

Magdalena OLAK-KUCHARCZYK, Stanisław LEDAKOWICZ

e-mail: magdalena.olak@p.lodz.pl

Katedra Inżynierii Bioprocessowej, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

Wpływ zaawansowanego utleniania na toksyczność związków fenolowych**Wstęp**

Toksyczność jest jednym z parametrów charakteryzujących jakość ścieków, i jest ona często powiązana z obecnością w nich różnego rodzaju związków organicznych

Fenole są przykładem związków, które oprócz właściwości toksycznych wykazują również działanie mutagenne. Oddziaływanie tych związków na organizmy żywe zależne jest m.in. od ich stężenia i czasu ekspozycji.

Fenylofenole (*orto*-, *meta*- i *para*-fenylofenol) są pochodnymi bifenylu, w których grupa hydroksylowa przyłączona jest do pierścienia aromatycznego w różnych pozycjach. Związki te posiadają właściwości endokrynne, przejawiające się w aktywności estrogennej i antyandrogennej [Paris *i in.*, 2002; Krüger *i in.*, 2008; Sun *i in.*, 2008], co oznacza że mogą zakłócać działanie zarówno męskiego jak i żeńskiego układu hormonalnego. Ponadto, *o*-PP posiada właściwości kancerogenne i genotoksyczne [Sasaki *i in.*, 1997; Nunoshiba *i in.*, 2007]. Badania wykazały, że *o*-PP i jego sole mogą powodować m.in. raka pęcherza moczowego u samców szczurów. Związki te są metabolizowane w wątrobie m.in. do fenylohydrochinonu, który jest odpowiedzialny za powstawanie zmian rakotwórczych i działanie toksyczne [Balakrishnan *i Eastmond*, 2006]. *o*-PP działa toksycznie na wiele organizmów wodnych i bakterii [Curtis *i in.*, 1982; Schultz, 1987; Broderius *i in.*, 1995; Ramos *i in.*, 1999], ponadto wykazuje on niską toksyczność ostrą w stosunku do myszy, szczurów i kotów, LD_{50} dla tych zwierząt zawiera się w przedziale 500÷3000 mg/kg masy ciała [Stouten, 1998].

Fenylofenole w środowisku wodnym są szeroko rozpowszechnione, a ich stężenie zawiera się w przedziale od 0,0021 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ [Jonkers *i in.*, 2009] do 2,506 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ [Peng *i in.*, 2008]. Przy zastosowaniu konwencjonalnych metod oczyszczania ścieków usuwane są znaczne ilości tych związków, np. degradacja z udziałem osadu czynnego prowadzona przez 14 dni pozwala na ponad 80% obniżenie początkowego stężenia *o*-PP (Yu *i in.*, 2006). Jednakże, po zastosowaniu tej metody, w strumieniu oczyszczanych ścieków pozostaje nadal wystarczająca ilość związku, aby zaburzać działanie układu hormonalnego. Dlatego należy zastanowić się nad zastosowaniem takiej metody degradacji, która w sposób efektywniejszy usuwa związki obecne w ściekach w bardzo niskich stężeniach. Dobrym rozwiązaniem może być zastosowanie procesów zaawansowanego utleniania.

Pogłębione utlenianie znajduje zastosowanie do oczyszczania ścieków przemysłowych i socjalno-bytowych, jak również odcieków ze składowisk odpadów [Ledakowicz *i in.*, 2002]. Procesy te są również stosowane do uzdatniania wody gruntowej i powierzchniowej m.in. do celów spożywczych jak również przemysłowych (np. w przemyśle elektronicznym). Za pomocą AOPs degradowane są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [Ledakowicz *i in.*, 1999; Ledakowicz *i in.*, 2001], a także związki zaliczane do EDCs [Błędzka *i in.*, 2010; Gryglik *i in.*, 2010].

Celem niniejszej pracy było porównanie efektywności usunięcia izomerów fenylofenolu z roztworów wodnych podczas procesu: fotolizy w polu promieniowania UVC i zaawansowanego utleniania w układzie $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, a w szczególności sprawdzenie toksyczności względem mikroorganizmów roztworów poreakcyjnych.

Badania doświadczalne**Materiały**

o-PP (czystość $\geq 98,0\%$) i *p*-PP ($> 98\%$) zakupiono w firmie Fluka. *m*-PP (85%) nabyto w firmie Sigma-Aldrich i stosowano po uprzedniej rekrytalizacji z metanolu (POCh). Nadtlenek wodoru

oraz odczynniki wykorzystane do sporządzenia buforów (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , cz.d.a.) zakupiono w firmie POCh. Roztwory reakcyjne przygotowywano w wodzie destylowanej oczyszczonej przy użyciu aparatu firmy Millipore (Milli-Q Plus System o oporności 18 $\text{M}\Omega/\text{cm}$).

Aparatura i metodyka

Roztwory wyjściowe izomerów PP bez lub z dodatkiem H_2O_2 naświetlano przy użyciu niskociśnieniowych lamp UVC firmy USHIO w probówkach kwarcowych ($v = 10\text{ml}$) umieszczonych w urządzeniu karuzelowym.

Postęp reakcji rozkładu izomerów fenylofenolu badano przy zastosowaniu wysokosprawnego chromatografu cieczowego (HPLC) firmy Waters (kolumna Symetry C18 Cartridge 4 μm , 3,9 mm x 150 mm), posiadającego detektor UV-VIS. Do analizy stężenia niniejszych związków zastosowano metodę izokratyczną. Szczegółowy opis prowadzonych doświadczeń zamieszczono w pracy Olak *i Miller* [2011].

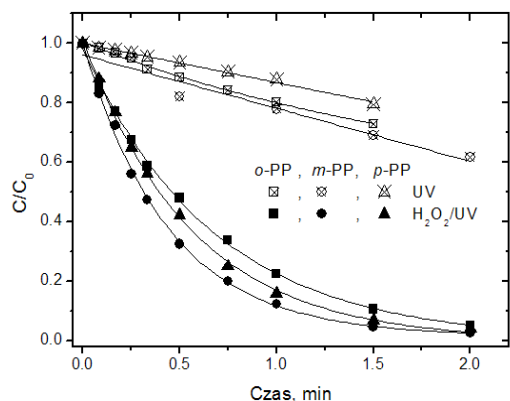
Badania toksyczności wykonano na spektrofotometrze DR/2000 firmy HACH przy zastosowaniu metody ToxTrakTM opracowanej przez firmę HACH [HACH DR/2000]. Toksyczność oznaczano względem mikroorganizmów wskaźnikowych: bakterii *Escherichia coli*, które przed każdym kolejnym badaniem zostały przeszczepione na świeże podłoże i namnożone w odpowiednich warunkach.

Procedura badawcza była następująca: do specjalistycznych probówek szklanych zakręcanych korkiem dodawano kolejno odpowiednio 5 ml roztworu reakcyjnego lub wody zdemineralizowanej (w przypadku próby kontrolnej niezawierającej związków toksycznych), poduszeczkę z resazuryną (ToxTrak Reagent Powder Pillow, HACH), dwie krople roztworu akceleratora (Accelerator Solution, HACH), 0,5 ml wcześniej przygotowanego inokulum bakterii *E. coli*, zakręcano korkiem i mieszano a następnie sprawdzano absorbancję roztworu przy długości fali 603 nm. Po odczytaniu absorbancji czekano ok. 45÷75 min, aż wartość absorbancji próby kontrolnej spadnie o $0,6\pm 0,1$, po czym powtórnie mierzono absorbancję próby zawierające roztwór reakcyjny. Badania toksyczności każdego roztworu wykonywano w czterech powtórzeniach.

Wyniki i dyskusja

Zanik izomerów PP podczas naświetlania roztworów reakcyjnych promieniowaniem UVC zachodził dość szybko (Rys. 1). 20% spadek stężenia początkowego *o*-PP, *m*-PP i *p*-PP nastąpił już po czasie odpowiednio 60, 53 i 90 s. Ten stopień degradacji został osiągnięty w wyniku ekspozycji roztworów reakcyjnych na dawki promieniowania o energii wynoszącej 1907 J/m^2 , 1685 J/m^2 i 2861 J/m^2 odpowiednio dla *o*-PP, *m*-PP i *p*-PP. Dawka promieniowania UV stosowana powszechnie do dezynfekcji wody jest równa 400 J/m^2 [Cannonica *i in.*, 2008], co oznacza, że izomery PP nie będą całkowicie usunięte ze strumienia wody podczas procesu jej dezynfekcji. Dawka promieniowania stosowana do dezynfekcji wody pozwoliłaby na usunięcie zaledwie 4,2%, 4,7% i 2,8% początkowego stężenia odpowiednio *o*-PP, *m*-PP i *p*-PP. Należy więc poszukać efektywniejszej metody ich degradacji.

Dodatek roztworu nadtlenuku wodoru do naświetlanego roztworu zdecydowanie przyspiesza proces zaniku związków chemicznych. W wyniku absorpcji promieniowania UVC nadtlenek wodoru ulega rozkładowi na rodniki hydroksylowe, które są silnymi, nieselektywnymi utleniaczami reagującymi bardzo szybko ze związkami organicznymi. W przypadku izomerów PP zaobserwowano około 10-krotnie przyspieszenie procesu degradacji (Rys. 1).



Rys. 1. Rozkład izomerów PP pod wpływem nadtlenuku wodoru, promieniowania UV i w układzie H_2O_2/UV ($C_{oPP} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{mPP} = 5,0 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{pPP} = 4,9 \cdot 10^{-5}$ M, $C_{H_2O_2} = 5,0 \cdot 10^{-2}$ M, $E_0 = 10,6 \cdot 10^{-6}$ einstein/(dm³ s), pH 7)

Przy zastosowaniu natężenia promieniowania wynoszącego $10,06 \cdot 10^{-6}$ einstein/(dm³ s) i 0,05 M H_2O_2 po czasie 30 s uzyskano ponad 50 % spadek stężenia początkowego *o*-PP i *p*-PP i ok 70 % spadek stężenia początkowego *m*-PP (Rys. 1).

Wyniki analizy toksyczności roztworów izomerów fenylofenolu przed oraz po procesie fotolizy i degradacji w układzie H_2O_2/UV przedstawiono na rys. 2-4. Badania toksyczności izomerów PP przeprowadzono przy zastosowaniu metody *ToxTrak*TM, która jest stosunkowo łatwa i szybka w przeprowadzeniu oraz bazuje na spektrofotometrycznym oznaczeniu barwnika redox - resazuryny przy długości fali 603 nm. Pod wpływem oddychania mikroorganizmów wskaźnikowych resazuryna ulega redukcji czemu towarzyszy zmiana barwy roztworu z niebieskiego na różowy i spadek wartości absorbancji. Substancje działające toksycznie na organizmy wskaźnikowe zakłócają ten proces. Inhibicję wywołaną obecnością związków toksycznych oblicza się z następującego wzoru:

$$I [\%] = \left[1 - \frac{\Delta A_{próby}}{\Delta A_{kontroli}} \right] \times 100 \quad (1)$$

gdzie:

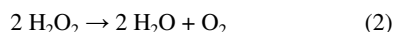
A – absorbancja [-]

$\Delta A = A_0 - A_t$

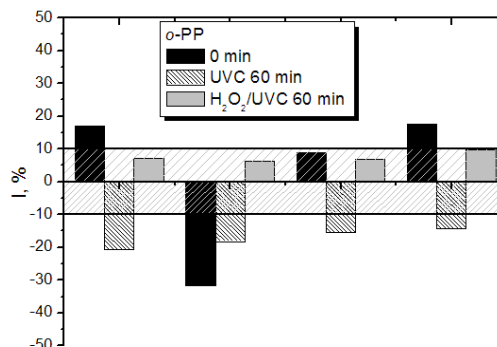
Wartość inhibicji zawierająca się w przedziale $-10\% < I < 10\%$ oznacza, że badany roztwór nie jest toksyczny, natomiast roztwory dające wartości mniejsze od -10% lub większe od 10% są uznawane za toksyczne. Pomiar toksyczności metodą *ToxTrak* jest pomiarem względnym, inhibicja niekoniecznie wzrasta proporcjonalnie do stężenia związków toksycznych w badanym roztworze. Pewne substancje toksyczne mogą dawać ujemne wartości inhibicji.

Jak można zauważyć na rys. 2-4 roztwory wodne wszystkich obiektów badań wykazują działanie toksyczne w stosunku do bakterii *E. coli*. Naświetlanie mieszanin reakcyjnych zawierających izomery fenylofenolu promieniowaniem UVC przez 60 min nie spowodowało wyeliminowania ich toksyczności. Natomiast dodatek nadtlenuku wodoru do naświetlanych roztworów przyczynił się do uzyskania nietoksycznych roztworów poreakcyjnych. Badanie toksyczności wykonano po czasie 60 min trwania reakcji, ponieważ chciano sprawdzić czy roztwór reakcyjny jest toksyczny gdy nastąpi znaczny spadek ogólnego węgla organicznego (OWO) w nim zawartego (dla prezentowanych wyników degradacji w układzie H_2O_2/UV , OWO zostało obniżony ponad 60 % (wyników nie zamieszczono)).

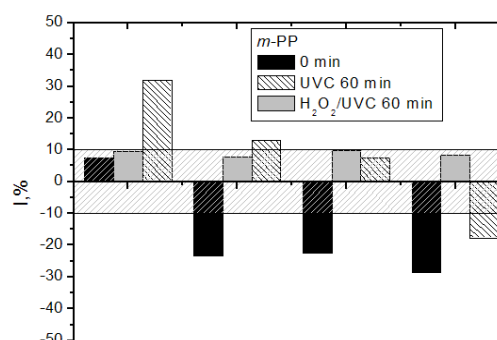
W przypadku badania roztworów reakcyjnych zawierających nadtlenuk wodoru, przed określeniem toksyczności usuwano ten reagent ze środowiska reakcyjnego przy zastosowaniu katalazy. Enzym ten katalizuje reakcję rozkładu H_2O_2 [Ścibior i Czczot, 2006], w wyniku której powstaje tlen i woda:



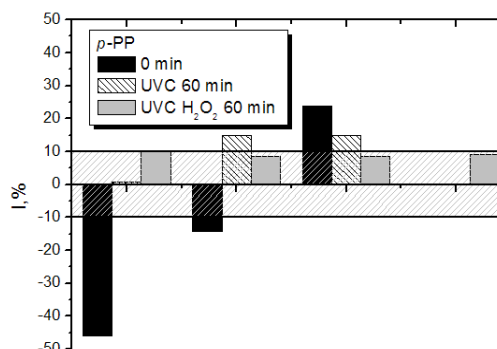
Przeprowadzono badania sprawdzające wpływ katalazy na bakterie *E. coli*. Enzym ten nie wpływał toksycznie na zastosowane mikroorganizmy wskaźnikowe, co można zauważyć na rys. 5.



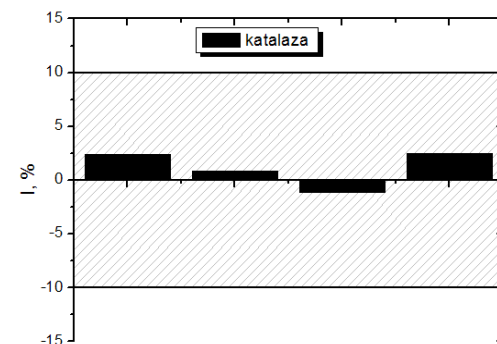
Rys. 2. Inhibicja bakterii *E. coli* w obecności roztworów *o*-PP przed i po procesie degradacji ($C_{oPP} = 1 \cdot 10^{-4}$ M, $C_{H_2O_2} = 5,0 \cdot 10^{-2}$ M, $E_0 = 10,6 \cdot 10^{-6}$ einstein/(dm³ s), pH 7)



Rys. 3. Inhibicja bakterii *E. coli* w obecności roztworów *m*-PP przed i po procesie degradacji ($C_{oPP} = 1 \cdot 10^{-4}$ M, $C_{H_2O_2} = 5,0 \cdot 10^{-2}$ M, $E_0 = 10,6 \cdot 10^{-6}$ einstein/(dm³ s), pH 7)



Rys. 4. Inhibicja bakterii *E. coli* w obecności roztworów *p*-PP przed i po procesie degradacji ($C_{oPP} = 1 \cdot 10^{-4}$ M, $C_{H_2O_2} = 5,0 \cdot 10^{-2}$ M, $E_0 = 10,6 \cdot 10^{-6}$ einstein/(dm³ s), pH 7)



Rys. 5. Inhibicja bakterii *E. coli* w obecności katalazy

Wnioski

Na podstawie wyników uzyskanych w toku prac badawczych można stwierdzić, że zanik izomerów fenylofenolu zachodzi zarówno przy zastosowaniu promieniowania UVC jak i podczas procesu łączącego działanie tego czynnika z nadtlenkiem wodoru.

Fotoliza obiektów badań następuje relatywnie szybko, jednak należy zwrócić uwagę na fakt, iż do całkowitego usunięcia tych związków z roztworów reakcyjnych konieczne jest zastosowanie dawek promieniowania kilkakrotnie przewyższających dawki promieniowania UVC powszechnie stosowane do dezynfekcji wody.

Zaawansowane utlenianie izomerów fenylofenolu w układzie H_2O_2/UV jest procesem bardzo szybkim. Dodatek do naświetlanego roztworu nadtlenu wodoru spowodował około 10-krotne przyspieszenie procesu degradacji badanych związków.

Wszystkie roztwory wodne izomerów fenylofenolu wykazują działania toksyczne w stosunku do bakterii *E. coli*.

Naświetlanie mieszanin reakcyjnych zawierających izomery fenylofenolu promieniowaniem UVC nie spowodowało wyeliminowania ich toksyczności. Natomiast zastosowanie pogłębianego utleniania w układzie H_2O_2/UV przyczyniło się do uzyskania nietoksycznych względem mikroorganizmów roztworów poreakcyjnych.

LITERATURA

- Balakrishnan S., Eastmond D.A., 2006. Micronuclei and cell proliferation as early biological markers of ortho-phenylphenol-induced changes in the bladder of male F344 rats. *Food Chem. Toxic.*, **44**, 1340-1347. DOI: 10.1016/j.fct.2006.02.011
- Błędzka D., Gryglik D., Olak M., Gębicki J.L., Miller J.S., 2010. Degradation of n-butylparaben and 4-tert-octylphenol in H_2O_2/UV system. *Rad., Phys. Chem.*, **79**, 409-416. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2009.11.012
- Broderius S.J., Kahl M.D., Hoglund M.D., 1995. Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**, 1591-1605. DOI: 10.1002/etc.5620140920
- Canonica S., Meunier L., von Gunten U., 2008. Phototransformation of selected pharmaceuticals during UV treatment of drinking water. *Water Res.*, **42**, 121-128. DOI: 10.1016/j.watres.2007.07.026
- Curtis C., Lima A., Lozano S.J., Veith G.D., 1982. *Evaluation of a bacterial bioassay as a method for predicting acute toxicity of organic chemicals to fish* [in:] Pearson J.G., Foster R.B., Bishop W.E. (Eds), Aquatic toxicology and hazard assessment: 5th Conf. ASTM STP 766. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 170-178
- Gryglik D., Olak M., Miller J.S., 2010. Photodegradation kinetics of androgenic steroids boldenone and trenbolone in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol., A: Chemistry*, **212**, 14-19. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2010.03.005
- HACH DR/2000 *Spectrophotometer handbook ToxTrak™ test*. **665**. Loveland, CO: HACH Company, 1988-1995b
- Jonkers N., Kohler H-P. E., Dammshausen A., Giger W., 2009. Mass flows of endocrine disruptors in the Glatt River during varying weather conditions. *Env. Poll.*, **157**, 714-723. DOI: 10.1016/j.envpol.2008.11.029
- Krüger T., Long M., Bonefeld-Jørgensen E.C., 2008. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology*, **246**, 112-123. DOI: 10.1016/j.tox.2007.12.028
- Ledakowicz S., Miller J.S., Olejnik D., 1999. Oxidation of PAHs in water solutions by ultraviolet radiation combined with hydrogen peroxide. *Int. j., Photoen.*, **1**, 55-60. DOI: 10.1155/S1110662X99000100
- Ledakowicz S., Miller J.S., Olejnik D., 2001. Oxidation of PAHs in water solutions by ozone combined with ultraviolet radiation. *Int. J. Photoen.*, **3**, 95-101. DOI: 10.1155/S1110662X01000113
- Ledakowicz S., Miller J.S., Perkowski J., 2002. *Procesy zaawansowanego utleniania z udziałem kilku czynników utleniających* [w:] Zarzycki R. (red.). Zaawansowane techniki utleniania w ochronie środowiska, PAN Łódź
- Nunoshiba T., Watanabe E., Takahashi T., Daigaku Y., Ishikawa S., Mochizuki M., Ui A., Enomoto T., Yamamoto K., 2007. Ames test-negative carcinogen, ortho-phenyl phenol, binds tubulin and causes aneuploidy in budding yeast. *Mutation Res.*, **617**, 90-97. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2007.01.002
- Olak M., Miller J.S., 2011. *Zastosowanie pogłębianego utleniania do degradacji 2-fenylofenolu w środowisku wodnym* [w:] Traczewska T.M. (red.) Interdyscyplinarne zagadnienia w inżynierii i ochronie środowiska 1, Wyd. Pol. Wrocławskiej, Wrocław 2011, 303-316 (ISBN 978-83-7493-644-6)
- Paris F., Balaguer P., Térouanne B., Servant N., Lacoste C., Cravedi J.-P., Nicolas J.-C., Sultan Ch., 2002. Phenylphenols, biphenols, bisphenol-A and 4-tert-octylphenol exhibit α and β estrogen activities and antiandrogen activity in reporter cell lines. *Mol. Cell. Endocrin.*, **193**, 43-49. DOI: 10.1016/S0303-7207(02)00094-1
- Peng X., Yu Y., Tang C., Tan J., Huang Q., Wang Z., 2008. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China. *Sci. Total Env.*, **397**, 158-166. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2008.02.059
- Ramos E.U., Vaes W.H.J., Mayer P., Hermans J.L.M., 1999. Algal growth inhibition of *Chlorella pyrenoidosa* by polar narcotic pollutants: toxic cell concentrations and QSAR modeling. *Aquat. Toxicol.*, **46**, 1-10. DOI: 10.1016/S0166-445X(98)00111-8
- Sasaki Y.F., Saga A., Akasaka M., Yoshida K., Nishidate E., Quan SU Y., Mztzsusaka N., Tsuda S., 1997. In vivo genotoxicity of ortho-phenylphenol, biphenyl, and thiabenzodazole detected in multiple mouse organs by alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Res.*, **395**, 198-198. DOI: 10.1016/S1383-5718(97)00168-X
- Schultz T.W., 1987. The use of ionisation constant (pKa) in selecting models of toxicity in phenols. *Ecotoxicol. Env. Saf.*, **14**, 178-183. DOI: 10.1016/0147-6513(87)90060-1
- Ścibior D., Czeczot H., 2006. Katalaza - budowa, właściwości, funkcje. *Post. Hig Med. Dośw.*, **60**, 170-180
- Stouten H., 1998. Toxicological profile for o-phenylphenol and its sodium salt. *J. Appl. Toxicol.*, **18**, 261-270.
- Sun H., Xu X-L., Qu J-H., Hong X., Wang Y-B., Xu L-C., Wang X-R., 2008. 4-Alkylphenols and related chemicals show similar effect on the function of human and rat estrogen receptor α in reporter gene assay. *Chemosphere*, **71**, 582-588. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2007.09.031
- Yu J.T., Bouwer E. J., Coelhan M., 2006. Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agr. Water Man.*, **86**, 72-80. DOI: 10.1016/j.agwat.2006.06.015

Badania przeprowadzono dzięki wsparciu finansowemu Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu N N523 748540