

Andrzej Jodłowski

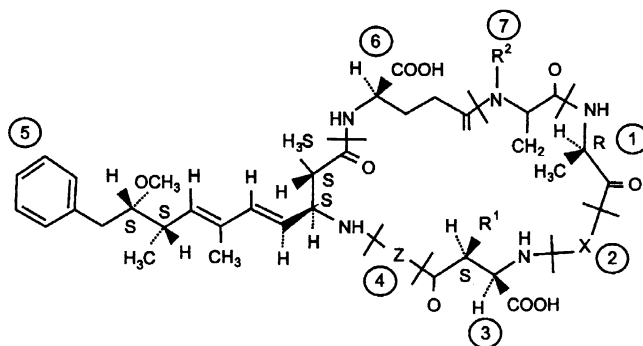
## Działanie ozonu i chloru na mikrocytyny w środowisku wodnym

Konsekwencją eutrofizacji wód powierzchniowych, w tym ujmowanych do celów wodociągowych, jest m.in. nadmierny rozwój glonów. Sinice z rodzaju *Microcystis*, *Anabena*, *Nostoc* i *Oscillatoria* (*Planktothrix*) wytwarzają w określonych warunkach środowiskowych mikrocytyny – substancje hepatotoksyczne, których obecność w wodzie przeznaczonej do picia może oddziaływać negatywnie na system pokarmowy człowieka. Mikrocytyny są potencjalnymi kancerogenami wątroby. Choć są one zasadniczo endotoksynami, to w warunkach zamierania zakwitów znaczna ich część może przechodzić do wody [1,2]. Dużo większe stężenia mikrocytyn mogą pojawić się w wodzie w wyniku stosowania algicydów podczas niszczenia zakwitów sinicowych [3].

Na ogół stężenie mikrocytyn w wodach osiąga poziom od kilku do kilkunastu  $\text{mg/m}^3$ . Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie wymagań dotyczących jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, dopuszczalne stężenie mikrocytyny LR wynosi  $1 \text{ mg/m}^3$  (w wypadku ujmowania wód powierzchniowych) [4].

Mikrocytyny są cyklicznymi peptydami złożonymi z 7 cząsteczek aminokwasów. Na rysunku 1 przedstawiono ich ogólną strukturę chemiczną. Cząsteczkę mikrocytyny tworzą trzy D-aminokwasy, tj. alanina (Ala), kwas metyloasparaginowy (MeASP) i kwas glutaminowy (Glu), dwa niezwykle aminokwasy, tj. N-metyldehydroalanina (Mdha) i kwas 3-amino-9-metoksy-2,6,8,-trimetylo-10-fenylodeka-4,6 dienowy (Adda) oraz dwa zamienne L-aminokwasy w pozycjach X i Z, od których pochodzą ich nazwy. Mikrocytyna LR (MC-LR) ma wbudowaną w pozycji X leucynę, a w pozycji Z alaninę, mikrocytyna YR (MC-YR) – odpowiednio tryptofan i argininę, a w wypadku mikrocytyny RR (MC-RR) w obu pozycjach znajduje się arginina. Stwierdzono dotychczas istnienie ponad 60 izomerów mikrocytyn. Za biologiczną aktywność mikrocytyn odpowiedzialny jest boczny łańcuch aminokwasu Adda.

Mikrocytyny, jako peptydy cykliczne, są stabilne chemiczne i ulegają rozkładowi jedynie w bardzo drastycznych warunkach. Pozostają aktywne nawet po przegotowaniu wody. Rozpuszczone mikrocytyny nie są usuwane w konwencjonalnych procesach uzdatniania wody. Układ technologiczny składający się zwykle z procesów koagulacji, flokulacji, sedimentacji, filtracji i dezynfekcji nie umożliwia usunięcia toksyn sinicowych. Mikrocytyny ulegają natomiast rozkładowi pod wpływem ozonu już przy niewielkich jego dawkach i po krótkim czasie kontaktu. W pracy [6] stwierdzono, że mikrocytyna LR o stężeniu początkowym  $166 \text{ mg/m}^3$  uległa



Rys. 1. Ogólna struktura chemiczna mikrocytyn [5]

rozkładowi do poziomu niewykrywalnego przy dawce około  $0,2 \text{ gO}_3/\text{m}^3$  i po czasie kontaktu 4 min. Efektywność rozkładu mikrocytyn przy użyciu ozonu zależy od pH wody, przy czym przebiega on z większą skutecznością w środowisku kwasowym, co sugeruje, że rozkład ten następuje prawdopodobnie w wyniku ataku ozonu cząsteczkowego. Mniejsza jest wobec tego rola mechanizmu rodnikowego. Próby rozkładu MC-LR przy użyciu ozonu w wodach naturalnych charakteryzujących się zróżnicowaną zasadowością i zawartością związków organicznych dowiodły, że najwyższy stopień rozkładu tej mikrocytyny uzyskano w wodzie charakteryzującej się niskim stężeniem ogólnego węgla organicznego ( $4,6 \pm 5,7 \text{ gC/m}^3$ ) i zasadowością na poziomie  $30 \pm 110 \text{ gCaCO}_3/\text{m}^3$  [7]. Niezbędna dawka ozonu zapewniającego całkowity rozkład mikrocytyny w wodach zawierających prawie 3-krotnie większe stężenia OWO ( $15,5 \text{ gC/m}^3$ ) i charakteryzujących się wyższą zasadowością ( $133 \text{ gCaCO}_3/\text{m}^3$ ) była znacznie większa. Na podstawie wyników badań laboratoryjnych stwierdzono, że produktem oddziaływania ozonu na MC-LR był m.in. kwas 4-fenyl-3-metoksy-2-metylomasłowy.

Wyniki wczesnych prac nad rozkładem rozpuszczonych toksyn sinicowych w wodzie przy użyciu chloru sugerowały, że nawet znaczne jego dawki ( $5 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$ ) były nieskuteczne [8]. Zaobserwowano także, że układy technologiczne uzdatniania wody obejmujące koagulację, filtrację i chlorowanie dawkami około  $0,5 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$  cechowała niska skuteczność, sugerująca niewielki udział procesu chlorowania w rozkładzie toksyn [9,10]. W pracy [11] stwierdzono, że chlorowanie zapewniło pomijalnie niski stopień rozkładu mikrocytyny w wodzie. W czasie prowadzenia tych doświadczeń chlor mógł być zużyty przez substancje organiczne występujące w znacznych stężeniach, uniemożliwiając rozkład mikrocytyn. Możliwości rozkładu MC-LR przy użyciu związków chloru wykazano w pracy [12]. Chlor w postaci wody chlorowej rozkładał skutecznie MC-LR przy dawkach zapewniających stężenie chloru pozostałego na poziomie  $0,5 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$  po

czasie kontaktu 30 min w wodzie o  $\text{pH} < 8$ . Skuteczność rozkładu toksyny była więc uzależniona od formy występowania chloru w wodzie.

Celem niniejszej pracy było określenie skuteczności ozonu i podchlorynu sodu w rozkładzie mikrocytyn obecnych w wodach zawierających inne rozpuszczone substancje organiczne (produkty rozkładu materiału biologicznego, substancje humusowe).

## Metodyka badań

Toksyny wykorzystane podczas badań wyizolowano z materiału biologicznego pobranego z wody Zbiornika Sulejowskiego. Komórki sinic *Microcystis aeruginosa*, tworzące zakwit, pobrano przy użyciu siatki planktonowej ( $65 \mu\text{m}$ ) z powierzchniowej warstwy wody. Następnie zagęszczony materiał biologiczny liofilizowano pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze  $-40^\circ\text{C}$ , po czym poddano go działaniu ultradźwięków (10 min.) i odwirowano. Uzyskany surowy ekstrakt toksyn oczyszczono w aktywowanych kolumnach C18-100 mg (Bakerbond SPE<sup>TM</sup>). Kolumny przepłukano kolejno wodą destylowaną oraz 10% i 20% metanolem. Po wysuszeniu kolumn strumieniem powietrza ekstrakt przemyto 20% metanolem, a eluat odparowano.

Przygotowując próbki wody przeznaczone do badań rozpuszczono mikrocytynę w wodzie destylowanej, uzyskując ich stężenia w zakresie  $4\text{--}36 \text{ mg/m}^3$ . Do wody dodano także ekstrakt substancji humusowych, otrzymany z torfu ogrodniczego w środowisku zasadowym ( $\text{pH}=11$ ).

Stężenie toksyn określono metodą HPLC (wysokowydajna chromatografia cieczowa). Oznaczenie poprzedzono zagęszczeniem próbek metodą SPE (*solid phase extraction*). Zagęszczenie próbek przeprowadzono w kolumnach wypełnionych octadecylem C-18 przy podciśnieniu 400 mbar. Toksyny wyekstrahowano metanolem z dodatkiem kwasu trifluorooctowego (TFA). W oznaczeniach zastosowano system Hewlett Packard model 1100, wyposażony w detektor UV-VIS. Pomiar przeprowadzono przy długości fali 238 nm. Do rozdzielania faz zastosowano termonastawną ( $40^\circ\text{C}$ ) kolumnę Lichro-CART<sup>TM</sup> ( $250 \text{ m} \times 4 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ ), do której wprowadzono próbki wody o objętości  $20 \mu\text{l}$ . Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła  $1 \text{ cm}^3/\text{min}$ . Fazę nośną stanowił wodny roztwór acetonitrylu z dodatkiem 0,07% TFA w stosunku 63%/37%. Zawartość mikrocytyn w próbce określono na podstawie powierzchni pików uzyskanych po odpowiednim czasie retencji, odpowiadającym pikom krzywej kalibracyjnej. Obróbkę wyników przeprowadzono przy użyciu programu HP ChemStation.

Stężenie substancji humusowych oznaczono metodą spektrofotometryczną (UV-VIS Hitachi model U-2001), po uprzedniej ekstrakcji alkoholem izoamylowym. Stężenie chloru oznaczono spektrofotometrycznie metodą ortotolidynową, a stężenie ozonu – metodą jodometryczną.

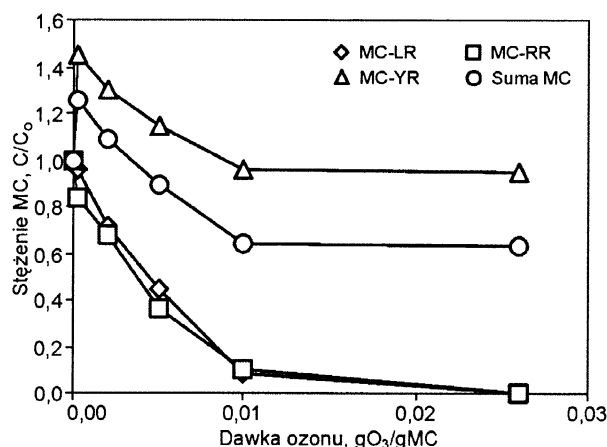
## Przebieg badań

### Rozkład mikrocytyn ozonem

Podczas przygotowania wody do badań zastosowano dostępne ekstrakty mieszaniny mikrocytyn zanieczyszczone produktami rozkładu komórek sinic. Przed przystąpieniem do

badania próbki wody przefiltrowano przez filtr Whatman GF/C w celu ograniczenia wpływu tych substancji na skuteczność rozkładu toksyn. Stwierdzono, że stężenia MC-LR i MC-RR były stosunkowo niskie i wynosiły odpowiednio  $4,2 \text{ mg/m}^3$  i  $3,7 \text{ mg/m}^3$ , zaś stężenie MC-YR wynosiło  $14,6 \text{ mg/m}^3$ . Sumaryczne stężenie wszystkich zidentyfikowanych form mikrocytyn osiągnęło wartość  $22,5 \text{ mg/m}^3$ .

Z uwagi na niskie stężenia mikrocytyn w wodzie zastosowano porcjowe wprowadzanie czynnika utleniającego. Do próbek wody zanieczyszczonej toksynami o objętości  $0,5 \text{ dm}^3$  wprowadzono zróżnicowane objętości wody ozonowej (od  $0,5 \text{ cm}^3$  do  $40 \text{ cm}^3$ ), którą uzyskano saturując wodę destylowaną mieszaniną powietrzno-ozonową w komorze reakcji o pojemności  $0,25 \text{ dm}^3$  przez około 15 min. Ozon wytworzono z tlenu w generatorze ozonu typu BMT 802X, przy czym tlen przed wprowadzeniem do generatora poddano osuszeniu. Stężenie ozonu w wodzie ozonowej wynosiło  $7,5\text{--}9,0 \text{ gO}_3/\text{m}^3$ . Proces rozkładu mikrocytyn przy użyciu ozonu przeprowadzono przy  $\text{pH}=6,5$ . Wobec braku możliwości dokonania pomiarów stężenia ozonu pozostałego, z uwagi na zbyt małe wartości, w rozważaniach przyjęto jego całkowite zużycie. Uzyskane wyniki badań przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Wpływ dawki ozonu na skuteczność rozkładu mikrocytyn przy  $\text{pH}=6,5$

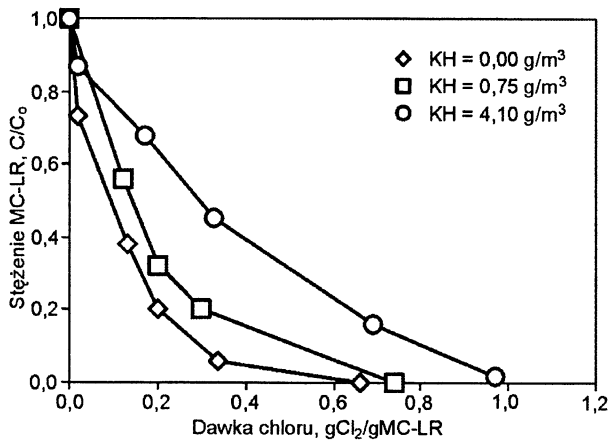
Ozon skutecznie rozkładał struktury MC-LR i MC-RR. Przy dawce ozonu około  $0,02 \text{ gO}_3/\text{mg}$  ( $0,05 \text{ gO}_3/\text{m}^3$ ) zaobserwowano całkowity zanik mikrocytyn. Niepodatną na działanie tego utleniacza w zastosowanym zakresie dawek okazała się MC-YR. Stopień jej rozkładu przy dawce ozonu  $0,6 \text{ gO}_3/\text{m}^3$  wyniósł około 13,5%. Przy małych dawkach ozonu zaobserwowano wzrost stężenia MC-YR, a co za tym idzie – również wzrost stężenia sumy mikrocytyn. Należy to przypisać wzrostowi absorbancji przy długości fali wykorzystywanej przy oznaczaniu mikrocytyn spowodowanemu najprawdopodobniej obecnością produktów ubocznych ozonowania lub/i domieszek organicznych występujących w próbkach wody poddanej ozonowaniu.

### Rozkład MC-LR podchlorynem sodu

Chlorowaniu poddano próbki wody destylowanej o objętości  $0,5 \text{ dm}^3$ , zawierające mikrocytynę LR oraz porównawczo – mikrocytynę LR i substancje humusowe. Stężenie MC-LR w próbkach wody destylowanej pozbawionej innych domieszek organicznych wynosiło  $14,47 \text{ mg/m}^3$ . W wodzie zawierającej substancje humusowe w ilości  $0,746 \text{ g/m}^3$  stężenie MC-LR wynosiło  $10,48 \text{ mg/m}^3$ , a w wodzie zawierającej

związki humusowe w ilości  $4,10 \text{ g/m}^3$  stwierdzono obecność MC-LR w ilości  $12,4 \text{ mg/m}^3$ . Chlorowanie przeprowadzono w szczelnie zamykanych kolbach szklanych o pojemności  $1,0 \text{ dm}^3$ . Po dodaniu roztworu podchlorynu sodu skorygowano pH przy użyciu kwasu solnego. W wypadku roztworu MC-LR wartość pH wody destylowanej ustalono na poziomie 6,5, a w wypadku wody zawierającej dodatkowo substancje humusowe wartość pH skorygowano do poziomu 7,0.

Zastosowano dawki podchlorynu sodu zapewniające stężenie chloru od  $2,0 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$  do  $14,9 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$ . Po upływie czasu kontaktu 30 min przerwano reakcję tiosiarczanem sodu. Zużycie chloru w próbkach wody pozbawionych domieszek organicznych wahało się od  $1,9 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$  do  $14,4 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$ , natomiast w próbkach zawierających dodatkowe domieszki w postaci substancji humusowych zużycie chloru wynosiło od  $1,1 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$  do  $12,0 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$ . Zaobserwowane większe zużycie chloru w wypadku wody pozbawionej domieszki kwasów humusowych wiązało się z niższą wartością pH, przy którym przeprowadzono chlorowanie. Wyniki badań przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Wpływ dawki chloru na skuteczność rozkładu mikrocyстыny LR przy czasie kontaktu 30 min (woda bez substancji humusowych – pH=6,5, woda z substancjami humusowymi – pH=7,0)

Mikrocyстыna LR w wodzie destylowanej uległa całkowitemu rozkładowi przy dawce podchlorynu sodu  $0,3 \text{ gCl}_2/\text{mg}$ , natomiast w próbkach wody zawierającej substancje humusowe rozkład mikrocyстыny wymagał jego wyższych dawek. Całkowity rozkład MC-LR w wodzie zawierającej substancje humusowe w ilości  $0,75 \text{ g/m}^3$  umożliwiła dawka podchlorynu sodu wynosząca  $0,46 \text{ gCl}_2/\text{mg}$ , a w wodzie zawierającej substancje humusowe w stężeniu  $4,1 \text{ g/m}^3$  efekt ten uzyskano przy dawce powyżej  $1 \text{ gCl}_2/\text{mg}$ . Wysoką skuteczność rozkładu MC-LR w wypadku próbek wody pozbawionych substancji humusowych należy przypisać nie tylko brakowi ich konkurencyjnego działania w stosunku do chloru w wodzie, ale również niższej wartości pH, przy którym przeprowadzono badania.

W próbkach wody zawierających substancje humusowe zaobserwowano obniżenie intensywności barwy oraz równoczesny wzrost absorpcji w UV (długość fali 254 nm, długość drogi optycznej 1 cm). Przy największej dawce chloru ( $14,9 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$ ) barwa wody zawierającej niewielką domieszkę kwasów humusowych ( $0,75 \text{ g/m}^3$ ) uległa obniżeniu z  $51,2 \text{ gPt/m}^3$  do  $42,6 \text{ gPt/m}^3$ , a absorpcja wzrosła z 0,088 do 0,507. Wyraźniej zaobserwowano tę tendencję w wypadku wody zawierającej substancje humusowe w ilości  $4,10 \text{ g/m}^3$ . Przy największej spośród zastosowanych dawek chloru barwa

wody obniżyła się z  $103 \text{ gPt/m}^3$  do  $77,7 \text{ gPt/m}^3$ , a absorpcja wzrosła z 0,477 do 0,842. Chlor oddziaływał więc również niszcząco zarówno na strukturę mikrocyстыny, jak również na strukturę kwasów humusowych. Należy liczyć się także z tworzeniem produktów ubocznych, będących wynikiem chlorowania substancji organicznych.

## Dyskusja wyników

Uzyskane wyniki badań rozkładu mikrocyстыn przy użyciu ozonu i chloru potwierdziły możliwość znacznego obniżenia ich stężenia przy  $\text{pH} \leq 7$ . W wyniku intensywnego przebiegu procesów fotosyntetycznych pH wody w okresie zakwitów sinicowych często wzrasta do poziomu  $>10$ , zatem niezbędna staje się korekta pH podczas oczyszczania wody. Skuteczność działania obu badanych utleniaczy na mikrocyстыny uległa obniżeniu w obecności substancji humusowych. Stanowi to kolejny dowód na potrzebę maksymalnego usunięcia domieszek organicznych przed zastosowaniem procesu utleniania w układzie technologicznym oczyszczania wody. Uzyskane wyniki dotyczące niszczących dawek badanych utleniaczy w stosunku do mikrocyстыny LR potwierdziły doniesienia literaturowe w tym zakresie. Na podstawie przeprowadzonych badań można oszacować, że całkowity rozkład MC-LR można osiągnąć stosując podchloryn sodu w dawce  $0,34 \text{ gCl}_2/\text{mg}$  lub ozon w dawce  $0,02 \text{ gO}_3/\text{mg}$ , pod warunkiem prowadzenia procesu przy  $\text{pH} < 7$ . Dla porównania, w pracy [7] rozkład MC-LR na poziomie 87% uzyskano przy dawkach ozonu  $0,025+0,055 \text{ gO}_3/\text{mg}$ , a w pracy [12] przy dawce chloru  $0,26 \text{ gCl}_2/\text{mg}$ .

Rozkład mikrocyстыn, następujący w wyniku działania silnych utleniaczy (ozon, chlor), prowadzi do około 200-krotnego obniżenia ich toksyczności [5]. Zmiany w strukturze mikrocyстыn mogą zachodzić w wyniku rozerwania pierścienia peptydowego lub oderwania bocznego łańcucha Adda, lecz stwierdzenie kierunku zmian w budowie chemicznej mikrocyстыn wymaga zaawansowanych metod analitycznych.

## Wnioski

- ◆ Metoda oznaczania stężenia mikrocyстыn w wodzie, polegająca na ich ekstrakcji do fazy stałej i detekcji przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) umożliwia wykrywanie niskich stężeń tych toksyn. Pojawienie się w wodzie produktów rozkładu substancji organicznych może utrudnić określenie stężenia toksyn podczas ich usuwania z wody z wykorzystaniem silnych utleniaczy.

- ◆ Ozon zapewnił całkowity rozkład mikrocyстыn LR i RR przy dawkach około  $0,02 \text{ gO}_3/\text{mg}$  ( $0,05 \text{ gO}_3/\text{m}^3$ ), natomiast działanie ozonu na mikrocyстыnę YR okazało się nieskuteczne.

- ◆ Podchloryn sodu umożliwił skuteczny rozkład mikrocyстыny LR, jednak dawki niezbędne do jej całkowitego rozkładu były względnie duże, gdyż wynosiły około  $0,3 \text{ gCl}_2/\text{mg}$  ( $4,8 \text{ gCl}_2/\text{m}^3$ ). Dawki te były wyższe w wypadku obecności w wodzie substancji humusowych.

*Badania omówione w niniejszej pracy zostały wykonane w ramach projektu badawczego nr T709D 01321, sfinansowanego przez Komitet Badań Naukowych.*

## LITERATURA

1. M. TARCZYŃSKA: *et al.*: Toxic cyanobacterial blooms in a drinking water reservoir – causes, consequences and management strategy. *Wat. Sci. Techn.*, 2001, Vol. 1, No. 2, p. 237–246.
2. G. A. CODD *et al.*: Cyanobacterial toxins in water. *Wat. Sci. Techn.*, 1989, Vol. 21, No. 3, pp. 1–13.
3. A. K.-Y. LAM *et al.*: Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: Implications for human health. *Wat. Res.*, 1995, Vol. 29, No. 8, pp. 1845–1855.
4. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z 19 listopada 2002 r. w sprawie wymagań dotyczących jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Dz. U. nr 203, poz. 1718.*
5. CHORUS, I. BARTRAM: *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Their Public Health Consequences.* E & FN Spon. London, New York 1999.
6. J. ROSITANO *et al.*: Destruction of cyanobacterial toxins by ozone. *Ozone Sci. Engng.*, 1998, Vol. 20, pp. 223–238.
7. J. ROSITANO *et al.*: Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters. *Wat. Res.*, 2001, Vol. 35, No. 1, pp. 23–32.
8. J. R. H. HOFFMANN: Removal of *Microcystis* toxins in water purification processes. *Water SA*, 1976, Vol. 2, No. 2 pp. 58–60.
9. A. M. KEIJOLA *et al.*: Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: Laboratory and pilot-scale experiments. *Toxicity Assessment: An International Journal*, 1988, Vol. 3, pp. 643–656.
10. K. HIMBERG *et al.*: The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* Cyanobacteria: A laboratory study. *Wat. Res.*, 1989, Vol. 23, No. 8, pp. 979–984.
11. T. W. LAMBERT *et al.*: Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Wat. Res.*, 1996, Vol. 30, pp. 1411–1422.
12. B. C. NICHOLSON *et al.*: Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. *Wat. Res.*, 1994, Vol. 28, No. 6, pp. 1297–1303.

**Jodłowski, A. Effect of Ozone and Chlorine on Microcystins in Water Environment. *Ochrona Środowiska* 2003, Vol. 25, No. 3, pp. 49–52.**

**Abstract:** Periodical occurrence of intense blue-green algal blooms in impounded water which is used for municipal supply is also an indication of the risk that toxic substances, including hepatotoxic microcystins, might be present there. The study reported in this paper was carried out with microcystins (MCs) extracted from the phytoplankton bloom material (*Microcystis aeruginosa*), which was collected from the Sulejów impounding

reservoir. The concentrations of toxins in untreated water varied from 10.5 to 22.5 mg/m<sup>3</sup> and were determined by HPLC. The water samples used for the needs of the study were contaminated with MC-LR and partly with MC-RR and MC-YR. Ozonation and chlorination yielded a high removal from distilled water solutions. When the water samples contained MCs and humic substances, the efficiency of MCs removal decreased with the increase in organic matter content.

**Keywords:** Microcystins, ozonation, chlorination, surface water, algal blooms.