa, Ochrona Środowiska 1(45), 1992.
- [12] *In vitro potential genotoxic effects of surfach drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants*. L. Guzzella, S. Monarcha, C. Zani, D. Feretti, I.Zerbini, A. Buschini, P.Poli, C.Rossi, S.D.Richardson, Mutation Research 564 (179-193) 2004.
- [13] *Uboczne produkty utleniania domieszek wód*. J. Nawrocki, S. Biłozor, I. Kalkowska, Ochrona Środowiska 3(50), 1993.
- [14] *A review of recent epidemiologic studies reporting associations between drinking water disinfection and cancer. Water Chlorination: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. P.A. Murphy, G.F. Craun, Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1990.
- [15] *Drinking water mutagenicity in past exposure assessment of the studies on drinking water and cancer. Application and evaluation in Finlan*. M. Koivusalo, J. Jaakkola, T. Vartiainen, Environ. Res. 64 (90-101) 1994.
- [16] *Drinking water mutagenicity and cancer*. M.Koivusalo T., Publications of the National Public Health Institute, Division of Environmental Health, Kuopio, Finland, 1998.
- [17] *IARC Monograph of the evaluation of carcinogenic risk to humans „Chlorinated drinking water; chlorination by-products; some other halogenated compounds*, 52 1991.
- [18] *Aktywność mutagenna substancji występujących w środowisku*. A.Krogulski, M. Borkowska, A.Strusiński, T. Podsiadły Mat Konf. Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka, 113-119, 1999.
- [19] *Jakość zdrowotna wody przeznaczonej do picia*. M. Pawlaczyk-Szpilowa, Ochrona Środowiska 3(50) 1993.
- [20] *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater - 19th Edition*. A.D. Eaton, L.S. Clesceri, A.E.Greenberg, American Public Health Association, Washington 1995.
- [21] *Relations between drinking water mutagenicity and water quality parameters*. T.Vartiainen, A. Liimatainen, Chemosphere, 17 (1), (189-202) 1988.
- [22] *Application of a Finnish model to predict mutagenicity of drinking water–model research*, A. Trusz, T. M. Traczewska, Environmental engineering. Ed. by L. Pawłowski, M. Dudzińska, A. Pawłowski i in., Taylor and Francis, (207-211), London 2007.
- [23] *Oczyszczanie wody. Podstawy teoretyczne i technologiczne, procesy i urządzenia*. A. L. Kowal, M. Świdarska Bróż. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007
- [24] *Ochrona Środowiska 2006. Informacje i opracowania statystyczne*. Zbiorcze opracowanie GUS, Warszawa 2006
- [25] *Stan Środowiska w Polsce - na tle celów i priorytetów Unii Europejskiej. Raport Wskaźnikowy 2004*. Inspekcja Ochrony Środowiska, Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa 2006.
- [26] *Strategia Gospodarki Wodnej*. Ministerstwo Środowiska, Dokument przyjęty przez Radę Ministrów w dniu 13 września 2005 r., Warszawa 2005 r.
- [27] *Rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa z dnia 5 listopada 1991 r. w sprawie klasyfikacji wód oraz warunków, jakim powinny odpowiadać ścieki wprowadzane do wód lub do ziemi* - Dz.U. 1991 Nr 116 poz. 503

- [28] *Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 11 lutego 2004 r. w sprawie klasyfikacji dla prezentowania stanu wód powierzchniowych i podziemnych, sposobu prowadzenia monitoringu oraz sposobu interpretacji wyników i prezentacji stanu tych wód* - Dz.U. 2004 nr 32 poz. 284
- [29] *Wpływ bioróżnorodności środowiska wodnego na właściwości organoleptyczne wody*. T. M. Traczewska, *Ochrona Środowiska*, 4(27) 2005.
- [30] *Ocena potencjalnej mutagenności wody pitnej metodą biotestu*. Grant Nr 7T09D 02721. T.M. Traczewska, A. Biłyk, J. Czarniecka, K. Piekarska, A. Trusz, Raport SPR, Wrocław 2004.
- [31] *Chemia wód powierzchniowych*. J.R. Dojlido. Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok 1995
- [32] *Persistent organic contaminants in the environment: PAHs as case study in: Bioavailability of organic xenobiotics in the environment*. Maliszewska-Kordybach. NATO ASI series, Environment 2000
- [33] *Guidelines for Drinking-water Quality. Third edition, Vol. 1, Recommendations*. World Health Organization, Geneva 2004.
- [34] *Organic micropollutants in drinking water*. M.Fielding, T. Gibson., H. James, K. McLoughlin, C.Steel. Technical Report TR159 Water Research Centre, Marlow 1981 z: *Biomonitoring mutagenności mikrozanieczyszczeń wody do picia*. T.M. Traczewska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2002.
- [35] *Wirusy i ich występowanie w wodach i ściekach*. R. Kocwa-Haluch. Wydawnictwo Politechniki Świętokrzyskiej w Kielcach, Kielce 2001.
- [36] *Wirusologia w inżynierii środowiska. Podręcznik dla studentów wyższych szkół technicznych*. R. Kocwa-Haluch. Kraków 2002.
- [37] *Wirusologia lekarska podręcznik dla studentów medycyny*. Pod redakcją Leona Jabłońskiego. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1980.
- [38] *Wykaz chorób zakaźnych, których dotyczy współdziałanie między organami Państwowej Inspekcji Sanitarnej, Inspekcji Weterynaryjnej oraz Inspekcji Ochrony Środowiska*. Projekt Rozporządzenia z dnia 24 czerwca 2005 r. http://www.mz.gov.pl/wwwfiles/ma_struktura/docs/zal_pis_iw_ios_01072005.pdf
- [39] *Organizmy patogenne w osadach ściekowych*. Justyna Zamorska. Południowo-wschodni Oddział Polskiego Towarzystwa Inżynierii Ekologicznej z siedzibą w Rzeszowie, Polskie Towarzystwo Gleboznawcze-Oddział w Rzeszowie. Zeszyty Naukowe zeszyt 9 rok 2007, http://www.univ.rzeszow.pl/wbr/zeszyty/pl/issues/09/issue09_art011.pdf.
- [40] *Podstawowe informacje dotyczące norowirusów*. <http://www.gis.gov.pl/pdf/faq/norowirus.pdf>.
- [41] *Ostre biegunki wirusowe u dzieci*. Elżbieta Ołdak, Artur Sulik, Dorota Rożkiewicz, Mortada A. Al-Hwish Z Kliniki Obserwacyjno-Zakaźnej Dzieci Akademii Medycznej w Białymstoku *Wiadomości lekarskie* 2006 LIX, 534 Nr 7–8, http://slam.katowice.pl/wydawnictwa/wiadlek/7-8-2006/s534_Oldak_E.pdf.
- [42] *Pierwotniaki chorobotwórcze - Lamblia (Giardia intestinalis)*. Piotr Nowak. Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Krakowie Pracownia Parazytologii WSSE w Krakowie, http://www.wsse.krakow.pl/pages/wsse_document.php?nid=505&did=1940
- [43] *Pseudomonas aeruginosa- bakteria o dwóch twarzach*. Katarzyna Papierkowska. http://biot.ar.szczecin.pl/?id_strony=119&id_dzialu=41&parent=0
- [44] *Występowanie rotawirusów w środowisku wodnym*. Renata Kocwa-Haluch, Robert Michalec, *Ochrona Środowiska* 1(84), 2002
- [45] *Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions*. N.J. Asbolth. *Toxicology* 198, 229–238, 2004
- [46] *Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: Survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test*. L'aszl'ó Sujbert, Gergely R'acz, B'ela Szende, Heinz C. Schr'oder, Werner E. G. M'uller, G'eza T'or'ok. *Toxicology* 219, 106–112, 2006.
- [47] *Providing Safe Drinking Water in Small System*. J.A. Cotruvo, G.F.Craun, Hearne, N. (Eds.), 1999. Lewis Publishers, Boca Raton z: *Genotoxic potential of by-products in drinking water in relation to water disinfection: Survey of pre-ozonated and post-chlorinated drinking water by Ames-test*. L'aszl'ó Sujbert, Gergely R'acz, B'ela Szende, Heinz C. Schr'oder, Werner E. G. M'uller, G'eza T'or'ok. *Toxicology* 219, 106–112, 2006.
- [48] *Rola wskaźników pomocniczych w ocenie zdrowia ludzi obecnością oocyst Cryptosporidium w wodzie*. Bożena Toczyłowska, *Ochrona Środowiska*, 3(29) 2007.
- [49] *Die hygienisch-mikrobiologische Beurteilung von Trinkwasser*. D. Schoener. GWF Wasser-Abwasser, Nr. 2, 72-82, 1996 z: *Bezpieczeństwo sanitarne wody w wodociągach publicznych*. A. L. Kowal. *Ochrona Środowiska* 4 (83) 2001.
- [50] *Bezpieczeństwo sanitarne wody w wodociągach publicznych*. A. L. Kowal. *Ochrona Środowiska* 4 (83) 2001.
- [51] *Uboczne produkty dezynfekcji*. J. Dojlido w: *Uboczne produkty dezynfekcji wody-monografie*. Praca zbiorowa po kierunku J. Dojlido, Wydawnictwo Zarządu Głównego PZiTS, Warszawa 2002
- [52] *Uboczne produkty dezynfekcji wody*. E. Zbieć, J. R. Dojlido. *Ochrona Środowiska* 3 (74), Wrocław 1999.

- [53] *Formation of aldehydes upon ClO₂ disinfection*. A. Dąbrowska, J. Świetlik, J. Nawrocki. *Water Res.* 37 (5), 1161–1169, 2003.
- [54] *Uzdatnianie wody. Procesy chemiczne i biologiczne*. Praca zbiorowa pod redakcją Jacka Nawrockiego i Sławomira Biłozora. Wydawnictwo Naukowe PWN S.A., Warszawa-Poznań 2000.
- [55] *Potential health effects of drinking water disinfection by-products using quantitative structure toxicity relationship*. C.J. Moudgal, J.C. Lipscomb, R.M. Bruce. *Toxicology* 147, 109-131, 2000.
- [56] *National Research Council, Drinking Water and Health*. National Academy of Sciences, Washington, DC, 1977 w: Human cell mutagenicity of chlorinated and unchlorinated water and the disinfection byproduct 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX). N. W. Woodruff, J. L. Durant, L. L. Donhoffner, B. W. Penman, Ch. L. Crespi. *Mutation Research*, 495, 157–168, 2001.
- [57] *Human cell mutagenicity of chlorinated and unchlorinated water and the disinfection byproduct 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX)*. N. W. Woodruff, J. L. Durant, L. L. Donhoffner, B. W. Penman, Ch. L. Crespi. *Mutation Research*, 495, 157–168, 2001.
- [58] *Dezynfekcja wody dwutlenkiem chloru*. Mielczarek M. *Ochrona Środowiska*, nr 4(59), 1995.
- [59] *Związki azotowe i humusowe: uciążliwe domieszki wód podziemnych*. Maria Świdorska-Bróz, *Ochrona Środowiska*, 1(45), 1992.
- [60] *In vitro potential genotoxic effects of surfach drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants*, L. Guzzella, S. Monarca, C. Zani, D. Feretti, I. Zerbini, A. Buschini, P. Poli, C. Rossi, S. D. Richardson, *Mutation Research* 564, 179-193, 2004.
- [61] *Brominated oxidation by-products in drinking water treatment*. J. Nawrocki, S. Biłozor. *Water Supply Res Technol Aqua*, 46(6):304, 1997 w: *Formation of aldehydes upon ClO₂ disinfection*. A. Dąbrowska, J. Świetlik, J. Nawrocki. *Water Res.* 37 (5), 1161–1169, 2003.
- [62] *Determination of chlorinated pesticides in water by SPME/GC*. R. Boussahel, S. Bouland, K.M. Moussaoui i inni. *Water Research*, 36 (7) 2000.
- [63] *Formation of halogenated organics by chlorination of water supplies*. J. C. Morris, G. McKay. US EPA, Washington 1975 w: *Ubozne produkty dezynfekcji wody*. E. Zbieć, J. R. Dojlido. *Ochrona Środowiska* 3 (74) 1999.
- [64] *Disinfection by-products in Finnish drinking water*. T.K. Nissinen, I.T. Miettinen, P.J. Martikainen, T. Vartiainen, Pergamon, *Chemosphere* 48 (9-20) 2002.
- [65] *Humic substances as precursors for potentially harmful disinfection by-products*. P.C. Singer, Pergamon, *Water Sciencic Technology*, 49(9), 25-30, 1999.
- [66] *Determination of Chlorine Dioxide, Chlorine, Chlorite and Chlorate in Water*. E.M. Aieta, P.V. Roberts, M. Hernandez. *Journal AWWA*, 76 (1) 1984.
- [67] *Dezynfekcja wód infiltracyjnych dwutlenkiem chloru na przykładzie MPWiK w Oświęcimiu*. H.Dera, *Ochrona Środowiska*, 4(59), 1995.
- [68] 1. *Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps*. C. Zani, D. Feretti, A. Buschini, P. Poli, C. Rossi, L. Guzzella, F. Di Caterino, S. Monarca. *Mutation Research* 587, 26–37, 2005.
- [69] 2. *Dezynfekcja wody dwutlenkiem chloru—doświadczenie Zakładu Wodociągu Praskiego*. A. Mossakowska. *Ochrona Środowiska*, nr 4(75), 1999.
- [70] 3. *Final draft of the drinking water criteria document on chlorine dioxide, chlorite, and chlorate*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1994 z: *Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps*. C. Zani, D. Feretti, A. Buschini, P. Poli, C. Rossi, L. Guzzella, F. Di Caterino, S. Monarca. *Mutation Research* 587, 26–37, 2005.
- [71] 4. *Determination of chlorate and chlorite and mutagenicity of seafood treated with aqueous chlorine dioxide*. J. Kim, M.R. Marshall, W.X. Du, W.O. Otwell, C.I. Wei, J. Agric. *Food Chem.* 47, 3586–3591, 1999.
- [72] 5. *Reaction of chlorine dioxide with aminoacids and peptides: kinetics and mutagenicity studies*. H.K. Tan, W.B. Wheeler, C.I. Wie. *Mutation Research* 188, 259–266, 1987 z: *Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps*. C. Zani, D. Feretti, A. Buschini, P. Poli, C. Rossi, L. Guzzella, F. Di Caterino, S. Monarca. *Mutation Research* 587, 26–37, 2005.
- [73] *chlorine dioxide*, EPA_pdf
- [74] *Trihalomethanes formation in water treated with chlorine dioxide*. Jun Wen Li, Yu Z., Cai X., Gao M., Chao F. *Water Research*, 30 (10), 2371-2376, 1996.
- [75] 6. *Bioadsorber efficiency, design, and performance forecasting foralachlor removal*. B.N. Badriya, V. Ravindran, W. Den, M. Pirbazari. *Water Res.* 37, 4051–4072, 2003.
- [76] 7. *Assessment on the removal of organic chemicals from raw and drinking water at a Llobregat river water works plant using GAC*. F. Paune, J. Caixach, I. Espadaler, J. Om, J. Rivera. *Water Res.* 32, 3313–3324, 1998 z: *Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps*.

- C. Zani, D. Feretti, A. Buschini, P. Poli, C. Rossi, L. Guzzella, F. Di Caterino, S. Monarca. *Mutation Research* 587, 26–37, 2005.
- [77] 8. *Adsorption of natural organic matter oxidized with ClO₂ on granular activated carbon*. J. Świetlik, U. Raczyk-Stanisławiak, S. Bilozor, W. Ilecki, J. Nawrocki. *Water Res.* 36, 2328–2336, 2002
- [78] *Unit processes in drinking water treatment*. W.J. Masschelein. New York: Marcel Dekker Inc. 32–65, 1992.
- [79] *Multispectral identification of chlorine dioxide disinfection byproducts in drinking waters*. S.D. Richardson, A. D. Thruston, T.W. Collette, K.S. Patterson, B.W. Lykins, G. Majetich, Y. Zhang. *Environmental Science & Technology*, 28(4), 592-599, 1994.
- [80] Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz.U. 2007 nr 61 poz. 417).
- [81] http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html#d_dbps
- [82] *Zastosowanie dwutlenku chloru w dezynfekcji wody skażonej przez Legionellę*. E. Ferretti, Wyższy Instytut Zdrowia Sekcja Higieny Wód Śródlądowych, Seminarium “Legionella: pobieranie próbek, monitoring i dezynfekcja wody” Warszawa, 11-12.07.2007, Umowa Twinningowa PL2005/IB/EN/03, WHO, USEPA,
- [83] Rozporządzenie o wodzie do picia –Trinkwasserverordnung – TrinkkwV 2001.
- [84] 9. ewent 30 *Rozkład organicznych zanieczyszczeń wody w procesach pogłębionego utleniania*. J. Wąsowski, A. Piotrowska. *Ochrona Środowiska*, nr 2(85), s. 25, 2002.
- [85] *Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water*. J.R. Meier. *Mutation Res.* 96(211) 1988.
- [86] *Formation of mutagens and chemicals during water treatment chlorination*. M. Fielding, H. Horth, *Wat. Supply*, 4(103) 1986.
- [87] *The relationship between TOX formation and spectra changes accompanying chlorination of pre-concentrated of fractionated NOM*. L. Chiwang, M. Marh, G. Benjamin, V. Korshin, *Water Research*, 36 (13), 2002.
- [88] *Identity and yields of major halogenated products of aquatic fulvic acid chlorination*. R.F. Christman, D.L. Norwood, D.S. Millington, J.D. Johnson, *Environ. Sci. Technol.* 17(10), 625–628, 1983.
- [89] *The occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters*. T.A. Bellar, J.J. Lichtenberg, R.C. Kroner., *J. Am. Water Works Assoc.* 66(12), 703–706, 1974 z: *Disinfection by-products in Finnish drinking waters*. T.K. Nissinen, I.T. Miettinen, P.J. Martikainen, T. Vartiainen, *Chemosphere* 48 (9–20), 2002.
- [90] *Concentrations of Ames mutagenic chlorohydroxyfuranes and related compounds in drinking waters*. J. Hemming, B. Holmbom, M. Reunanen, L. Kronberg, *Chemosphere*, 15 (549-556), 1986, w: Smeds A., Terttu Vartiainen, Jorma Maki-Paakanen, Leif Kronberg:, *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1033-1039). 1997 z: *Biomonitoring mutagenności mikrozanieczyszczeń wody do picia*. T.M. Traczewska. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2002.
- [91] *The impact of bromine on the formation of neutral and acidic disinfection by-products (DBPs) in Mediterranean chlorinated drinking water*. A. Adamantia, Kampioti, G. Eurypides, Stephanon, *Water Research*, 36 (10), 2002.
- [92] *High levels of mutagenic activity in chlorinated drinking water in Finland*. T. Vartiainen, A. Liimatainen, *Mutat. Res.*, 168 (29-34), 1986.
- [93] *Drinking water mutagenicity and gastrointestinal and urinary tract cancers: An ecological study in Finland*. M. Koivusalo, J. Jaakkola, T. Vartiainen, T. Hakulinen, S. Karjalainen, E. Pukkala, J. Tuomisto, *J. Am., Public Health*, 84(8), 1223-1228, 1994.
- [94] *Drinking water mutagenicity and leukemia, lymphomas, and cancers of the liver, pancreas, and soft tissue*. M. Koivusalo, T. Vartiainen, T. Hakulinen, E. Pukkala, J. Jaakkola, *Arch. Environ. Health*, 50(4), 269-276, 1995.
- [95] *Drinking water mutagenicity in past exposure assessment of the studies on drinking water and cancer. Application and evaluation in Finland*. M. Koivusalo, J. Jaakkola, T. Vartiainen, *Environ. Res.* 64, 90-101, 1994.
- [96] *Drinking water mutagenicity and cancer. Publications of the National Public Health Institute*. M. Koivusalo, Division of Environmental Health, Finland, 1998.
- [97] *Concentrations of Ames mutagenic chlorohydroxyfuranones and related compounds in drinking water*. A. Smeds, T. Vartiainen, J. Maki-Paakkanen, L. Kronberg, *Environ. Sci. Technol.*, 31, 1033-1039, 1997.
- [98] *Organic micropollutants in drinking water*. M. Fielding, T. Gibson, H. James, K. McLoughlin, C. Steel:, *Technical Report TR159*, Water Research Centre, 1981.
- [99] *Rakotwórcza woda. Substancje chemiczne, bakterie oraz choroby przenoszone z wodą*. Barbara Mikołajczak. Hydropure Polska Spółka z o.o. Wrocław, 1997.
- [100] *Odnowa wody*. A. L. Kowal, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 1996.
- [101] Complete List of Agents evaluated and their classification, 2006; <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
- [102] *Występowanie kwasów halogenooctowych (HAA) podczas uzdatniania wody w Wodociągu Centralnym w Warszawie*, J. Dojlido, U. Dmitriuk, M. Żmigrodzka, B. Zaleska, 26(1), 2004,

- [103] *Analiza wpływu jakości wody na dawkę dwutlenku chloru*, Jacek Wąsowski, *Ochrona Środowiska*, 4(83), 2001.
- [104] *Nowotwory złośliwe w województwie Dolnośląskim w roku 2003. Dolnośląski rejestr nowotworów*. J. Błaszczyk, M. Pudełko, K. Cisar, Wrocław 2005. <http://www.wcss.wroc.pl/~jurekbe/BIUL2003.pdf>
- [105] *Effect of ozonation on mutagenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons*. B. Fouillet, P. Chambon, R. Chambon, M. Castegnaro, N. Weill, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1, 1-8., 1991.
- [106] *Water distribution systems, a new source of mutagens in drinking waters*. D.J. Schwartz, I. Saxena, F.C. Kopfler, *Environ. Sci. Technol.* 13, 1138–1141, 1979 z: Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. C. Zani, D. Feretti, A. Buschini, P. Poli, C. Rossi, L. Guzzella, F.D. Caterino, S. Monarca. *Mutation Research* 587, 26–37, 2005.
- [107] *Toxicology and Chemical Safety*. Tarkowski S., *Acta Poloniae Toxicologica*, 5(1), 1997.
- [108] *Ocena metodą Amesa mutagennego i rakotwórczego działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wodach naturalnych*. T. M. Traczewska, *Bromat. Chem. Toksykol.*, XXIV, 2, 157-161, 1991.
- [109] *Changes of toxicological properties of biodegradation products of anthracene and phenanthrene*. T.M. Traczewska, *Water Science and Technology*, 41(12), 31-38, 2000.
- [110] *Zarys toksykologii*. Pod redakcją J. Namieśnika i J. Jaśkowskiego, Wyd. Eko-Phama, Gdańsk 1995.
- [111] *Wybrane krótkoterminowe testy bakteryjne i na organizmach eukariotycznych, stosowane do oceny genotoksyczności środowiskowych zanieczyszczeń chemicznych*. H. Czeczot, I. Rahden-Staroń. *Rocznik PZH*, 48 (317-336) 1997.
- [112] *Methods of examination of genotoxicity of atmospheric pollutants*. P. Jadczyk, *Environmental Protection Engineering*, 29(3-4), 97-111, 2003.
- [113] *Testy genotoksyczności wody-możliwości i ograniczenia*. M. Łebkowska, M. Załęska-Radziwiłł, *Mat. Konf. „Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka”*, 120-123, 1999.
- [114] *An improvement of the Ames test using modified human liver S9 preparation*. A. Hakura, S. Sathoshi, S. Satoru, T. Satoh, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 46, 169-172, 2002.
- [115] *Effect of microsomal fraction induction on the detectability of mutagenic air pollutants by means of the Ames bacterial mutagenicity test*. K. Piekarska, J. Karpińska-Smulikowska, *Environment Protection Engineering*, 32(4), 15-23, 2006.
- [116] *Ekotoksykologia. Toksyczne czynniki środowiskowe i metody ich wykrywania*. A. Sadowska, G. Obidowska, M. Rumowska, Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2000.
- [117] *Mikrobiologia ogólna*. H. G. Schlegel, PWN Warszawa, 2003.
- [118] *In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemical*. M. Hayashi, E. Kamata, A. Hirose, M. Takahashi, T. Morita, M. Ema, *Mut. Reserch*, 588(2), 129-135, 2005.
- [119] *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity test*. K. Mortelmans, E. Zeiger, *Mut. Research*, 455, 29-60, 2000.
- [120] *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*. D.M. Maron, B.N. Ames, *Mutat. Research*, 113, 1983.
- [121] *Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test*. B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, *Mutat. Research*, 1975.
- [122] *Mutagenic potential of drinking waters from surface supplies in northern Italy*. S. Galassi, L. Guzzella, S. Sora, *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 109–116, 1989.
- [123] *Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water*. J.R. Meier, *Mutat. Res.* 196, 211–245, 1988.
- [124] *Mutagenicity of extracts of lake drinking water treated with different disinfectants in bacterial and plant test*. S. Monarca, A. Zanardini, D. Feretti, A. Dalmiglio, E. Falistocco, P. Manica, G. Nardi, *Water Res.* 32, 2689–2695, 1998 w: Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. C. Zani, D. Feretti, A. Buschini, P. Poli, C. Rossi, L. Guzzella, F. Di Caterino, S. Monarca. *Mutation Research* 587, 26–37, 2005.
- [125] *Methods applied in assessment of drinking water mutagenicity results*. A. Trusz-Zdybek, A. Kamińska, T. M. Traczewska, K. Piekarska, *Polish Journal of Environmental Studies*, 16(2A/2), 227-233, 2007.
- [126] *Sposoby przedstawiania i wybrane metody analizy wyników uzyskiwanych testem Ames*. A. Trusz, A. Chmielecka, T. M. Traczewska, B. Kosyk, *Interdyscyplinarne zagadnienia w inżynierii i ochronie środowiska*, Oficyna Wydaw. P.Wroc, 350-360, Wrocław 2006.
- [127] *Mutagenicity of airborne particles as an indicator of air quality. Guidelines for routine monitoring of mutagenicity of airborne particles*. D. Mielżyńska, E. Siwińska, L. Kapka. *Institute of Occupational Medicine and Environmental Health, Sosnowiec* 2002.
- [128] *Elektroniczny Podręcznik Statystyki PL*. StatSoft, Krakow, 2006. <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>.
- [129] *Raport statystyczny*, A. Kamińska, 2007, praca niepublikowana.

- [130] *Statystyczna analiza danych*. Kamińska Agnieszka, Maciąg Henryk, Interdyscyplinarne zagadnienia w inżynierii i ochronie środowiska. Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej. Studia i Materiały, ISSN 0084-2877) 58-72, Wrocław 2006.
- [131] *Jak pokochać statystykę, czyli Statistica do poduszki*. T. Zieliński, ISBN 83-904735-7-7, Kraków 1999.
- [132] *Metody opisu statystycznego*. W. Makać, D. Urbanek-Krzysztofiak, ISBN 83-7326-257-1, Gdańsk 2004.
- [133] *Modele i metody statystyki matematycznej*. Magiera R. Oficyna Wydawnicza GiS, Wrocław 2002.
- [134] *An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test*. L. Berstein, J. Kaldor, J. McCann, M.C. Pike, Mutation Res., 97, 267-281, 1982.
- [135] *Statistical analysis of the Ames Salmonella/microsome test*. B. Margolin., N. Kaplan, E. Zeiger.. Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 3779, 1981.
- [136] *A generalization of the Poisson distribution*. P. Consul, G. Jain, Technometric, 15, 791.
- [137] *Statistical methods for the Salmonella assay: a review*. B.S. Kim, B.H. Margolin, Mutation Research 436, 113-122, 1999.
- [138] *Mathematical analysis of mutation induction kinetics. in Chemical mutagens, Principles and Methods for Their Detection* R.H. Haynes, F. Eckardt, Plenum, New York, 6(271), 1980.
- [139] *Extra-Poisson variation variation in log-linear models*. N. E. Breslow, Appl.Stat., 33, 38-44, 1984.
- [140] *Modeling the Ames test*. A. Stead, V. Hasselblad, J. Creason, L. Claxton, Mutation Res., 85, 13-27, 1981.
- [141] *Modelling the Ames Salmonella/microsome assay*. D. Krewski, S. R. Leroux, L. H. Bleuer, L.H. Broekhaven, Biometric 49, 499-510, 1993.
- [142] *Assesing mutagenicity of textile dyes from Pali (Rajasthan) using Ames bioassay. Applied Ecology and Environmental research*. N.M. Athur, P.B. Hatnagar, P.B. Akre, 4(1), Budapest, Prepared for the IPCS by the International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, 111-118, 2005.
- [143] *Metody wnioskowania statystycznego*. A. Balicki, W. Makać, ISBN 83-7326-056-0, Gdańsk, 2004.
- [144] *Badania statystyczne. Regresja wieloraka*. Anna Zamojska, Katedra Ekonometrii UE, Studium podyplomowe, 2007, <http://wzr.pl/~azamojska>.
- [145] *The occurrence of disinfection by-products in US drinking water*. S. Krasner, M. McGuire, J. Jacangelo, N. Patania, K. Reagan, E. Aieta, Am. J. Water Works Assoc. 81, 41-53, 1989.
- [146] *By-products of chlorination at ten operating utilities. Environmental Impact and Health Effects*. A. Stevens, L. Moore, C. Slocum, B. Smith, D. Seeger, J. Ireland, 6(45), Lewis Publishers, Chelsea, MI, 1990.
- [147] *Water chlorination, mutagenicity, and cancer epidemiology*. K.P. Cantor, Am. J. Public Health 84(8), 1211-1213, 1994.
- [148] *Correlations between trihalomethanes and total organic halides formed during water treatment*. P. Singer, S. Chang, J. Am. Water Works Assoc. 81, 61-65, 1989.
- [149] *Nonvolatile mutagens in drinking water: Production by chlorination and destruction by sulfite*. A. Cheh, J. Skochdopole, P. Koski, L. Cole.: Science 207, 90-92, 1980.
- [150] *Importance of sample pH recovery of mutagenicity from drinking water by XAD resins*. H.P. Ringhand, J.R. Meier, F.C. Kopfler, K.M. Schenck, Kaylor, D.E. Mitchell.: Environ. Sci. Technol. 21(4), 382-387, 1987.
- [151] *Application of a finnish mutagenicity model to drinking waters in the U.S*. K.M. Schenck, L.J. Wymer, B.W. Lykins, R.M. Clark, Chemosphere, 37(3), 451-464, 1998.
- [152] *Dezynfekcja wody pitnej*. W. Roeske, przekład: J. Dziurka, A. Hodowańska, Oficyna Wydawnicza PROJPRZEMEKO, Bydgoszcz 2007.
- [153] *Analiza wody i ścieków*. T. L. Wierzbicki, Wydaw. Politechniki Białostockiej, Białystok 1997.
- [154] *Ćwiczenia laboratoryjne z chemii wody. B. i E. Gomółkowie*, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998.
- [155] *Genotoksyczność organicznych zanieczyszczeń wody – perspektywy badań*. T. Podsiadły, Mat. Konger., „Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka”, Częstochowa-Jaszowiec, 97-111, 2000.
- [156] *Występowanie zanieczyszczeń o właściwościach mutagennych i rakotwórczych w wodzie rzeki Odry*. B. Kołwzan, T. M. Traczewska, Ochrona Środowiska, 3-4(54-55), 1994.
- [157] *The Salmonella mutagenicity of water and sediments from the Porsuk River in Turkey*. M. Kutlu, G. Aydoğan, F. Susuz, A. Özata, Environmental Toxicology and Pharmacology 17, 111-116, 2004.
- [158] *Salmonella mutagenicity analysis of water samples from Çamaltı saltern*. M. Kutlu, M. B. Mutlu, G. Aydoğan, K.Güven, Environ Monit Assess, 145, 237-241, 2008.
- [159] *Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the Salmonella assay and different water extraction procedures*. G. Umbuzeiro, D. A. Roubicek, C. M. Rech, M. Inees, Z. Sato, L.D. Claxton, Chemosphere 54, 1589-1597, 2004.
- [160] *Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents*. L. M. Hewitt, C.H. Marvin, Mutation Research, 589,208-232, 2005.

- [161] *Wykrywanie substancji genotoksycznych w wodach naturalnych i uzdatnionych*. K. Piekarska, B. Kołwzan, T.M. Traczewska, W. Adamiak, Mat. XV Symp. JAWQ NT Badania toksykologiczne w ochronie wód PKMSJW, Warszawa, 1995.
- [162] *Zastosowanie testu Umu w badaniach genotoksyczności zanieczyszczeń wody*. T. Podsiadły, A. Krogulski, M. Borkowska, A. Strusiński, Mat. Konf. II Forum Inżynierii Ekologicznej, Warszawa 1998.
- [163] *Ocena przydatności wybranych testów bakteryjnych do badań genotoksyczności wody pitnej*. T. Podsiadły, A. Krogulski, M. Borkowska, A. Strusiński, Mat. Konf. „Mikrozanieczyszczenia w Środowisku Człowieka”, Częstochowa-Jaszowiec, 1999.
- [164] *Halogenated derivatives QSAR model using spectral moments to predict haloacetic acids (HAA) mutagenicity*. A. Pe´rez-Garrido, M. Pe´rez Gonza´lez, A. Garrido Escuderoa, Bioorganic & Medicinal Chemistry 16, 5720–5732, 2008.
- [165] *Uboczne produkty utleniania i dezynfekcji wody-doświadczenia ostatnich 30 lat*. J. Nawrocki, Ochrona Środowiska, 27(4), 2005
- [166] *Oznaczanie halogenoacetonitryli w wodzie do picia*. E. Zbieć, J. Dojlido, Ochrona Środowiska, 4(83), 2001.
- [167] *Haloacetonitriles vs. Regulated haloacetic acid: Are nitrogen-containing DBP-s more toxic?* M.G. Muellner, E.D. Wagner, K.N.Mc. Calla, S.D.Richardson, Y.-T. Woo, M.J. Plewa, Environ. Sci. Technol., 41, (645-651), 2007 z: Nitrozoaminy–uboczne produkty dezynfekcji wody. J. Nawrocki, Ochrona Środowiska, 3(29), 2007
- [168] *Nitrozoaminy–uboczne produkty dezynfekcji wody*. J. Nawrocki, Ochrona Środowiska, 3(29), 2007.
- [169] *Characterization of new nitrosamines in drinking water using liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Y.-Y. Zhao, J. Boyd, S.E. Hrudey, X.F. Li, Environ. Sci. Technol., 40(24), 7636-7641, 2006 z: Nitrozoaminy–uboczne produkty dezynfekcji wody. J. Nawrocki, Ochrona Środowiska, 3(29), 2007.
- [170] *The reactions of chlorine dioxide with aquatic organic materials and their health effects*. C. Rav-Acha, Water Res., 218, 1329, 1984 z: Uboczne produkty utleniania i dezynfekcji wody – doświadczenia ostatnich 30 lat. J. Nawrocki, Ochrona Środowiska 4(27), 2005.
- [171] *Identyfikacja nowych produktów dezynfekcji wody z ozonu, chloru, dwutlenku chloru, chloraminy i chloru*. S.D. Richardson, A.D. Thurston, T.V. Caughran, P.H. Chen, T.W. Collette, K.M. Schenk, B.W.Lykins, C. Rav-Acha, V. Glezer, Water, Air, Soli Pollut., 123, 95, 2000 z: Uboczne produkty utleniania i dezynfekcji wody – doświadczenia ostatnich 30 lat. J. Nawrocki, Ochrona Środowiska 4(27), 2005.
- [172] *Tribromopyrrole, brominated acids, and other disinfection by-products produced by disinfection of drinking water rich in bromide*. S.D. Richardson, A.D. Thurston, C. Rav-Acha, L.Groisman, O. Juraev, V. Glezer, A.B. McKague, M.J. Plewa, E.D. Wagner, Env. Sci. Technol. 37, 3782, 2003. Z: Uboczne produkty utleniania i dezynfekcji wody – doświadczenia ostatnich 30 lat. J. Nawrocki, Ochrona Środowiska 4(27), 2005.
- [173] *Multispectral identification of chlorine dioxide disinfection byproducts in drinking water*. S.D. Richardson, A.D. Thurston, T.W. Collette, K.S. Patterson, B.W.Lykins, G. Majetich, Y. Zhang, Env. Sci. Technol. 28, 592, 1994 z: Uboczne produkty utleniania i dezynfekcji wody – doświadczenia ostatnich 30 lat. J. Nawrocki, Ochrona Środowiska 4(27), 2005.
- [174] *Biodegradability of organic by-products after natural organic matter oxidation with ClO₂-case study*. U. Raczyk-Stanisławiak, J. Świetlik, A. Dąbrowska, J. Nawrocki, Water Res. , 38, 1044, 2004.
- [175] *Zastosowanie biotestów w badaniach środowiskowych*. A. Kuczyńska, L. Wolska, J. Namieśnik, http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/CEEAM_ksiazka_polska/Rozdzialy/rozdzial_032.pdf.