



Det här verket har digitaliserats vid Göteborgs universitetsbibliotek och är fritt att använda. Alla tryckta texter är OCR-tolkade till maskinläsbar text. Det betyder att du kan söka och kopiera texten från dokumentet. Vissa äldre dokument med dåligt tryck kan vara svåra att OCR-tolka korrekt vilket medför att den OCR-tolkade texten kan innehålla fel och därför bör man visuellt jämföra med verkets bilder för att avgöra vad som är riktigt.

This work has been digitized at Gothenburg University Library and is free to use. All printed texts have been OCR-processed and converted to machine readable text. This means that you can search and copy text from the document. Some early printed books are hard to OCR-process correctly and the text may contain errors, so one should always visually compare it with the images to determine what is correct.



Rapport

R37:1985

Urlakning av mutagena ämnen från rörledningsmaterial

**Katarina Victorin
Sirpa Honkasalo
Margareta Ståhlberg**

K
AVJ

INSTITUTET FÖR BYGGDOKUMENTATION	
Accnr	
Plac	See

Byggeforskningsrådet

R37:1985

URLAKNING AV MUTAGENA ÄMNEN
FRÅN RÖRLEDNINGSMATERIAL

Katarina Victorin
Sirpa Honkasalo
Margareta Ståhlberg

Denna rapport hänför sig till forskningsanslag 810593-9
från Statens råd för byggnadsforskning till Statens
miljömedicinska laboratorium, Stockholm.

I Byggforskningsrådets rapportserie redovisar forskaren sitt anslagsprojekt. Publiceringen innebär inte att rådet tagit ställning till åsikter, slutsatser och resultat.

R37:1985

ISBN 91-540-4349-2
Statens råd för byggnadsforskning, Stockholm

Liber Tryck AB Stockholm 1985

INNEHÅLL	Sid
	SAMMANFATTNING..... 5
1	FÖRORD..... 7
2	HYGIENISKA KRAV PÅ MATERIAL SOM ANVÄNDS I DRICKSVATTENDISTRIBUTIONEN..... 8
3	BIOLOGISKA TESTMETODER..... 10
3.1	Valda metoder för projektet..... 10
3.2	Metodbeskrivningar för använda biologiska tester..... 11
3.2.1	Ames test..... 11
3.2.2	V 79-mutagenicitetstest..... 12
3.2.3	Celltoxicitetstest /MIT-24..... 13
3.2.4	Toxicitetstest/Ames..... 13
4	UNDERSÖKTA MATERIAL, METODER FÖR URLAKNING OCH ANRIKNING AV VATTENPROVER SAMT LITTERATURDATA ANGRENDE MUTAGENICITETSTESTNING AV VATTEN..... 15
4.1	Undersökta material..... 15
4.2	Urlakningsförfarande..... 15
4.3	Metoder för koncentrerings av vattenprover..... 16
4.4	Metoder använda vid mutagenicitetstestning av vattenprover samt erhållna resultat (Litteratursammanställning)..... 17
4.5	Den koncentrationsmetod som använts i projektet..... 21
5	RESULTAT FRÅN UNDERSÖKNING AV DE OLIKA MATERIALEN MED AMES TEST..... 22
5.1	Asfalt (Figur 3)..... 22
5.1.1	Destillerat vatten..... 22
5.1.2	Klorerat destvatten..... 22
5.1.3	Kommentarer..... 23
5.2	Cement (Figur 4)..... 23
5.2.1	Destillerat vatten..... 23
5.2.2	Klorerat destvatten..... 23
5.2.3	Kommentarer..... 24
5.3	Glasfiberarmerad epoxi (Figur 4)..... 24
5.4	Glasfiberarmerad polyester (GAP) (Figur 5-9)... 24
5.4.1	Tillverkningsats nr 1 (A) (Figur 5-8)..... 24
5.4.1.1	Destillerat vatten..... 24
5.4.1.2	Klorerat destvatten..... 25
5.4.2	Tillverkningsats nr 2 (B) (Figur 9)..... 25
5.4.2.1	Destillerat vatten..... 25
5.4.2.2	Klorerat destvatten..... 25
5.4.3	Tillverkningsats nr 3 (C) (Figur 9)..... 26
5.4.3.1	Destillerat vatten..... 26
5.4.4	Kommentarer..... 26
5.5	Polyeten med hög densitet (PEH) (Figur 10).... 27
5.5.1	Destillerat vatten..... 27
5.5.2	Klorerat destvatten..... 27
5.5.3	Kommentarer..... 27
5.6	Polyeten med låg densitet (PEL) (Figur 11).... 27
5.7	Tvårbunden polyeten (PEX) (Figur 12 och 13).... 28
5.7.1	Destillerat vatten..... 28

5.7.2	Klorerat destvatten.....	28
5.7.3	Kommentarer.....	28
5.8	Polyuretanbelagda järnrör (PUR) (Figur 14 och 15).....	28
5.8.1	Destillerat vatten.....	28
5.8.2	Klorerat destvatten.....	28
5.8.3	Kommentarer.....	29
5.9	Polyvinylklorid (PVC) (Figur 17 och 18).....	30
5.9.1	Destillerat vatten.....	30
5.9.2	Klorerat vatten.....	30
5.9.3	Kommentarer.....	31
5.10	Gummipackningar (Figur 19).....	31
5.11	Dricksvatten (Figur 20).....	31
5.12	Kontroller (Figur 21).....	32
5.12.1	Destillerat vatten.....	32
5.12.2	Silikon-lim och Tangit-lim.....	32
5.12.3	Positiva kontroller.....	32
6	MUTAGENICITETSTESTNING MED V 79 HAMSTERCELLER (HGPRT-LOCUS).....	33
6.1	Resultat.....	33
6.2	Diskussion av resultaten.....	33
7	CYTOTOXICITET MIT-24.....	35
7.1	Resultat.....	35
7.2	Diskussion av resultaten.....	35
8	DISKUSSION AV ERHÅLLNA RESULTAT.....	36
9	REKOMMENDATIONER VID STANDARDISERAD MUTAGENI- CITETSTESTNING AV RÖRMATERIAL.....	42
9.1	Material.....	42
9.2	Förbehandling.....	42
9.3	Urlakning.....	42
9.4	Koncentrering av vattnet.....	43
9.5	Ames test.....	43
9.6	Bedömning av resultaten.....	44
10	DISKUSSION AV FÖRESLAGET GRÄNSVÄRDE SAMT BEDÖMNING AV UNDERSÖKTA MATERIAL.....	45
11	LITTERATUR.....	47
BILAGA 1	Tabeller 1-7.....	53
BILAGA 2	Figurer 1-23.....	65

SAMMANFATTNING

I dag finns inga specifika centrala regler för vilka krav som bör ställas på material som används i den allmänna dricksvattenförsörjningen från toxikologisk-hygienisk synpunkt. Planverket kräver dock att material i fastighetsinstallationer skall vara bedömt ur hygienisk synpunkt av Livsmedelsverket för att erhålla typgodkännande. På Livsmedelsverket tillämpas därför nu en bedömning dels utifrån uppgifter om materialets sammansättning, dels utifrån gjorda urlakningstester. Tidigare gjordes dessa bedömningar på Statens miljömedicinska laboratorium, där även ett förslag till förfarande vid urlakningstester utarbetades. I sammanhanget diskuterades biologiska testmetoder, som är fördelaktiga genom att en effekt av den samlade komplexa blandningen av urlakade ämnen kan studeras. Eftersom eventuella urlakade ämnen förekommer i låga halter, men samtidigt når många människor under lång tid via dricksvattnet är förekomst av cancerframkallande ämnen viktigt att studera. Föreliggande undersökning har utförts för att utröna om ett bakteriologiskt mutagenicitetstest, det s k Ames-testet, är lämpligt att använda i sammanhanget.

Under de senaste åren har flera undersökningar utförts där koncentrat av vattenprover har undersökts med avseende på mutagenicitet i Ames test och i några fall andra mutagenicitetstester. Olika metoder har använts för att koncentrera vattenproven. Ingen metod ger fullständig ansamling av de organiska föroreningarna. Med en polymer adsorbent, XAD, ansamlas sannolikt endast en liten del av allt organiskt material i vatten, även om genomsnittligt 75-80% utbyte av enskilda organiska ämnen har rapporterats. Trots detta har sådant XAD-koncentrat uppvisat mutagen effekt i Salmonella-bakterier. Undersökningar av dricksvatten har visat att råvattnet kan innehålla mutagena föroreningar som till stor del tas bort i reningen, men att det bildas mutagena föreningar vid klorering av renvattnet, främst sådana som är direktmutagena med Salmonella-stammen TA 100.

I föreliggande undersökning har vi lakat ur rör av polyeten med hög och låg densitet (PEH och PEL), tvärbunden polyeten (PEX), polyvinylklorid (PVC), glasfiberarmerad polyester (GAP) och glasfiberarmerad epoxi samt järnrör invändigt belagda med asfalt, cement eller polyuretan (PUR). Dessutom har gummipackningar av eten-propen-gummi (EPDM), butylgummi och styren-butadiengummi undersökts. Som jämförelse har också dricksvatten undersökts, dels från nätet och dels vattenverket.

Rören (inre yta 60-360 dm²) har lakats ur under 3 x 3 dygn med dels klorerat, dels oklorerat destillerat vatten (ca 15-30 l). Vattnen har sedan koncentrerats genom tre på varandra följande adsorptioner på XAD-4/8 vid pH 6, 12 respektive 2. XAD-kolonnerna eluerades med aceton, som torkades med hjälp av molekylsiktar, indunstades och löstes upp i dimetylsulfoxid (DMSO). Dessa koncentrat testades separat och sammanslagna med Salmonella-stammarna TA 98 och TA 100 med och utan tillsats av metaboliserande enzymer.

Urlakning med oklorerat vatten med GAP-rör av två tillverkningar samt de tre typerna av EPDM-gummi gav ett entydigt mutagent extrakt enligt tillämpade kriterier. GAP-rör av en tredje tillverkning gav svag mutagenicitet, liksom en omgång PVC-rör. Ännu lägre mutagenicitet detekterades också i två fall med koncentrat från en omgång PEH- och PEX-slang, som dock kan ha varit slumpmässiga resultat. Urlakningsvattnen från de övriga materialen asfalt, cement, PEL och epoxi var ej mutagena.

Urlakning med klorerat vatten gav högre mutagenicitet med GAP-rören och mutagenicitet detekterades också från cement-, PUR- och PVC-rören. En låg mutagenicitet från asfalt- och PEX-rör kan ha varit slumpmässiga resultat. PEH- och PEL-extrakten var negativa.

Koncentrat av klorerat vattenledningsvatten uppvisade en mutagenicitet per liter vatten av samma storleksordning eller större än från rörmaterialen. Rören lakades dock ur under 3 dygn, medan den genomsnittliga uppehållstiden i ett normalt vattenledningsnät är ca 1/2 dygn. I praktiken skulle därför rörmaterialens bidrag av mutagena ämnen i de flesta fall utgöra en betydligt lägre andel.

Att resultaten med Ames test på rörextrakten i flera fall var svårbedömda berodde på att en "snäv" metod använts för statistisk signifikansprövning. Endast extrakten från ett GAP-rör samt EPDM-packningarna var kraftigt mutagena. Mutageniciteten från detta GAP-rör kvarstod även efter 4 urlakningar. Testning av enskilda komponenter gav ej upplysning om vad som förorsakade mutageniciteten.

Oklorerat extrakt från GAP-, PEL- och PUR-rör undersöktes också med avseende på mutagenicitet i daggdjursceller. GAP-extraktet var sannolikt, men ej entydigt, mutagent i detta testsystem, medan PEL- och PUR-extrakten var negativa.

Akut celltoxicitet undersöktes också i cellkultur av humant ursprung på Uppsala cytotoxikologiska laboratorium. Extrakt från GAP-rören var mer toxiska än från de övriga undersökta rörmaterialen.

Att göra Ames test på urlakningsvattnen är relativt sett en okänsligare metod än kemisk analys för detektion av enskilda mutagena substanser och fordrar att man utgår från mycket större mängder material. Trots detta rekommenderar vi att metoden tillämpas som ett komplement till fysikalisk-kemisk testning, eftersom urlakningsvattnet kan innehålla en komplex blandning av ämnen, vars samlade mutagena effekt kan studeras utan att kemisk identifiering av alla ingående ämnen behöver göras. En i vissa avseenden modifierad och något förenklad version av den använda testmetodiken föreslås, vars detaljer framgår av rapporten.

I princip bör inga mutagena ämnen tillåtas lakas ur från rörmaterial till dricksvatten. Med den föreslagna testmetodiken kan en mutagenicitet på 10 revertanter per dm^2 exponerad yta bedömas utgöra vad som med rimlig säkerhet kan detekteras. 10 revertanter/ dm^2 efter tredje urlakningen föreslås därför som gränsvärde under de givna betingelserna. Om de undersökta materialen bedöms enligt detta förslag skulle endast GAP-rör med en tillverkningsmetod, som enligt uppgift ej längre tillämpas, underkännas.

Olika material används i rör för dricksvatten-distribution, och flera alternativ till de vanligaste materialen är aktuella vid nybyggnation, renovering av gamla ledningar, invändig beklädnad av cisterner etc. Det kan vara svårt att avgöra om ett visst material är lämpligt att använda, med tanke på eventuell urlakning av toxiska ämnen till vattnet. I flera fall har olika material givit upphov till lukt- och smakproblem. Användningen av olika material är dåligt reglerad i dag beträffande hygienisk-toxikologiska synpunkter.

I denna rapport lämnas inledningsvis en beskrivning av de anvisningar som finns inom området samt de förslag till krav på bedömningsunderlag och testförfarande som utarbetats. Härvid har även biologisk testning föreslagits som ett lämpligt komplement till kemisk-fysikalisk undersökning av vatten som varit i kontakt med ett visst material. Föreliggande studie har utförts för att undersöka om ett bakteriologiskt mutagenicitetstest med förmåga att förutsäga potentiellt cancerogena effekter, Ames Salmonella-/mikrosomtest, är en lämplig testmetod för detta användningsområde. En diskussion och beskrivning av Ames-testet och andra toxicitetstester kommer därför att redovisas tillsammans med ett kortfattat referat av de undersökningar som utförts med mutagen-testning av dricksvatten utomlands. Även olika metoder för koncentrerat av vattenprover kommer att diskuteras. Huvuddelen av rapporten beskriver de resultat som erhållits med vald metodik när några olika rörmaterial undersökts. I de avslutande delarna diskuteras relevansen av resultaten samt lämnas förslag till hur ett standardiserat urlakningsförfarande kan kompletteras med biologiska test.

Undersökningen har bedrivits under en tvåårsperiod med stöd från Bygghörsningsrådets program "Hälsoskydd i byggnader". Till stöd vid undersökningens genomförande har en referensgrupp anlitats. Denna har bestått av Ulf Ahlborg, Statens miljömedicinska laboratorium; Ann-Christine Albertsson, Institutionen för polymer-teknologi på Tekniska högskolan; Leif Busk, Livsmedelsverket; Jan Hjort, Stockholms VA-verk; Bengt Hultman, Vatten- och Avlopps-verksföreningen (VAV); Nils Lindblad, VAV tidigare Planverket samt Eva Sandberg, Livsmedelsverket. Inom gruppen har arbetets uppläggning och delresultat diskuterats. Deltagarna har läst och lämnat synpunkter på föreliggande slutrapport.

2 HYGIENISKA KRAV PÅ MATERIAL SOM ANVÄNDS I DRICKSVATTEN-DISTRIBUTIONEN

För installationer i allmänna vattenledningar behövs inte något godkännande av materialet ur hygienisk synpunkt. I tveksamma fall kan samråd förekomma mellan kommunens gatu- och hälsovårds-kontor. Svensk materialstandard finns för rör av gjutjärn (med in- och utvändigt korrosionsskydd, t ex asfalt), stål, galvaniserat järn, härddragen koppar, polyeten, polyvinylklorid (PVC) och asbestcement. Asbestcement används dock inte längre vid nyanläggningar sedan man uppmärksammat problemet med utlösning av asbestfibrer till vattnet. I materialkraven för polyeten och PVC står att materialet inte får avge lukt, smak eller färg till vattnet eller innehålla ämnen som kan lösas i vatten i sådan mängd att vattnets användbarhet som dricksvatten minskas i kemiskt, bakteriologiskt eller annat avseende. PVC får dessutom inte lösa ut mer än vissa angivna mängder bly och tenn vid urlakning. Trots materialstandarderna har det förekommit att polyetenrör ger kraftig smak och lukt åt vattnet. Orsaken till detta är inte helt klarlagd. Vad gäller andra rörmaterial eller invändiga korrosionsskydd så kan hygienisk-toxikologisk bedömning av materialet göras av central myndighet efter förfrågan från tillverkare eller användare via Vatten- och Avloppsverksföreningen eller Statens planverk. En sådan bedömning innebär dock inget godkännande. Liknande bedömningar gjordes tidigare på Statens miljömedicinska laboratorium (SML) och numera på Livsmedelsverket.

För vatteninstallationer i fastigheter skall enligt svensk byggnorm användas material som inte medför att hälsofarliga ämnen utlöses till vattnet. För att erhålla Planverkets (frivilliga) typgodkännande kräver Planverket numera att materialet skall vara bedömt ur hygienisk synpunkt av Livsmedelsverket (gäller förutom rör och ytbeläggingsmaterial även t ex armaturer, packningar och rörkopplingar).

Erfarenheten visar att det är mycket svårt att göra toxikologiska bedömningar endast grundade på den information som tillverkaren lämnar om ingående komponenter. Därför har förslag utarbetats om att komplettera "skrivbordsbedömningen" med urlakningsförsök där materialet undersöks under standardiserade laboratoriebetingelser (Victorin 1981, Victorin 1982, SML 1982). Detta förslag innebär att tre på varandra följande urlakningar utföres med destillerat vatten under vardera 3 dygn. Vattnet från den första och tredje urlakningen från rör undersöks med avseende på de generella parametrarna lukt, smak, färg och grumlighet samt mängd organiskt material. Dessutom föreslås specifika undersökningar på toxiska ämnen eller andra ämnen som får väljas med utgångspunkt från materialets sammansättning. Förslag till bedömning av resultaten har också lämnats.

Detta förslag till urlakningsförfarande bygger bl a på erfarenheter från Tyskland och Holland där man arbetat mest med detta problem. För närmare beskrivning av förfarandet i Tyskland och Holland samt förhållandena i andra länder hänvisas till tidigare sammanställningar (Victorin 1981 och 1982).

För att göra de bedömningar som behövs för erhållande av Planverkets typgodkännande kräver numera Livsmedelsverket, förutom fullständig innehållsdeklaration av produkten, att urlakningsförsök görs enligt nämnda förslag (Livsmedelsverket 1984).

En svårighet vid toxikologisk bedömning i allmänhet, och av ingående ingredienser i plaster i synnerhet, är bristen på bra toxikologisk dokumentation. Dessutom tillkommer svårigheten att t ex bedöma eventuella förstärkningseffekter av enskilda substanser. Vidare kan det vara svårt att avgöra vilka ämnen som bör väljas ut för kemisk analys i samband med urlakningsförsök. Ett alternativ eller komplement till toxikologisk bedömning av enskilda substanser är att göra biologiska tester med det urlakade vattnet, varvid en effekt av den samlade komplexa blandningen av urlakade ämnen kan studeras. Eftersom de ämnen som eventuellt lakas ur från vattenledningsrör förekommer i låga halter, men å andra sidan kan nå många människor under lång tid, är ämnen som kan ge kroniska effekter de som i första hand måste beaktas ur hälsosynpunkt. Sådana ämnen kan vara t ex tungmetaller eller allergiframkallande ämnen. Cancerframkallande ämnen bedöms dock som mest intressant att undersöka i biologiska test. Cancerframkallande ämnen bör inte få lakas ur från materialet, eftersom även låga doser anses innebära en viss ökad cancerrisk. Därför har i det nämnda förslaget inkluderats möjligheten av att använda ett bakteriologiskt mutagenicitetstest, det s k Ames Salmonella-/mikrosomttestet, som har förmåga att detektera mutagena och därmed potentiellt cancerogena effekter.

3 BIOLOGISKA TESTMETODER

3.1 Valda metoder för projektet

Under de senaste 10-15 åren har medvetenheten ökat om att cancerframkallande ämnen i vår miljö inverkar på förekomsten av olika cancerformer hos befolkningen. Därför har flera testmetoder utvecklats för att detektera t ex cancerframkallande miljöföroreningar. Dessa s k korttids-tester har det gemensamt att de är känsliga samt snabbare och billigare än konventionella cancerstudier på djur, vilka omfattar djurets hela levnad. Korttids-testerna bygger på teorin att en mutation i en cells arvsmassa, DNA, är den initiala händelsen i den process som leder fram till cancer. Det mutagenicitetstest som fått störst spridning är det s k Ames-testet, som utnyttjar Salmonellabakterier som testorganism (se beskrivning nedan). Det är en god kvalitativ överenskomelse (ca 80%) mellan utfallet i Ames test och heldjurscancer-test för en lång rad ämnen som verkar som cancerinitiatorer. Något generellt kvantitativt samband finns dock inte. Det är inte säkert att starkt mutagena ämnen i Ames test är starkt cancerframkallande eller tvärt om. S k promotorer, som verkar på ett senare stadium i cancerprocessen, kan inte detekteras med mutagenicitetstest. Ames-testet är okänsligt för t ex cancerframkallande metaller. Metoden är relativt snabb och billig, och används rutinmässigt på SML's laboratorium. Detta mutagentest användes för samtliga undersökta prover i projektet.

Eftersom det inte finns någon absolut korrelation mellan mutagenicitet i Ames test och cancerogenicitet måste resultatet från Ames test kompletteras med andra data för att kunna vara mer än en indikation på cancerrisk. Mutagenicitetstest med däggdjurs-celler har rekommenderats för verifiering av resultaten med bakterier. Vidare testning kan vara t ex studium av kromosompåverkan in vitro. Någon säker uppskattning av cancerrisken för människa kan dock ändå inte göras, eftersom den experimentella testsituationen i viktiga avseenden skiljer sig från den reella, t ex vad gäller upptag, distribution och utsöndring av ämnet i kroppen. För att verifiera resultaten med några utvalda prover har vi satt upp ett testsystem, som vi tidigare inte hade någon erfarenhet av, i vilket man studerar mutationer i s k V79 hamsterceller. Det är en betydligt mer tids- och kostnadskrävande metod än Ames testet. Metoden används rutinmässigt på Wallenberg-laboratoriet vid Universitetet i Stockholm.

Den akuta giftigheten hos ett ämne kan klassas genom att man noterar vid vilken dos en testorganism dör av behandling under standardiserade betingelser. S k LD₅₀-försök (Lethal Dose, dödlig dos, för 50% av djuren) används t ex vid utprovning av läkemedel, bekämpningsmedel, livsmedelstillsatser m m. Vanligen används möss eller råttor. Viss information om relativ giftighet kan också erhållas genom att behandla cellkulturer under standardiserade betingelser.

Det har ansetts önskvärt att kunna bedöma den generella akuta toxiciteten hos vattenproverna. På Uppsala cytotoxikologiska laboratorium används ett celltoxicitetstest som utnyttjar humana celler (s k HeLa celler). Ett prov från varje rårmaterial under-

söktes där med detta standardiserade testsystem. I samband med mutagenitetstesterna med V79-celler gjordes även toxicitetstestning av dessa prover. Grov uppskattning av provens toxicitet gentemot bakterier erhöles även i samband med Ames-testningen.

3.2 Metodbeskrivningar för använda biologiska tester

3.2.1 Ames test

I detta test, som utvecklats av professor Ames i USA (Ames et al, 1975), utnyttjas speciella stammar av bakterien *Salmonella typhimurium*, som är speciellt känsliga för mutagena ämnen eftersom de har en lättgenomtränglig cellvägg samt saknar reparationsenzymerna för DNA-skador. Bakterierna är defekta för histidinsyntes och kan därför inte tillverka aminosyran histidin. När en återmutation (reversion) inträffar i den aktuella histidin-genen kan bakterien ånyo tillverka histidin och därigenom växa ut på histidinfritt medium. Spontant reverterar ungefär 1-5 bakterier av 10 miljoner (varierar mellan olika bakteriestammar) och man studerar i testet en ökning av mutantfrekvensen efter behandling med mutagena ämnen.

För att upptäcka indirekta mutagener, d v s sådana som måste metaboliseras för att bli aktiva, så tillsätts ett homogenat av råttlever, s k S9-fraktion. Denna är rik på skilda metaboliserande enzymer. Leverhomogenat (S9) från Sprague Dawley råttor användes. Råttorna hade förbehandlats genom injektion av 500 mg/kg av en PCB-blandning, Aroclor 1254, fem dagar före avlivningen. S9-blandning framställdes till varje försök av 0.1 ml S9/ml, magnesiumklorid, kaliumklorid, glukos-6-fosfat, NADP och natriumfosfat, pH 7.4. I undersökning av direktverkande mutagena ämnen användes fosfatbuffert i stället för S9-blandning.

Mutagentestet utfördes med plattningjutfningsmetoden enligt Ames et al (1975). Proverna testades med *Salmonella*-stammarna TA 98 (frame-shift mutant) och TA 100 (basparsubstitutionsmutant). Bakterierna odlades upp i näringsbuljong vid 37°C i 15 timmar före varje försök.

I 2 ml minimal toppagar med en spärmängd biotin och histidin tillsattes vid 45°C 0.1 ml bakteriekultur ($1-2 \times 10^8$ celler), testsubstans (0, 10, 20, 50, 100 µl) och 0.5 ml S9-blandning (50 µl S9) eller 0.5 ml fosfatbuffert, pH 7.4. Blandningen hälldes över minimal glukos agarplattor (2 plattor/dos). Antalet muterade bakterier (revertantkolonier) räknades efter 2-3 dagars (i de flesta fall 65 timmar) inkubering vid 37°C.

För varje prov uppritades en dos-responskurva för vardera TA 98 ± S9 och TA 100 ± S9, där varje punkt utgjordes av medelvärdet av antalet revertanter på de två parallella plattorna. Med hjälp av lineär regression genom minsta kvadratmetoden beräknades dos-responskurvans lutning, där antalet revertanter på varje platta behandlas som ett enskilt värde. Toxiska doser utelöts vid beräkningen. Provet mutagenitet (revertanter/µl) angavs av regressionslinjens lutning. För att avgöra om provet ska anses som mutagen eller ej användes kriteriet att regressionslinjens lutning med 99% sannolikhet skall vara skild från noll. För denna

hypotesprövning beräknas lutningens spridning med hjälp av den s k residualvariansen, som är ett mått på punkternas spridning runt regressionslinjen. Konfidensintervallet beräknas och hypotesprövningen görs med hjälp av t-test (Lindström, Medicinsk statistik). Beräkningarna gjordes med hjälp av ett dataprogram som tagits fram av Torsten Rehn och Sune Pettersson, då anställda vid SML.

Bakteriestammarna kontrollerades med avseende på karaktäristiska genetiska markörer enligt Ames et al (1975). Som positiva kontroller användes enstaka doser av 2-nitrofluoren för Salmonella TA 98 och TA 100 utan S9-tillsats samt även metylmetansulfonat (MMS) för TA 100. För indirekta mutagener användes bens(a)pyren för både TA 98 och TA 100 (med S9-tillsats).

3.2.2 V79-mutagenicitetstest

Till skillnad mot Ames-testet som detekterar återmutationer i en gen, så iakttas här s k "forward"-mutationer (framåtmutationer). I mutagenicitetstestet med V79-celler (lungceller från kinesisk hamster) mäts mutationer i den gen som kodar för enzymet hypoxantin-guanin fosforibosyltransferas (HGPRT). Detta enzym gör det möjligt att återanvända fria puriner för nukleinsyrasyntes genom att HGPRT katalyserar fosforibosylering av hypoxanthin och guanin. Om normala celler exponeras för en purin analog, 6-tioguanin (6-TG), så fosforibosyleras 6-TG och inkorporeras i nukleinsyror, varvid cellerna dör. Muterade celler med inaktivt HGPRT tar däremot inte upp 6-TG, utan utnyttjar i stället de novo syntesvägen för att syntetisera nukleosider. Härigenom överlever de 6-TG-behandlingen. För att detektera indirekta mutagener kan testsystemet kompletteras med tillsats av leverhomogenat, S9, på motsvarande sätt som i Ames-testet.

Den metodik som beskrivits av Jenssen (1984) tillämpades. Erfarenhet från användning av V79-mutagenicitetstest har sammanfattats av Bradley m fl (1981). V79-cellerna odlades i modifierad essential medium (MEM) med Earle's salt berikad med vissa tillsatssämnen (penicillin/streptomycin, glutamin, natriumpyruvat, icke essentiella aminosyror) samt 10% serum. I termostaten hölls 5% CO₂-atmosfär och 37°C.

Försöken startades genom att sätta 5 x 10⁵ celler till vardera 6-8 plattor (6 cm), en för varje dos, i 5 ml MEM-medium. Nästa dag byttes mediet till 4 ml HBSS⁺/Hepes (Hank's balanced salt solution med Hepes buffert). Efter 30 min tillsattes testämnet i olika koncentrationer, positiv kontroll (MMS) och negativ kontroll (DMSO). Efter 4 timmar avbröts behandlingen och saltlösningen byttes ut till nytt odlingsmedium.

För att förhindra kontaktinhibering och metaboliskt utbyte mellan muterade och icke muterade celler när de växer för tätt såddes cellerna om två gånger under expressionstiden som var 7 dagar. Cellerna lossades härvid från plattorna med trypsinbehandling och 1,5 x 10⁵ celler sattes ut på 9 cm plattor med 2 plattor per dos.

Toxiska effekter på grund av behandlingen med testsubstans studerades genom att dagen efter behandlingen i samband med omsättning av cellerna inokulera 3 plattor per dos med 100 celler vardera. Efter en vecka fixerades kolonierna med metanol och räknades.

Sju dagar efter behandlingen påbörjades selektering av mutanter. 1×10^5 celler och odlingsmedium innehållande 6-TG (1 mg/ml) sattes till 9 plattor (9 cm) för varje dos. Samtidigt utsattes 100 celler/platta (3 plattor per dos) för testning av kloningseffektivitet (cellernas förmåga att ge upphov till kolonier). Plattorna avlästes efter en veckas inkubering efter fixering och färgning av cellkolonierna. Antalet muterade celler relaterades till den procentuella kloningseffektiviteten, och mutantfrekvensen angavs alltså som antalet muterade celler per 10^5 kolonibildande celler.

3.2.3 Celltoxicitetstest/MIT-24

MIT-24 (Metabolic Inhibition Test) (Ekwall, 1983 a,b) utfördes på Uppsala cytotoxikologiska laboratorium. De celler som används härrör ursprungligen från en human livmodertumör. De har använts för att testa drygt 400 kemikalier (Ekwall 1983). HeLa-cellerna odlas kontinuerligt på glasflaskor i Parker's medium.

I testet används mikrotiterplattor som har 96 stycken 0.5 ml fördjupningar. Till varje fördjupning tillsätts 0.1 ml medium, 0.1 ml prov (2 identiska spädningsserier med 8 spädningsssteg på 1:5 användes för våra prover) och 0.1 ml HeLa-cellsuspension. Kontrollerna innehåller bara celler och medium. Kulturerna försluts med paraffin och plastfilm. Plattorna odlas i 37°C i 7 dagar.

Efter 24 timmar avläses plattorna i mikroskop. Spolformade celler uppkommer när cellerna börjar växa. Enbart runda celler indikerar total hämning av utväxt.

Efter 7 dagar analyseras toxicitet genom pH-förändring i mediet (indikator fenolrött). Violettt färg (pH 8.5) anses betyda total inhibition, röd (pH 7.5) delvis inhiberade celler och orange (pH 6.5) opåverkade celler.

3.2.4 Toxicitetstest/Ames

I toxicitetstest med Salmonella TA 100 användes Nutrient agar-plattor, där såväl muterade som omuterade bakterier växer ut. För vissa prover gjordes 10^{-6} spädning av en övernattskultur av bakterierna i 0.9% NaCl-lösning. Av denna behandlades 0,1 ml på samma sätt som i Ames-testet. Kolonierna räknades efter 48 timmars inkubering i 37°C och den procentuella avdödningsnoterades för de testade doserna.

I mutagentestet enligt Ames studerades regelmässigt bakgrundsväxten av icke-muterade bakterier i stereomikroskop. Dålig bakgrundsväxt indikerar toxiska effekter. Dos-responskurvornas utseende ger också upplysning om toxiska effekter när kurvan böjer av vid höga doser.

4 UNDERSÖKTA MATERIAL, METODER FÖR URLAKNING OCH ANRIKNING AV VATTENPROVER SAMT LITTERATURDATA ANGÄENDE MUTAGENICITETSTESTNING AV VATTEN

4.1 Undersökta material

De material som valdes för undersökning i projektet var följande (se tabell 1): rör av polyeten med hög och låg densitet (PEH, PEL), tvärbunden polyeten (PEX), polyvinylklorid (PVC), järnrör invändigt belagda med asfalt, cement och polyuretan (PUR) samt rör av glasfiberarmerad polyester (GAP) och glasfiberarmerad epoxi. Dessutom undersöktes fem olika gummipackningar. Som kontroll undersöktes använda lim (Tangit- och silikonlim). Vanligt vattenledningsvatten samt det destillerade vattnet undersöktes också.

4.2 Urlakningsförfarande

Som urlakningsvatten användes dels destillerat vatten, dels klorerat destillerat vatten som försatts med natriumhypoklorit till en total halt aktiv klor av 1 mg/l Cl_2 . En eller flera urlakningar om vardera 3 dygn i rumstemperatur gjordes med varje material.

Före urlakningen sköljdes materialproven med kranvatten under 1-2 timmar. Därefter sköljdes de med dest vatten.

50 m av PEH, PEL och PEX-rören urlakades. Vattnet pumpades från en vattenflaska innehållande 5-10 l vatten (täckt med svart skyнке), genom slangen och tillbaka till flaskan igen (Se figur 1). Pumpen och flaskan kopplades ihop med en bit PEH-slang (10 cm) och tätades med silikonlim.

Tre delar PVC-rör, total längd 8 m, hopkopplades med PVC-hörkopplingar. För limning användes för PVC avsett Tangit-lim. För att kunna ansluta PVC-rören till flaskan och pumpen användes PEH-slangbitar.

För urlakningen av PEH-, PEL-, PEX- och PVC-rör fylldes systemet med vatten (totalt ca 15-25 l). Vattnet cirkulerade med ett flöde av 12,5 l/min.

Beträffande de grövre rören så förslöts rören ändar med aluminiumskivor som limmades fast med silikonlim. Sidoplåtarna var försedda med kranar för påfyllning och avtappning av vattnet. 1-3 m rör (asfalt, cement, epoxi, GAP, PUR) urlakades med 10 l vatten. Rören roterades med hjälp av två gummiringar i ett för ändamålet uppbyggt stativ (se figur 1). Järnrören belagda med asfalt, cement och PUR roterades 10,6 varv/min; epoxirören 7,0 varv/min och GAP-rören 3,1 varv/min.

Tangit-lim och silikon, vilka användes för tätning av rörsystemen, testades separat. Prover bereddades genom att ett skikt av limmet ströks ut på inre väggen av en glasbägare (Tangit 2,3 dm^2 , silikon 2,7 dm^2). Bägaren fylldes med 1 l dest vatten som omrördes med hjälp av magnetomrörare.

Gummipackningar, som används för vattenrör, undersöktes också. Packningarna klipptes i små bitar, vilka fick stå i 1 l dest vatten under omrörning.

4.3 Metoder för koncentrerings av vattenprover

Det finns flera tänkbara sätt för att koncentrera vattenprover. I princip kan man skilja mellan att avlägsna vattnet och att avskilja organiska ämnen från vattnet. Olika metoders för- och nackdelar har sammanfattats av bl a Jolley (1981).

Koncentrationsmetoder innefattar t ex vakuumdestillation, frystorkning och omvänd osmos. Dessa metoder fordrar särskild apparatur, och kan vara ohanterliga för stora volymer vatten. Med de två förstnämnda metoderna förloras flyktiga ämnen vid koncentreringsen. Alla tre metoderna har den nackdelen att oorganiska salter också anrikas vilket kan ge upphov till ett koncentrat som är toxiskt vid efterföljande biologisk testning.

Organiska ämnen kan isoleras från vattnet med olika metoder, såsom gas-"stripping", lösningsmedelsextraktion och adsorption på aktiverat kol, polymer adsorbent eller jonbytare. S.k. "stripping" har använts i stor utsträckning för analys av flyktiga föreningar i vatten, t ex trihalometaner. En inert gas blåses då över eller genom vattenprovet och för med sig flyktiga ämnen som sedan ansamlas på en adsorbent. Extraktion med lösningsmedel är en relativt specifik metod, genom att olika ämnesklasser kräver olika betingelser för att extraheras. Om inte särskild apparatur används för kontinuerlig extraktion så är metoden hanterlig endast för mindre vattenvolymer. Adsorption på aktiverat kol är en vanlig metod för vattenrening. Många ämnen kan dock fastna så hårt att de sedan inte lossnar vid efterföljande eluering med lösningsmedel. Även kemiska omvandlingar kan ske på kolet (Kopfler et al, 1977). Ett problem med jonbytare är att elueringsmedlet på något sätt måste anrikas med avseende på organisk substans.

Den polymera adsorbenten Amberlite XAD (tillverkare Rohm och Haas) avskiljer olika klasser av organiska ämnen från vatten. Junk et al (1974) redovisar ett genomsnittligt utbyte på 78% när 110 ämnen av olika typer undersöktes. Alla analyser gjordes med gaskromatografi. XAD finns i två olika typer. Styren-divinylbensen polymer (XAD-2 och XAD-4) har hög affinitet för icke-polära, hydrofoba, ämnen. Akrylester polymer (XAD-7 och XAD-8) är mer effektiv för polära, hydrofila, ämnen än XAD-2 och XAD-4. XAD-4 och XAD-8 har mindre kornstorlek än XAD-2 och XAD-7. En noggrann genomgång av dessa och andra organiska polymerers egenskaper har gjorts av Dressler (1979). Rossum och Webb (1978) har systematiskt jämfört XAD-2, -4, -7 och -8 enskilt och i kombination med avseende på adsorption av 13 olika vattenföreningar. En kombination av lika delar XAD-4 och XAD-8 befanns ge det bästa utbytet (i genomsnitt 76%).

Eftersom främst odissocierade organiska ämnen adsorberas på XAD, så kan utbytet av t ex organiska syror ökas genom att surgöra vattnet före adsorptionen (Junk et al 1974). Basiska ämnen borde på motsvarande sätt adsorberas bättre efter alkalisering av

vattnet. Noordsij et al (1983) har föreslagit adsorption både vid pH 2, 7 och 9 för isolering och identifiering av organiska ämnen och toxikologisk testning. Gaskromatografisk analys av 17 olika organiska ämnen visade att lipofila ämnen adsorberades till 80-100% på XAD-4 vid pH 7. Svagt hydrofila ämnen adsorberades till 50-100% vid pH 2 (Noordsij et al 1983). Långt ifrån alla naturligt förekommande organiska ämnen adsorberas på XAD. Så t ex passerade ca 90% av humusinnehållet i källvatten igenom XAD-2 vid neutralt pH, uppmätt genom färgmätning (Carlberg, 1982). Mätning av totalt organiskt kol, TOC, i vatten före och efter adsorption på XAD-2 har också visat att huvuddelen passerar igenom. Detta har föranlett Tye et al (1981) i England att ej rekommendera XAD för isolering av mutagena ämnen. Kool et al (1981a) har dock visat att lika mycket mutagena ämnen isoleras med denna metod som med frystorkning, trots den låga totala adsorptionen av organiskt material. Lättflyktiga ämnen fastnar i viss utsträckning, men går sannolikt förlorade i efterföljande behandling. En annan nackdel med XAD-2 är att polymeren släpper små mängder aromatiska kolväten, vilket har hävdats göra metoden olämplig för analys av spårmängder (< 1 ppb) av organiska ämnen i vatten (Care et al 1982).

4.4 Metoder använda vid mutagenicitetstestning av vattenprover samt erhållna resultat (Litteratursammanställning)

De senaste åren har flera forskargrupper presenterat resultat från undersökningar av mutagenicitet i råvatten, dricksvatten och avloppsvatten. Sammanställningar finns gjorda av Loper (1980) och Alink (1982).

En forskargrupp i USA (Loper et al 1978) har använt den kanske mest avancerade metoden för koncentrering och fraktionering av stora mängder vatten (flera tusen liter), ursprungligen utvecklad av Kopfler et al (1977). Genomsnittligt utbyte anges till 36% enligt TOC-analys. Metodens första steg är omvänd osmos vid olika pH och olika membran. De båda uppkomna koncentraterna extraheras med pentan vid pH 7 och metylenklorid vid pH 7 och pH 2. Restande vattenfas (pH 2) adsorberas sedan på XAD-2. Subfraktioner framställs genom extraktion med lösningsmedel av olika polaritet. Mutagenicitet i Ames test påvisades i någon eller några fraktioner av dricksvattenprov från sex olika städer, där mutageniciteten i de flesta fall var oberoende av metaboliserande system. Även s k transformationstest med BALB/3T3 celler in vitro var positivt (Lang et al, 1980).

Gruener (1978) har i ett arbete använt destillation vid lågt tryck och låg temperatur av delvis renat avloppsvatten, vilket blev mutagent i Ames test efter ozonering. Sådant vatten har i ett annat arbete koncentrerats 1 000 ggr med omvänd osmos (Gruener och Lockwood 1979). Koncentratet var mutagent i V79 hamsterceller endast efter metabolisk aktivering samt gav även upphov till cellulär transformation i humana lungfibroblaster. Frystorkning har använts för koncentrering i ett senare arbete av Gruener och Lockwood (1980) som med denna metod koncentrerade dricksvatten från New Orleans 1 000 ggr. Koncentratet var mutagent i V79 hamsterceller, endast efter metabolisk aktivering.

Även Forster och Wilson (1981) och Abdelghani et al (1982) har med denna koncentrationsmetod detekterat mutagener i dricksvatten. Frystorkning har också använts av Packham et al (1981) i England. Författarna anger "hög" mutagenicitet med flodvatten på Salmonella både med denna metod och XAD-adsorption. Kool et al (1981a) har jämfört frystorkning med XAD-4/8 adsorption, och funnit att XAD ger ett minst lika mutagent koncentrat, trots att endast en liten del av allt organiskt material fastnar på kolonnen (< 10%).

Extraktion med lösningsmedel har använts i två arbeten. Marouka och Yamanaka (1980) extraherade 10-20 l förorenat sjö- och flodvatten samt grundvatten med dietyleter. Grundvattnet var inte mutagent på Salmonella varken utan eller efter klorering. Sjövattnet var mutagent endast efter klorering och utan metabolisk aktivering (Salmonella TA 100). Flodvattnet var mutagent med och utan metabolisk aktivering (främst med Salmonella TA 98). Effekten ökade efter klorering. Grabow m fl (1981) extraherade 5 x 20 l dricksvatten, flodvatten och renat avloppsvatten med diklorometan vid neutralt pH, pH 2 och pH 12. Denna metod jämfördes med adsorption på XAD-2, efterföljt av XAD-7. Sett utifrån resultatet från samtliga 29 vattenprover gav extraktionsmetoden i de flesta fall ett bättre utbyte av mutagena ämnen än XAD-adsorptionen.

Schwartz m fl (1979) har koncentrerat 30 l råvatten och 60 l dricksvatten från tre olika städer i USA genom adsorption på kolonner fyllda med polyuretanskum. Eluatet testades i konventionellt Ames test. Samtidigt testades okoncentrerade vattenprover på ett annat sätt genom att 1-20 ml inkorporerades direkt i bottenagarn i Ames-testet. Med okoncentrerade vattenprover från två av städerna påvisades mutagenicitet med Salmonella TA 100, men ej med TA 98. Denna studie är av särskilt intresse för BFR-projektet eftersom en ökning av direktmutagena ämnen iaktogs i vattnet vid tappställe på nätet jämfört med prov taget på vattenverket. Polyuretanextrakten var ej mutagena med TA 100, men däremot var ett prov från distributionsnätet mutagent med TA 98 efter metabolisk aktivering (ej med okoncentrerat vattenprov). Resultaten tolkades av författarna som att distributionsnätet ger upphov till mutagena ämnen i vattnet, antingen genom reaktion mellan klor och organiska ämnen, mikrobiologisk växt eller urlakning från rörledningsmaterial och tankar. Ämnena bedömdes vara av två olika klasser, dels troligen lågmolekylära polära direktmutagena ämnen som inte fastnar på polyuretanskum dels högmolekylära opolära indirekt mutagena ämnen som kan anrikas på polyuretan.

Baird et al (1980) har använt ett kombinerat system bestående av en anjonbytare, en katjonbytare och två XAD-kolonner (XAD-2 och XAD-7). Extrakt från 100 l renat avloppsvatten var mutagent, främst med TA 98.

Övriga forskargrupper har använt sig av koncentrerings genom adsorption på XAD, i ett fall efter fraktionering efter molekylvikt med ultrafiltrering (Fallon och Fliermans 1980). Vad gäller undersökningar av dricksvatten så har sådana utförts i USA av en forskargrupp (Glaz et al 1978, Chriswell et al 1979 och Grimm-Kibalo et al 1981). De har använt XAD-2 i serie med Filtrasorb 200 (aktiverat kol) eller enbart XAD-4. I ett senare arbete har

också Loper et al (1982) använt enbart adsorption på XAD (2/7) i stället för den tidigare refererade metoden med omvänd osmos i kombination med lösningsmedelsextraktion och XAD-adsorption (Loper et al 1978). I Canada har en grupp (Nestmann et al 1979, 1982; Williams et al 1982) på motsvarande sätt undersökt dricksvattnet i flera städer efter adsorption på XAD-2. Undersökningar av dricksvatten efter adsorption på XAD-2 är även gjorda i Grekland (Athanasios och Kyrtopoulos 1983) och Sydafrika (van Rossum et al 1982). I det senare arbetet jämfördes först adsorption på XAD-2, aktivt kol samt svaga respektive starka katjon- och anjonbytare. Endast XAD-2 gav ett mutagent extrakt. Undersökningar av dricksvatten i Holland har gjorts av två forskargrupper, där den ena (van der Gaag 1982) använt adsorption på XAD-4 och den andra använt en kombination av XAD-4 och XAD-8 (Kool et al 1981b, 1981c; 1982, Zoeteman et al 1982, Kool et al 1984).

En slutsats av resultaten från undersökningar av mutagenicitet i dricksvatten med Ames test är att förorenade råvatten kan uppvisa mutagen effekt på *Salmonella* TA 98 och TA 100, främst av sådana ämnen som fordrar metabolisk aktivering. Denna mutagenicitet minskar vid reningen på vattenverket. I stället kan som följd av kloreringen uppkomma direktmutagena ämnen som i de flesta fall är mest aktiva med TA 100. Att klorering ger upphov till direktmutagena föreningar har även visats i laboratorieskala genom klorering av vatten (Cheh et al 1980, Maruoka och Yamanaka 1983) och klorering av humusämnen (Meier et al 1983). Cheh et al (1980) visade att deklorering av dricksvattnet med sulfid kraftigt reducerade den mutagena aktiviteten.

Beträffande mutagentestning med andra organismer än *Salmonella*-bakterier har som tidigare nämnts Gruener och Lockwood (1980) visat att koncentrerat dricksvatten från New Orleans varit mutagen med V79 hamsterceller efter metabolisk aktivering. Vattnet från New Orleans samt fyra andra amerikanska städer har vidare undersökts av Loper et al (1978) och Lang et al (1980) vilka visade att vattenkoncentratet gav celltransformation in vitro (BALB/3T3 celler). Bull et al (1982) har undersökt samma vattenprover som Lang et al (1980) i hudpenslingsförsök på möss, varvid signifikant ökning av frekvensen hudtumörer uppkom med ett av vattenkoncentratet. XAD-extrakt från Atens dricksvatten inducerade systemkromatidutbytet och kromosomabberationer av kromatidtyp i CHO-celler förutom mutation i *Salmonella* (Athanasios och Kyrtopoulos 1983). Härutöver har DeMarini et al (1982) gjort mutagenicitetstester med okoncentrerat eller 10 ggr koncentrerat dricksvatten med hjälp av sporer från mögelsvampen *Neurospora crassa*, med jästsvampen *Saccaromyces cerevisiae* och med växten *Zea mays*. Inga mutagena effekter påvisades. Råvatten var i ett okoncentrerat vattenprov mutagen med *Zea mays*. Endast detta vattenprov var mutagen på *Salmonella* (TA 1536 + S9) efter 250 gångers koncentring. Ett annat arbete av samma grupp (Heartlein et al 1981) har visat mutagen effekt med *Salmonella* TA 98 och TA 100 med samma rå- och renvatten, insamlat senare och betydligt kraftigare koncentrerat (med XAD-2).

Inga enskilda ämnen har hittills kunnat identifieras som ansvariga för mutageniciteten i klorerat dricksvatten (Loper 1980, Chriswell 1979, Kool et al 1982). Enligt Kool et al (1982) finns

mutageniciteten främst bland svagt polära, icke-flyktiga ämnen och kan därför enligt författarna inte vara klorerade alifatiska estrar, vilket föreslagits av Tabor och Loper (1980). Dricksvattnet i Cincinatti, USA, har koncentrerats med omvänd osmos enligt den metod som refererats tidigare (Loper et al 1978, Kopfler et al 1977). Pentan- och metylenkloridextrakten slogs ihop och avvattnades. Ett dietyleterextrakt av detta koncentrat, som var mutagent i Ames test, fraktionerades vidare och analyserades med gaskromatografi-masspektrometri. Så mycket som 460 olika organiska föreningar identifierades, de flesta i halter motsvarande mindre än 10 ppb i ursprungsvattnet (Coleman et al 1980).

Några forskargrupper har undersökt olika faktorerers betydelse för utbytet av mutagena substanser vid adsorption på XAD. Chriswell et al (1979) undersökte kolonner med 16 olika adsorbenter parallellt för koncentrerings av dricksvatten. Materialen var Amberlite XAD-2, -4, -7 och -8, Duolite S-761 (en fenol-formaldehydabsorbent), Duolite L-863 som liknar XAD-2 och XAD-4, tre typer av anjonbytare samt sju olika typer av aktiverat kol. Ingen mutagenicitet påvisades med anjonbyttarna eller aktiverat kol. XAD-4 gav det högsta utbytet efter eluering med dietyleter. Van Rossum et al (1982) som använt XAD-2 anger att en andra adsorption på XAD-7 gav lägre mutagenicitet än en andra adsorption på XAD-2. Kool et al (1981 a och b) konstaterar att, enligt deras resultat, XAD-2 och en kombination av XAD-4 och XAD-8 ger ungefär samma resultat. Med XAD-4/8 visades att huvuddelen av de mutagena ämnena i flodvatten adsorberas vid neutralt pH och endast en mindre del vid efterföljande adsorption vid pH 3. Ingen ytterligare mutagenicitet erhöles efter påföljande adsorption vid pH 10. I en senare studie visades att mutagena ämnen som adsorberas vid pH 2-3 förekommer också i dricksvatten (Kool et al 1982). Van der Gaag et al (1982) erhöles mer mutagenicitet vid adsorption på XAD-4 vid pH 2 än vid pH 7.

Ett flöde av vattenprovet genom XAD-kolonnen av 2-4 bäddvolymer per minut rekommenderas av Kool et al (1981a) som optimalt för adsorptionen, medan van der Gaag et al (1982) rekommenderar 1 bäddvolym/min.

Beträffande eluering av XAD-kolonnen med olika lösningsmedel har aceton och DMSO jämförts och befunnits likvärdiga, medan dietyleter endast eluerade ut en mindre del (< 20%) av den bundna mutagena aktiviteten (Kool et al 1981a, b, c).

Någon systematisk jämförelse mellan olika lösningsmedel för eluering av XAD i samband med mutagenicitetstestning har annars inte påträffats i litteraturen. Kool och medarbetare (1981, 1982, 1984) har använt DMSO (eller aceton), van der Gaag och medarbetare (1982) etanol följt av cyklohexan/etanol blandat, Loper och medarbetare (1978) etanol, Marouka och Yamanaka (1980, 1983) samt Glaz och medarbetare (Glaz et al 1978, Chriswell et al 1979, Grimm-Kibalo et al 1981) eter och i det senaste arbetet eter följt av etanol, Nestmann och medarbetare (Nestmann et al 1979, 1982, Williams et al 1982) samt Athanasiou och Kyrtopoulos (1983) hexan/aceton blandat, Fallon et al (1981) aceton följt av eter, Cheh (1980) aceton följt av metylenklorid samt Hartlein och

medarbetare (Hartlein et al 1980, DeMarini et al 1982), Neeman (1980), Grabow et al (1981), Rappaport (1979) och van Rossum et al (1982) enbart aceton.

4.5 Den koncentrationsmetod som använts i projektet

Efter såväl praktiska som teoretiska överväganden valdes XAD för anrikning av eventuella mutagena föreningar i urlakningsvattnen. Det största utbytet bedömdes kunna uppnås med en 1:1 blandning av XAD-4 och XAD-8. För att i möjligaste mån även anrika polära föreningar gjordes adsorptionen först vid urlakningsvattnets pH-värde (ca 6), sedan på en ny kolonn efter höjning av vattnets pH-värde med NaOH till 12 och slutligen genom en tredje kolonn efter sänkning av pH-värdet med HCl till 2.

Före användning tvättades XAD-kornen 10 ggr med 0,1 M NaOH och 10 ggr med 0,1 M HCl, följt av destillerat vatten tills neutralisering erhöles, och sköljdes sedan med metanol. Efter tvättningen följde Soxhletextraktion under vardera 16-24 h med metanol och aceton. XAD:n tvättades sedan med metanol och förvarades i metanol i rumstemperatur (modifierad metod enligt Noordsij et al 1983).

20 ml XAD-4/8 packades i glaskolonner (1,2 x 25 cm). Efter tvätt med dest vatten fick urlakningsvattnen rinna igenom med självtryck i kylrum vid 15°C (flöde 5-30 ml/min). Varje adsorption tog 1-2 dygn (sammanlagt alltså 3-6 dygn för de tre olika pH-adsorptionerna för varje vattenprov).

Det mesta av vattnet i kolonnerna blåstes ut med kvävgas. Kolonnerna eluerades sedan med 60 ml aceton (flöde 10-20 ml/min). Eluatet torkades med 30 g molekylsiktat (3 Å) (Merck) under 2-3 timmar, filtrerades genom pappersfilter och indunstades på rotationsindunstare vid 30°C. Indunstningen fortsatte med kvävgas vid 37°C till nästan torrhet. Proverna från varje pH-fraktion späddes upp till 1 ml med DMSO och förvarades vid -20°C för mutagenicitets- och toxicitetstester. Den första omgången av PEH-slang samt den första urlakningen av första omgången PEX-slang lakades endast ur vid pH 6. Den andra urlakningen av första omgången PEX-slang samt den första omgången PUR- och PVC-rör lakades endast ur vid pH 6 och pH 2 (ej pH 12). Dessa enstaka pH-fraktioner späddes till 2 ml och testades enbart separat.

Extraktet från limmen och gummipackningarna koncentrerades på 10 ml XAD-4/8, endast vid pH 6. Koncentreringen fortsattes som ovan.

Se figur 2 för sammanfattning av extraktions- och koncentrationsförfarandet.

5 RESULTAT FRÅN UNDERSÖKNING AV DE OLIKA MATERIALLEN MED AMES TEST

Varje rör lakades ur med dels vanligt destillerat vatten, dels klorerat sådant (1 mg/l totalt aktivt klor vid urlakningens början). Av GAP-rören testades tre olika tillverkningar. PEH, PEX, PUR och PVC skaffades hem vid två olika tillfällen och testades två gånger med dest vatten. Extrakt från en eller flera urlakningar testades med Salmonella TA 98 och TA 100 med doserna 0, 10, 20, 50 och 100 µl (200 µl i några fall). I bilagan, figur 3-19, presenteras försöksresultaten i form av kurvor där medelvärdet av antalet revertanter på de båda parallella plattorna är avsatta för varje dos av sammanslaget extrakt från XAD-adsorptionerna vid pH 6, 12 och 2 (1 ml extrakt av vardera). För den första omgången av PEH- och PEX-slangar samt PUR- och PVC-rör som lakades ur med destvatten testades bara de enstaka pH-fraktionerna separat (2 ml extrakt av pH 6 och pH 2 fraktion). GAP-rören testades både avseende sammanslaget extrakt och i två fall de enstaka pH-fraktionerna (1 ml vardera av pH 6, pH 12 och pH 2 fraktioner). I några fall koncentrerades extrakten från det andra urlakningsvattnet till 0,5 ml av vardera pH-fraktionen (1,5 ml sammanslaget prov i stället för 3 ml).

De kurvor som enligt regressionsanalys har en lutning som med 99% statistisk sannolikhet är skild från noll (se avsnitt 3.2.1) är heldragna, medan de icke-signifikanta har streckats. I vissa fall har den högsta dosen (100 µl) givit misstänkt toxiska effekter. Regressionslinjen har då beräknats både med och utan den dosen. Resultaten har sammanfattats i tabell 2 och 3 där statistiskt signifikanta resultat har angetts dels som antalet revertanter per µl extrakt, dels efter omräkning som antalet revertanter per dm² exponerad yta av materialet. Nedan diskuteras resultaten material för material. Eventuella toxiska effekter på Salmonella bakterierna kommenteras också.

5.1 Asfalt (Figur 3)

5.1.1 Destillerat vatten

Ingen mutagen effekt påvisades med det första urlakningsvattnet. Med dosen 100 µl var extraktet något toxiskt med TA 100 utan S9 (30% överlevnad). Det andra urlakningsvattnet dubbelkoncentrerades och testades också för mutagenicitet. Inte heller då påvisades någon mutagenicitet.

5.1.2 Klorerat destvatten

En svag, men signifikant, mutagenicitet erhöles med det första urlakningsvattnet med TA 98 utan S9, men var inte signifikant vid upprepad testning. Med dosen 100 µl var extraktet svagt toxiskt med TA 100 utan S9 (50% överlevnad). Det andra urlakningsvattnet var inte mutagent. Vi betraktar det positiva resultatet från det första urlakningsvattnet som möjligen beroende på en slumpmässig fördelaktigt liten spridning av punkterna runt regressionslinjen (vid första testningen med TA 98 utan S9, se figur 3).

5.1.3 Kommentarer

Asfalt har en ospecificerad sammansättning, som kan tänkas släppa polyaromatiska kolväten (PAH) till vatten. Flera PAH är cancerogena och mutagena.

Bens(a)pyren, som är en starkt mutagen PAH ger tydligt utslag i Ames-testet för 1 µg per platta med TA 98 eller TA 100 med S9-tillsats (tabell 4). Med den använda statistiska metoden skulle dock sannolikt även 0,2 µg per platta som högsta dos ge signifikant mutagenicitet utifrån en dos-responskurva. Eftersom ingen mutagenicitet erhöles med dosen 100 µl per platta skulle detta betyda att provet (3 ml extrakt) totalt innehöll mindre än ca 6 µg B(a)P. Om röret varit helt fyllt skulle det (tabell 1) innehålla 16 l vatten, vars koncentration då skulle vara mindre än $6:16 = 0,37$ µg/l B(a)P, vilket alltså är metodens detektionsgräns. Världshälsoorganisationen, (WHO, 1984) rekommenderar 0,01 µg/l B(a)P som hygieniskt gränsvärde för dricksvatten. Den genomsnittliga uppehållstiden i ett normalt vattenledningsnät kan uppskattas till ca 1/2 dygn (Jan Hjort, Stockholms VA-verk, pers kommunikation). I urlakningsförsöken är uppehållstiden 3 dygn. För en mera rättvis jämförelse med situationen i ett distributionsnät bör därför siffran 0,37 µg/l B(a)P divideras med 6, vilket ger den teoretiska koncentrationen efter 1/2 dygns urlakning, 0,06 µg/l B(a)P. Med hänsyn tagen till aktuella flöden och yta:volymförhållanden i faktiska rörledningsnät skulle halter av en storleksordning som motsvarar det hygieniska gränsvärdet 0,01 µg/l kunna detekteras (se vidare tabell 7 samt diskussion i avsnitt 8 och 10). Diskussionen visar att den använda testmetodiken har en lägre känslighet än kemisk analys för att spåra vissa enskilda ämnen. Känsligheten kan dock, åtminstone vad gäller bens(a)pyren, anses tillfredsställande med tanke på att testsituationen är extrem jämfört med förhållandena i ett rörledningsnät.

5.2 Cement (Figur 4)

5.2.1 Destillerat vatten

Liksom för asfaltröret påvisades ingen mutagenicitet vid urlakning med dest vatten. Det oklorerade vattnet var inte heller toxiskt för bakterierna.

5.2.2 Klorerat destillerat vatten

Det klorerade vattnet var signifikant mutagent med TA 98 både med och utan S9-tillsats. Det klorerade vattnet var starkt toxiskt utan S9 med TA 100 i dosen 100 µl (1,5% överlevnad) och toxiskt även i dosen 50 µl (17% överlevnad). Med S9 var dosen 100 µl också något toxisk (31% överlevnad).

Det andra klorerade urlakningsvattnet dubbelkoncentrerades och gav då fortfarande signifikant mutagenicitet med TA 98 med S9.

5.2.3 Kommentarer

Eftersom mutagenicitet påvisades även i det andra klorerade urlakningsvattnet bedömer vi att det undersökta cementröret verkligen lakade ur ämnen som i samband med kloreringen bildade mutagena produkter av den typ som ger upphov till s k frameshift mutationer. Resultatet var oväntat, och vilka dessa ämnen kan ha varit vet vi inte.

5.3 Glasfiberarmerad epoxi (Figur 4)

Dessa rör undersöktes på uppdrag av en läkemedelsindustri som använder sådana i sin tillverkning och alltså inte för dricksvattendistribution. Undersökningen faller således egentligen utanför projektets ram, men resultaten anges ändå här eftersom de kan ha visst intresse. Urlakningen gjordes endast med destvatten. Ingen signifikant mutagenicitet påvisades.

5.4 Glasfiberarmerad polyester (GAP) (Figur 5-9)

5.4.1 Tillverkningssats nr 1 (A) (Figur 5-8)

5.4.1.1 Destillerat vatten

Det destillerade vattnet var starkt mutagent med TA 100 utan S9-tillsats, men däremot inte mutagent med S9-tillsats. 100 µl dosen var utifrån dosresponskurvorna möjligen toxisk på TA 100 med S9. Den andra urlakningen gav ett något mindre mutagent extrakt med TA 100 utan S9 än det första urlakningsvattnet. Mutagenicitet detekterades också med TA 100 med S9 om 100 mikrolitersdosen uteslöts, som möjligen var något toxisk. Med det tredje urlakningsvattnet testades såväl de enskilda pH-fraktionerna som sammanslaget prov på TA 100 utan S9. Endast det första extraktet, från absorptionen på XAD vid pH 6, var mutagent och motsvarade ungefär mutageniciteten i det sammanslagna provet, som var lägre än från de två första urlakningarna. En fjärde urlakning under tre dygn gjordes också med samma rör. Detta vatten användes för att undersöka om ordningsföljden på XAD-adsorptionerna vid olika pH-värden är av betydelse för i vilken fraktion mutageniciteten påvisas. Därför gjordes adsorptionerna i omvänd ordning mot i samtliga andra fall, nämligen först vid pH 12, sedan pH 2 och sist pH 6. Det visade sig att den högsta mutageniciteten erhöles vid den första adsorptionen, vid pH 12, och resten i nästa adsorption, vid pH 2. Detta resultat tillsammans med resultatet från den tredje urlakningen visar att den eller de mutagena ämnen som lakades ur från materialet huvudsakligen fastnade vid den första adsorptionen oberoende av pH. Detta indikerar att mutagenerna inte varit några starka syror eller baser utan relativt opolära ämnen. För detta material hade det därför varit tillräckligt att göra endast en XAD-adsorption vid neutralt pH. Huruvida detta gäller även för övriga material är dock svårt att uttala sig om, eftersom endast låg eller ingen mutagenicitet påvisades från dem och eftersom man inte har någon kunskap om vilka mutagena ämnen som kan lakas ur från olika material.

Det sammanslagna extraktet från det fjärde urlakningsvattnet var mer mutagent än från det tredje urlakningsvattnet. Även om det första urlakningsvattnet var mest mutagent så tyder därför inte resultaten på någon snabb avklingning i urlakningen av mutagena substanser.

5.4.1.2 Klorerat destvatten

Till skillnad mot urlakningen med oklorerat vatten, så var extraktet av det klorerade vattnet från första urlakningen mutagent med båda bakteriestammarna både med och utan S9-tillsats (med TA 98 + S9 efter uteslutning av 100 µl dosen). Den högsta aktiviteten var dock även i detta fall med TA 100 utan S9, högre än det med oklorerat vatten. Även påföljande två urlakningar var starkt mutagena med TA 100 utan S9. Från det andra urlakningsvattnet undersöktes de enskilda pH-fraktionerna separat. Endast den första adsorptionen, vid pH 6, gav ett mutagent extrakt.

Proven visade ingen hög bakterietoxicitet. Klordoseringen var i dessa försök 2 mg/l Cl₂. I nedan refererade försök med andra GAP-rör var klordoseringen dock bara 1 mg/l Cl₂ i likhet med test på övriga material.

5.4.2 Tillverkningsats nr 2 (B) (figur 9)

Eftersom det första GAP-röret gav ett så mutagent urlakningsvatten erhöles ett nytt rör för testning från fabriken. Tillverkningen uppgavs vara densamma men med längre efterhärdningstid vid högre temperatur. Här kan dock anmärkas att det första röret stod på laboratoriet i tre månader innan det undersöktes.

5.4.2.1 Destillerat vatten

Två urlakningar gjordes med destillerat vatten. Statistiskt signifikant, men låg, mutagenicitet erhöles med TA 100 med S9-tillsats i båda urlakningarna samt med TA 100 utan S9 i första urlakningen.

5.4.2.2 Klorerat destvatten

Det första urlakningsvattnet var mutagent med TA 100 utan S9. Låg mutagenicitet erhöles även med TA 98 med S9 tillsats. Det andra urlakningsvattnet var dock endast mutagent med TA 100 med S9-tillsats. Denna skillnad i resultat mellan första och andra urlakningsvattnet kan vi inte förklara, och försöken kunde heller inte upprepas eftersom extrakten gått åt vid första testningen. Inga bakterietoxiska effekter kunde ses utifrån dos-responskurvornas utseende.

5.4.3 Tillverkningsats nr 3 (C) (figur 9)

5.4.3.1 Destillerat vatten

För att undersöka om en viss ingrediens vid tillverkningen av GAP-rören förorsakat den mutagena effekten specialtillverkades rör med modifierad sammansättning. På grund av en skada vid transporten kunde endast ett rör undersökas (med oklorerat destvatten).

Urlakningsvattnet var mutagent med TA 100 utan S9 och med TA 98 utan S9.

5.4.4 Kommentarer

I urlakningsförsöken erhöles den högsta mutageniciteten med Salmonella TA 100 utan metaboliserande system (S9), förutom vid tillverkningsats C, där något högre mutagenicitet erhöles med TA 98 utan S9. Resultaten pekar i första hand på förekomst av relativt opolära, neutrala, direktmutagena ämnen som ger upphov till punktmutationer (i tillverkningsats 3 även frame-shift-mutationer). Kloreringen gav upphov till mutagena ämnen eftersom mutageniciteten med TA 100 utan S9 var högre i de klorerade än de oklorerade urlakningsvattnen, och dessutom mutagenicitet detekterades med TA 98.

Kemiska analyser av urlakningsvattnen från likadana GAP-rör som testades här har påvisat styren och ftalsyra (Eva Willquist, Willquist Konsult AB, personlig kommunikation). Dessa ämnen kan dock inte ha förorsakat mutageniciteten, eftersom styren endast är mutagent efter metabolisk aktivering och ftalsyra inte är mutagent. Ames test utfördes därför på tre av de ingående ingredienserna, nämligen härdaren som är en organisk peroxid, acceleratoren (koboltoktalat) samt antiskummedlet (polymetylsiloxan). Resultaten redovisas i figur 22 och 23. Högre doser av härdaren och acceleratoren än de som redovisas testades också, men dessa var toxiska för bakterierna. Härdaren visade en svag men signifikant mutagenicitet gentemot Salmonella TA 98 utan S9-tillsats. Medelvärde från första och andra testningen var 0,1 revertanter/nl, vilket motsvarar ca 0,1 rev/ μ g av härdaren. Peroxiden är alltså endast svagt mutagen med de använda testbakterierna. Den kan i varje fall inte ha varit upphovet till den påvisade mutageniciteten i urlakningsvattnen från GAP (A) och (B) rören, eftersom mutagenicitet där endast påvisades med Salmonella TA 100. Urlakningsvattnet från GAP (C) röret var dock svagt mutagent med TA 98 utan S9-tillsats. Denna mutagenicitet, medelvärde 0,69 rev/ μ l extrakt motsvarar $0,69 \times 3000 : 196 = 10$ revertanter per liter vatten om röret varit helt fyllt. Mutageniciteten skulle alltså kunna bero på härdaren om denna använts i detta material, förutsatt att härdaren kan tänkas urlakas till en koncentration av 100 μ g/l vatten i ett fyllt rör.

Det går inte att utifrån våra resultat säga vad som orsakade mutageniciteten från GAP-rören. Troligen har dock mutageniciteten samband med härdaren, eftersom en effektivare härdning, rör B,

gav mycket lägre mutagenicitet än det först undersökta röret (rör A). En längre uthärdningstid, motsvarande den som använts för rör B, tillämpas enligt tillverkarans numera vid framställningen.

Eventuella problem med GAP-rör har uppmärksamats i samband med att en längre huvudledning installerades i Görvälnverkets distributionsområde (kommunerna norr om Stockholm). Vattnet hade en speciell lukt som dock inte med säkerhet kunde hänföras till den nyanlagda ledningen. Gaskromatografisk analys på vattnet före och efter ledningen visade att ett flertal ämnen tillfördes vattnet i låga halter från ledningsmaterialet (ca 5-10 ng/l). Halterna av etyl-, metyl-, och trimetylbensen, xylen, toluen och styren var vid första provtagningen högre (mer än 50 ng/l). Vid förnyad provtagning ca 1 vecka senare var halterna av xylen och toluen ca 50 ng/l, och övriga tillförda föroreningar färre, och i lägre koncentration än vid den första provtagningen (Per Ericsson, Görvälnverket, personlig kommunikation).

5.5 Polyeten med hög densitet (PEH) (Figur 10)

5.5.1 Destillerat vatten

Två omgångar av PEH-slang testades. Den första urlakades två gånger med destvatten med XAD-adsorption endast vid pH 6. Varken första eller andra urlakningsvattnet var mutagent. Nästa omgång slang behandlades på samma sätt som övriga material, med tre på varandra följande XAD-adsorptioner vid pH 6, pH 12 och pH 2. Det sammanslagna extraktet var svagt mutagent med TA 98 + S9. Ingen mutagenicitet påvisades dock när det andra urlakningsvattnet testades efter dubbelkoncentrering till 1,5 ml. Viss toxisk effekt iaktogs på bakteriestammen TA 100 utan S9 tillsats.

5.5.2 Klorerat destillerat vatten

Det klorerade destillerade vattnet (dos 2 mg/l Cl₂) var inte mutagent, och inte heller bakterietoxiskt.

5.5.3 Kommentarer

Eftersom den låga mutageniciteten i första oklorerade urlakningsvattnet var just ovanför gränsen till signifikans, och det dubbelkoncentrerade andra urlakningsvattnet ej var mutagent, bedömer vi att mutageniciteten kan ha berott på en slumpmässigt god anpassning till dos-responskurvan (se figur 10). Läckage av mutagena ämnen misstänktes inte från detta material även om problem med lukt och smak på vatten i polyetenrör emellanåt har rapporterats (PEH och PEL).

5.6 Polyeten med låg densitet (PEL) (figur 11)

Ingen mutagenicitet eller bakterietoxicitet påvisades, varken efter urlakning med destvatten eller klorerat destvatten. Det var heller inte förväntat (se stycket ovan).

5.7 Tvärbunden polyeten (PEX) (figur 12 och 13)

5.7.1 Destillerat vatten

Två omgångar slang testades. Det första urlakningsvattnet från den första slangen adsorberades på XAD endast vid pH 6. Det andra urlakningsvattnet adsorberades på både pH 6 och pH 2. Ingen av dessa enskilda pH-fraktioner var mutagen.

Urlakningsvattnet från den andra omgången slang som testades hade en låg, på gränsen signifikant, mutagenicitet med TA 98 + S9. Det andra urlakningsvattnet var dock inte mutagent. Inga bakterietoxiska effekter iaktogs.

5.7.2 Klorerat destvatten

Endast den andra omgången slang urlakades. En svag, på gränsen signifikant, mutagenicitet erhöles med TA 98 utan S9. Då det andra urlakningsvattnet dubbelkoncentrerades och testades erhöles ingen mutagenicitet. Inga påtagliga bakterietoxiska effekter iaktogs.

5.7.3 Kommentarer

Eftersom den mutagenicitet som påvisades i två fall var mycket låg och just ovanför gränsen till signifikans bedömer vi inte vattnen som mutagena, trots den statistiska signifikansen som kan ha berott på en slumpmässigt väl anpassad dos-responskurva (se figur 13). De ämnen som kan vara intressanta ur toxikologisk synpunkt vid tillverkning av PEX-rör är dels den organiska peroxid som används som initiator för förnätningen, dels använd antioxidant.

5.8 Polyuretanbelagda järnrör (PUR) (Figur 14 och 15)

5.8.1 Destvatten

Två olika omgångar rör undersöktes. I det första fallet gjordes XAD-adsorptionen endast vid pH 6 och pH 2 och de enskilda pH-fraktionerna testades separat. De var ej mutagena. Med den andra omgången rör gjordes XAD-adsorptionerna vid pH 6, 2 och 12 och extrakten slogs ihop. Av misstag kom sedan extrakten från första och andra urlakningsvattnet att slås ihop. Detta testades dels med de vanliga doserna, dels med dubbla doser två gånger (DMSO-extrakt går inte att dunsta in). I intet fall påvisades någon mutagenicitet. Inga påtagliga bakterietoxiska effekter kunde ses utifrån dos-responskurvornas utseende.

5.8.2 Klorerat destvatten

Från första omgången rör testades det första och andra urlakningsvattnet samtidigt. Det andra, men inte det första urlakningsvattnet visade mutagen aktivitet på både TA 98 och TA 100

med och utan metabolisk aktivering. Kvarvarande extrakt räckte endast till upprepad testning med en bakteriestam för konfirmering av resultaten. TA 98 användes för det första urlakningsvattnet och TA 100 för det andra. Vid denna upprepade testning blev det första extraktet svagt mutagent, men däremot inte det andra.

Den andra omgången rör testades på samma sätt som med det oklorerade vattnet med ett sammanslaget prov från första och andra urlakningsvattnet med dubbla doser. Låg mutagenicitet erhöles vid första testningen med TA 100 + S9. Vid upprepad testning erhöles ingen signifikant mutagenicitet med denna bakteriestam, men däremot med en svag effekt med TA 98 + S9. Inga påtagliga bakterietoxiska effekter kunde ses utifrån dos-responskurvornas utseende.

5.8.3 Kommentarer

De svaga, men statistiskt signifikanta mutagena effekter som i två fall erhöles endast vid en av två testningar, kan vara exempel på att den använda metoden för att beräkna statistiskt signifikant mutagenicitet är för "snäv" med hänsyn till osäkerheterna i den biologiska metodiken (se kurvorna i figur 14 och 16 samt vidare diskussion under punkt 8). Sammantaget bedömer vi att de PUR-rör som vi testat inte gav mutagent urlakningsvattnet med destvatten, men däremot möjligen med klorerat destvatten.

PUR-rörens lämplighet för dricksvattendistribution har varit omdebatterad sedan lukt och smak, särskilt på klorerat vatten, iakttagits efter kontakt med PUR-rör. (Hälsovårdskontakt nr 2, sid 28-29, 1981 och nr 4, sid 7-12, 1981; Kommunaktuellt nr 20, sid 10-11, 10/6, 1982).

Efter sk stripping, då flyktiga ämnen i vattnet ansamlas genom genombubbling av vattnet, har klorbensen och andra aromatiska kolväten påvisats i urlakningsvattnet från PUR-rör (ej säkert samma tillverkning som i föreliggande undersökning. Analysen gjordes med hjälp av gaskromatografi-masspektrometri och halterna angavs till ungefär 1 µg/l klorbensen och ungefär 5 µg/l aromatiska kolväten. Samtidigt undersökta segjärnsrör, asfaltbelagda rör och betongbelagda rör gav ej detekterbara halter av flyktiga organiska föreningar, medan PVC-rör gav låga halter (< 1 ng/l) ej identifierbara komponenter (Eklund et al 1978). Även senare utförda gaskromatografiska analyser har visat på utläckage av organiska ämnen från PUR-rör. Minst 19 olika icke-polära, lättflyktiga alifatiska och aromatiska kolväten detekterades i en halt av minst 0,1 µg/l, men identifierades ej. Hälsovårdskontakt nr 4, sid 12, 1981, Tibor Nemeth, Göteborgs VA-verk, pers kommunikation).

PUR framställs i princip genom reaktion mellan en isocyanat och en polyalkohol. Eventuellt överskott av isocyanat ger i vatten motsvarande primär aromatisk amin. Primära aromatiska aminer har också påvisats i urlakningsförsök med PUR-rör (Baumann och Marek 1980). Två isocyanater som används vid PUR-framställning, toluendiisocyanat (TDI) och 4,4'-metylendifenylisocyanat (MDI) har visats vara mutagena med Salmonella TA 98 och TA 100 efter

metabolisk aktivering. Resultaten misstänktes bero på isocyanaternas hydrolysisprodukter, 2,4-toluendiamin och 4,4'-metylendianilin (Andersen et al 1980). Vi vet inte om dessa isocyanater används vid framställning av de undersökta PUR-rören.

I ett utlåtande från SML (SML 1983) sägs att det samlade underlagsmaterialet inte medger en toxikologisk bedömning av PUR-belagda dricksvattenrör, varför man begär vissa specificerade komponenteringar. Materialet undergår för närvarande förnyad bedömning på Livsmedelsverket.

Eftersom inga kemiska analyser gjordes samtidigt med våra mutagenförsök går det inte att direkt jämföra resultaten med de kemiska analysresultat som redovisats ovan. Om mutagena ämnen funnits i vårt urlakningsvatten i en koncentration som motsvarar 0,1-1 µg/l vardera i ett fyllt rör och ansamlats kvantitativt på XAD-kolonnerna så skulle extraktet alltså innehålla $24 \times 0,1 = 2,4$ till $24 \times 1 = 24$ µg av ämnet. Av 3-ml-extraktet används 100 µl dvs 0,1 ml som högsta dos i Ames testet. Denna dos skulle i räkneexemplet innehålla $(2,4 \text{ till } 24) \times 0,1 : 3 = 0,08\text{-}0,8$ µg av ämnet. Endast få kända mutagener är så starkt mutagena att de ger tydligt utslag i Ames test i så låg dos. Detta räkneexempel belyser den biologiska metodens relativa okänslighet jämfört med avancerad kemisk analysmetodik. Ett negativt Ames test med den använda metodiken innebär alltså inte total avsaknad av mutagena ämnen i vattnet.

5.9 Polyvinylklorid (PVC) (Figur 17 och 18)

5.9.1 Destillerat vatten

Två omgångar av rör undersöktes. Urlakningsvattnet från den första omgången adsorberades på XAD endast vid pH 6 och pH 2, och pH-fraktionerna testades separat. pH-6 fraktionen var ej mutagen varken från första eller andra urlakningen. pH 2-fraktionen var dock mutagen med TA 100 med och utan S9-tillsats från första urlakningen men ej från den andra.

Urlakningsvattnet från den andra omgången rör testades på det standardiserade sättet med adsorption vid pH 6, 12 och 2 och hopslagning av extrakten. Ingen mutagenicitet påvisades varken från första eller andra urlakningen.

5.9.2 Klorerat vatten

Endast den andra omgången rör lakades ur med klorerat vatten. På gränsen signifikant mutagenicitet uppkom med TA 98 och TA 100 utan S9-tillsats från den första urlakningen. Det andra urlakningsvattnet gav ingen mutagenicitet.

5.9.3 Kommentarer

I de fall mutagenicitet registrerades i första urlakningsvattnet var nästa urlakningsvatten inte mutagent. Endast det första röret gav en effekt som tydligt översteg osäkerhetsintervallets nedre gräns (pH 2 fraktion, TA 100 -S9). De övriga mutagena proverna var just på gränsen statistiskt signifikanta.

Det mutagena ämne som i första hand kan misstänkas lakas ur från PVC-rör är monomeren, vinylklorid. Vinylklorid är cancerogent. Det är en flyktig gas som i höga luftkoncentrationer är mutagent i Ames test. Med den använda metoden för anrikning av vattenproverna och plattingsjuttningmetoden för Ames test kan man dock inte räkna med att få någon effekt av eventuellt urlakad vinylklorid.

5.10 Gummipackningar (Figur 19)

Beträffande metoder för urlakning och testning se avsnitt 4.2 och 4.5. Av de fem gummipackningarna gav de tre EPDM (etenpropen)-materialen ett mutagent urlakningsvatten. Packningar har i praktiken en mycket liten yta exponerad för vattenledningsvattnet jämfört med rörledningsmaterialet.

5.11 Dricksvatten (Figur 20)

Som jämförelse med resultaten från urlakningsförsöken koncentrerades 20 l vattenledningsvatten och testades på samma sätt. Vid första tillfället togs vattnet på laboratoriet på Karolinska institutet, Solna (troligen vatten från vattenverket på Lovön). XAD-adsorptionerna gjordes endast vid pH 6 och pH 2 och testades separat (2 ml av vardera extrakt). PH 2 fraktionen var mutagen med både TA 98 och TA 100 utan S9-tillsats samt visade lägre mutagenicitet med TA 98 efter metabolisk aktivering. Ett år senare togs ett nytt prov på laboratoriets dricksvatten. XAD-adsorptionen skedde nu vid pH 6, pH 12 och pH 2 och det sammanlagda extraktet (3 ml) testades. Mutagenicitet påvisades endast med TA 100 med metabolisk aktivering. Enligt uppgift hade man vid denna tidpunkt ändrat kloreringsförfarandet så att en mindre mängd klor doserades. Ett samtidigt taget prov i annan del av Storstockholm som försörjs med vatten från Görvälnverket var mutagent med TA 98 både med och utan S9-tillsats samt med TA 100 med S9 tillsats. Två prover togs sedan på Stockholms vattenverk på Lovön när två olika kloreringsförfaranden tillämpades, dels låg dos av enbart klor, dels högre dos av klor med samtidig ammoniak tillsats. I det senare fallet bildas kloraminer som är mycket mindre reaktiva än fritt klor. Vattnet med den låga klordoseringen var mutagent med TA 98 med och utan S9-tillsats. Bägge vattnen var mutagena med TA 100 med S9 tillsats.

5.12 Kontroller (Figur 21)

5.12.1 Destillerat vatten

Vid två tillfällen undersöktes laboratoriets destvatten på samma sätt som destvattnet efter urlakning. 20 l vatten koncentrerades. I första fallet (A) gjordes XAD-adsorptionen endast vid pH 6 och pH 12 och fraktionerna testades separat. I andra fallet (B) gjordes XAD adsorptionen vid pH 6, pH 12 och pH 2 och det samman-slagna extraktet testades. Både rent destvatten och klorerat destvatten undersöktes vid det senare tillfället. Ingen mutageni-citet påvisades.

5.12.2 Silikon-Lim och Tangit-Lim

Silikon användes för att limma sidoplåtarna på rören vid urlak-ningen samt för att tätta anslutningarna till pumpen vid urlakning av slangarna. Tangitlimmet användes för att skarva PVC-rördelar. Beträffande urlakning och testförfarande, se avsnitt 4.2 och 4.5. Ingen mutagenicitet påvisades.

5.12.3 Positiva kontroller

Som positiva kontroller användes de direktmutagena ämnena metyl-metansulfonat (MMS) och 2-nitrofluoren (2-NF) för TA 100 och TA 98 respektive. Bens(a)pyren (B(a)P) användes som indirekt mutagen för båda bakteriestammarna med S9-tillsats. En sammanställning av resultaten från 11 olika testningstillfällen presenteras i tabell 4, tillsammans med de samtidigt registrerade spontana mutations-frekvenserna. Den spontana mutationsfrekvensen vid övriga test-tillfällen framgår av figurerna 3-23.

6 MUTAGENICITETSTESTNING MED V79 HAMSTERCELLER (HGPRT-LOCUS)

6.1 Resultat

DMSO-koncentratet från urlakning med destillerat vatten av PEL-slang, andra omgången PUR-rör (B) samt första omgången GAP-rör (A) testades två gånger, endast utan tillsats av metaboliserande system, S9. Metodiken angavs i avsnitt 3.2.2. Preliminära toxicitetstester visade att doser upp till 70 µl kunde tillsättas per platta utan akuttoxiska effekter av DMSO-extrakt från PEL och PUR. Extraktet från GAP-rör var dock så starkt akuttoxiskt att endast doser upp till 10 µl per platta kunde användas för mutagenicitetstest. Även 10 µl dosen var så toxiskt att en stor andel celler dog av behandlingen.

I tabell 5 presenteras resultaten som antalet muterade celler per 10^5 kolonibildande behandlade celler. Dessutom anges toxiciteten som andelen överlevande celler jämfört med nollprovets när samma antal levande celler satts ut på odlingsplattor dagen efter behandling.

Som positiv kontroll användes det direktmutagena ämnet metylmetansulfonat (MMS). En dos testades samtidigt med undersökt prov och dessutom gjordes ett försök med olika doser. Samtliga doser tillsattes lösta i 10 µl DMSO. Antalet muterade celler med de spontana mutanterna förändragna var genomsnittligt $4,3 \pm 1,3$ (S.D.) per 10^5 celler från fem försök med dosen 100 µg MMS per platta (4 ml medium) och $15,3 \pm 4,4$ från tre försök med dosen 200 µg per platta. Resultatet från dos-responsförsöket framgår av tabell 5.

6.2 Diskussion av resultaten

Som framgår av tabell 5 varierade den spontana mutationsfrekvensen relativt mycket från försök till försök. Eftersom vi inte försökt selektera bort mutanter i cellodlingarna var dessutom spontanfrekvensen relativt sett hög. Detta gör att metodikens känslighet inte var optimal i försöken.

Resultaten från testning med PEL- och PUR-extrakten antyder inte någon mutagen effekt.

GAP-extrakten kunde inte testas i lika höga doser som de andra på grund av stark toxicitet gentemot cellerna. Även den högsta testade dosen, 10 µl extrakt per platta, gav kraftiga akuttoxiska effekter och påverkade överlevnaden (se tabell 5). Om man bortser från den dosen så indikerar resultaten en mutagen effekt av extraktet, eftersom 5 µl dosen gav en ungefär fördubblad mutationsfrekvens i båda försöken. Eftersom de två lägre doserna endast gav positivt dos-responssamband i det ena försöket går det dock inte att med säkerhet uttala sig om huruvida den indikerade mutagena effekten är signifikant eller ej.

Med signifikantestning enligt Kastenbaum (1970) kan man bedöma hur många mutationer som minst ska uppträda i en behandlad grupp i förhållande till summan av mutationer i den behandlade och

obehandlade gruppen för att ökningen ska vara signifikant jämfört med resultatet i obehandlad grupp. Mutationsfrekvenserna förutsätts i testet vara Poisson-fördelade. Applicerat på 5 μ l dosen i mutationsförsöken med GAP-extrakt ger detta test att antalet mutanter borde vara minst 15 per 10^5 celler i det första försöket och minst 12 per 10^5 celler i det andra försöket vid signifikansnivån $\alpha = 0,05$. Det andra, men inte första försöket, gav således enligt detta test en signifikant ökning av mutationsfrekvensen med dosen 5 μ l (tabell 5).

Sammanfattningsvis tyder alltså resultaten på att GAP-extraktet var mutagent i detta testsystem, även om resultaten inte var entydiga. Försöket med MMS gav inte heller något klart dos-responssamband för de låga doserna. Det är dock visat tidigare att MMS inte ger linjärt dos-responssamband för låga doser med det använda testsystemet (Jenssen, personligt meddelande). De enstaka testade doserna, 100 och 200 μ g MMS/platta, gav som nämnts ovan (punkt 6.1) genomgående mutationsfrekvenser överstigande nollprovets.

7 CYTOTOXICITET MIT-24

7.1 Resultat

Ett extrakt från varje material, urlakat med dels oklorerat och dels klorerat vatten, testades för toxicitet med humana HeLa-celler. Undersökningarna gjordes på Uppsala cytotoxikologiska laboratorium med den metodik som beskrivits i avsnitt 3.2.3. De spädningar som gav 50% inhibition av celltillväxten efter 1 och 7 dygns inkubation har angivits i tabell 6. Eftersom proverna var lösta i DMSO, och DMSO är toxiskt i sig självt, ska resultaten jämföras med DMSO:s egentoxicitet.

7.2 Diskussion av resultaten

De flesta proverna hade en toxicitet i närheten av DMSO:s och en liten ökning eller minskning jämfört med DMSO:s toxicitet tolkades av Ekwall (1984) som möjligen beroende på synergistiska eller antagonistiska effekter mellan ämnen i koncentratet och DMSO, eller också enbart beroende på normal testvariation. Asfaltröret visade toxisk effekt med oklorerat vattenkoncentrat efter 24 tim men inte efter 7 dygn. Eftersom inte heller det klorerade vattnet visade någon toxicitet bedömdes den noterade toxiciteten kunna vara en artefakt.

Extrakten från alla tre GAP-rören var dock cytotoxiska. Att extrakt från GAP-rören var cytotoxiska i detta testsystem med humana celler är intressant med tanke på att sådant extrakt också var avsevärt mer cytotoxiskt än PEL- och PUR-extrakten gentemot V79 hamsterceller. GAP-extrakten var dock inte mera toxiska än andra extrakt gentemot Salmonella-bakterierna. Extrakten från klorerade urlakningsvatten var inte mer toxiska än oklorerade.

Sambandet mellan cytotoxicitet och mutagenicitet är inte klarlagt, men enligt Ekwall (1984) kan det finnas ett sådant för en stor grupp av kemikalier som ger hög celltoxicitet genom proteinbindning intracellulärt. Hög cytotoxicitet skulle däremot inte motsvaras av mutagen verkan för den grupp av kemikalier som ej går in i celler och därför ger sin höga toxicitet genom membran-skador.

Som framgått av avsnitt 5 så har bedömningen av resultatena med Ames test i vissa fall varit vansklig, när mutageniciteten varit strax över gränsen för statistisk signifikans och kanske inte varit reproducerbar. Detta beror på den känsliga statistiska metodiken som använts för att avgöra om ett prov är mutagent eller ej. Om t ex de bägge parallella plattorna för varje dos visar likartat antal revertanter så minskar spridningen i materialet jämfört med om antalet skiljer sig ovanligt mycket, och därigenom ökar sannolikheten att den framräknade regressionslinjens lutning blir signifikant skild från noll ($\alpha = 0,01$). Hur väl dos-responskurvans punkter ligger samlad runt regressionslinjen samt antalet punkter avgör hur stort konfidensintervallet blir. Konfidensintervallets gränser för 99% sannolikhet har därför angivits i tabell 2 för att ge en uppfattning om osäkerheten i den beräknade mutageniciteten (regressionslinjens lutning).

Ames et al (1975) rekommenderar ett betydligt mer okänsligt kriterium för att avgöra om ett prov är mutagent, nämligen att antalet revertanter är minst fördubblat jämfört med den spontanta mutationsfrekvensen. Detta är naturligtvis en betydligt säkrare metod om man vill vara viss om att endast "sanna" mutagener bedöms som mutagena. Däremot ökar med ett sådant bedömningskriterium risken för att svaga mutagener undgår upptäckt, speciellt i komplexa blandningar där toxiska effekter kan göra det omöjligt att testa höga doser. På SML har använts regressionsanalys med signifikantstestning för att bestämma ett provs mutagenicitet i andra sammanhang (Victorin och Ahlberg 1982, Victorin m fl 1983), men vi har hittills inte ställts inför så svåra problem med att bedöma resultaten som i denna undersökning.

Om man först ser på resultaten från urlakning av de olika materialen med oklorerat destvatten (tabell 2, 3) så gav GAP-röret av första tillverkningen (A) ett kraftigt mutagent urlakningsvatten, även efter fyra på varandra följande urlakningar, med Salmonella TA 100 utan S9-tillsats (metabolisk aktivering). De tre gummipackningarna av EPDM-gummi gav ett kraftigt mutagent urlakningsvatten med TA 100 efter S9-tillsats. GAP-röret av tredje tillverkningen (C) gav ett klart mutagent urlakningsvatten med TA 98 och TA 100 utan S9. GAP-röret av andra tillverkningen (B) gav låg mutagenicitet med TA 100 både efter första och andra urlakningen. Den låga mutagenicitet som påvisades i ett fall vid urlakning av PVC-rör är mer diskutabel, eftersom det andra urlakningsvattnet ej var mutagent och inte heller den andra omgången PVC-rör. Den låga mutagenicitet som erhöles i två fall med PEH- och PEX-slang kan möjligen ha berott på liten spridning av punkterna runt regressionslinjen just vid de testtillfällena. Övriga material, asfalt, cement, epoxi, PEL och PUR gav icke-mutagena urlakningsvatten.

Urlakning med klorerat destvatten gav en ökad mutagenicitet jämfört med oklorerat destvatten med GAP-rören (A och B), då mutagener uppkom som också detekterades med Salmonella TA 98. Cement-, PUR- och PVC-rören gav upphov till låg mutagenicitet som ej fanns i oklorerat urlakningsvatten. Den låga mutagenicitet som detekterades i klorerat urlakningsvatten från asfalt- och PEX-rör

bedöms som möjligen beroende på en liten spridning av punkterna runt regressionslinjen just i de proverna. Endast de klorerade urlakningsvattnen från PEH och PEL var icke-mutagena. Sammantaget tyder resultaten på att klorering kan ge upphov till bildandet av mutagena produkter med ämnen som lakas ur från olika rörmaterial. Att så kan ske i naturligt, humus innehållande vatten är som nämnts i avsnitt 4.4 redan visat. Klorering av det använda destvattnet gav ej upphov till mutagenicitet (figur 21).

Av de undersökta rörmaterialen var det endast den första tillverkningen av glasfiberarmerad polyester (GAP-A) som gav ett kraftigt mutagent urlakningsvatten. Detta extrakt var också sannolikt, men ej entydigt, mutagent i V 79 hamstercellsystemet. Den högsta ej toxiska dosen var i det testsystemet 5 µl av GAP-extraktet per 4 ml medium och gav ungefär en fördubbling av den spontana mutationsfrekvensen. I Ames-testet var den högsta dosen 100 µl per 2,5 ml toppagar. Denna dos gav ungefär en fördubbling av den spontana mutationsfrekvensen och var alltså även enligt kriterierna enligt Ames (1975) mutagen. Den positiva kontrollen MMS gav genomsnittligt ungefär en fördubbling av den spontana mutationsfrekvensen med 100 µg per 4 ml medium i V 79-systemet i de fyra fall denna enstaka dos testades, men inte så hög mutagenicitet i dosresponsförsöket som redovisas i tabell 5. Mer än en fördubbling erhöles med 50 µg per 2,5 ml toppagar i Ames-testet (tabell 4). Dessa resultat utgör visserligen ett litet underlag för jämförelser, men pekar på att Ames-testet i varje fall inte är okänsligare än V 79 hamstercellsystemet för kända direktmutagener. Den starka cytotoxiciteten av GAP-extraktet med däggdjurscellerna jämfört med Salmonella bakterierna förhindrade att tillräckligt höga doser testades i V 79-systemet. Med tanke på detta anser vi att det visserligen ej entydiga resultatet i V 79 cellsystemet i varje fall inte talar emot, utan snarare bekräftar den erhållna mutageniciteten i Ames test. De två andra extrakten (PEL och PUR), som undersöktes i båda testsystemen var ej mutagena i något av dem.

Det är också intressant att notera att GAP-extraktet skilde sig från övriga extrakt genom att vara starkt cytotoxiska på humana HeLa celler i MIT-24-testet.

I tabell 3 har mutageniciteten i Ames test relaterats till den exponerade ytan. På detta sätt erhålles en jämförelse mellan de olika materialens benägenhet att släppa mutagena ämnen. Av de olika undersökta rörmaterialen släpper GAP(A)-rören mest mutagena ämnen per ytenhet.

I det förslag till urlakningsförfarande för kemisk-fysikalisk testning som tagits fram på SML (SML 1982) och som tillämpas av Livsmedelsverket i samband med hygienisk bedömning av rörmaterial, rekommenderas att urlakningen görs med ett konstant yta:volymförhållande på 1:1 cm²/ml (= 10:1 dm²/L) och att i annat fall resultatet räknas om så att de motsvarar detta yta:volymförhållande. Detta beräkningssätt ger alltså en jämförelse per ytenhet mellan olika material. De tyska anvisningarna (Franck och Muhlschlegel, 1979) innebär att urlakningen anges som mg av ämnet per m² och dag. Man har där infört fyra olika bedömningsklasser, där behållare tillåts släppa 4 gånger mer av ämnet, utrustningsdetaljer och fogmassor 6 ggr och elastiska packningsmaterial och

lim 50 ggr mer än vad som tilläts från rör. Ett nytt danskt förslag till testförfarande kommer att likna det svenska förutom avseende vattentemperatur (60°C) och kontakttid (24 tim). Även här rekommenderar man yta:volymförhållandet 1:1 (cm²/ml) (Jydsk teknologisk institut, 1984).

I de få länder där man hittills gett ut generella anvisningar eller förslag till anvisningar har man således ställt samma krav på urlakning per ytenhet från alla rörmaterial, oavsett vilken dimension rören tillverkas i.

I tabell 1 har angivits de olika undersökta rörens yta:volymförhållande i dm²/dm³. Inget av dem har förhållandet 10:1 och som framgår varierar förhållandet från 0,8 för det grövsta röret (GAP) till 33 för det smalaste (PEL). Detta innebär att det i ett ledningsnät fordras avsevärt mycket längre uppehållstid för en viss volym vatten i en grov ledning för att uppnå samma koncentration av urlakade ämnen som i en klen ledning av samma material. För att få en uppfattning om hur lång uppehållstiden kan vara i huvud- respektive distributionsledningar har Jan Hjort på Stockholms VA-verk tagit fram siffror som belyser detta för två olika vattenledningsnät, Stockholms och Kungsörs. I Stockholm är den genomsnittliga uppehållstiden i ledningsnätet 15,4 timmar, varav 88% av tiden är i huvudledningar (Ø > 200 mm). Den genomsnittliga uppehållstiden är alltså ca 7 ggr längre i huvudledningar än i distributionsledningar i Stockholm. I t ex Kungsör, som har ett för landet mer typiskt ledningsnät än Stockholm, så är den genomsnittliga uppehållstiden 8,8 tim, varav ca 40% är i huvudledningar. Den ur urlakningssynpunkt mest intressanta parametern är förhållandet mellan yta och producerad vattenmängd (dm² per dm³ per dygn, dm² · d/dm³). Detta förhållande har räknats fram för dels huvudledningar, dels distributionsledningar i samma vattenledningsnät med normal strömningshastighet och i ett tänkt fall där vattnet blir stillastående i 3 dygn (se tabell 7). Det framgår att en genomsnittskonsumēt i Stockholm som dricker 1 l vatten/dygn tar emot utläckande ämnen från 0,48 dm² ledningsyta medan motsvarande siffra i Kungsör är högre, 0,89 dm². I Stockholm härrör det mesta från huvudledningar, medan det motsatta gäller i Kungsör. I det tänkta fallet med stillastående vatten i 3 dygn skulle exponeringen bli större från distributionsledningarna än från huvudledningarna i bägge städerna. Totalt skulle exponeringen bli ca 15-20 ggr större än vid rinnande vatten.

Det har hävdats att mindre stränga krav kan ställas på vattenledningsrör som endast används i grova ledningar, vilket t ex är fallet med GAP-rör. Enligt ovan refererade beräkningar är detta dock inte självklart eftersom i vissa fall (t ex Stockholm) vattnet kan ha den längsta uppehållstiden i huvudledningar, och där även få den största exponeringen från rörmaterialet per producerad vattenmängd.

När mutageniciteten i våra försök anges som antal revertanter per liter vatten (vid fyllt rör) blir resultatet med GAP-rör av ungefär samma storleksordning eller lägre än de andra, mer osäkra, resultaten från övriga material (tabell 8).

I undersökningen ingick också testning av packningsmaterial. De undersökta packningarna av EPDM-gummi gav ett starkt mutagent urlakningsvatten (tabell 2, 3, 8). Packningar har dock en mycket liten kontaktyta gentemot vattenvolymen i ett ledningsnät. Om de tyska anvisningarna för urlakning av kemiska ämnen tillämpas, som tillåter 50 ggr högre urlakning från packningar än från rör, blir mutageniciteten från EPDM-materialen nr 1, 2 och 3 endast 8,4, 1,6 respektive 5,4 om antalet revertanter per dm^2 divideras med 50. Dessa siffror är av samma storleksordning eller lägre än urlakningen av mutagena ämnen från de undersökta rören.

Urlakningsvattnens mutagenicitet kan jämföras med vad som kan detekteras i vanligt vattenledningsvatten. I våra undersökningar koncentrerades 20 liter. Extraktens mutagenicitet (tabell 2) har räknats om till antal revertanter (med mest känslig bakteriestam) per liter vatten i tabell 8 och varierar mellan 50 och 110 revertanter/l. I en jämförelse med den mutagenicitet som de undersökta materialen som mest har gett upphov till efter omräkning till fyllt rör, framgår att vattenledningsvattnens mutagenicitet var av samma storleksordning eller högre än vad som detekterats i urlakningsförsöken (tabell 8). Den genomsnittliga uppehållstiden i ett normalt vattenledningsnät kan dock uppskattas till ca 1/2 dygn (Jan Hjort, Stockholms VA-verk, pers kommunikation) jämfört med 3 dygn som använts i urlakningsförsöken. För en mera rättvis jämförelse med den faktiska situationen i ett distributionsnät har därför antalet revertanter/l för de olika materialen i tabell 8 dividerats med 6, vilket ger den teoretiska mutageniciteten efter 1/2 dygns urlakning (under förutsättning att urlakningen sker linjärt med tiden). Denna mutagenicitet är genomsnittligt från de olika materialen ca 10 ggr lägre än vad som detekterats i vattenledningsvatten. Det måste i sammanhanget påpekas att kvantitativa jämförelser mellan mutagenicitet i dricksvatten och urlakningsvatten, liksom mellan urlakningsvatten från olika slags material, inte kan användas som en motsvarande jämförelse av de olika provens cancerogenicitet (jämför avsnitt 3.1).

Vattenföroreningar som kan följa med råvattnet till det färdiga dricksvattnet har, tillsammans med oönskade reaktionsprodukter från kloreringen, diskuterats som en möjlig cancerrisk för konsumenterna. Amerikanska epidemiologiska undersökningar tyder på att sådana föroreningar möjligen har ett samband med förhöjd risk för cancer i tarm och/eller urinblåsa. Tidigare fokuserades intresset mot förekomst av s k trihalometaner, främst kloroform vilken kan påvisas i relativt höga halter i klorerat dricksvatten. Kloroform är cancerframkallande i djurförsök. En sammanfattning av de flesta epidemiologiska studierna och studier över kloroforms toxicitet finns sammanställt och diskuterat i en SML-rapport (Victorin 1980). Kloroform i de halter som normalt förekommer i svenska dricksvatten bedömdes medföra en mycket liten cancerrisk.

De undersökningar som på senare år gjorts avseende mutagenicitet i dricksvatten och som refererats i avsnitt 4.4 har visat att det vid kloreringen bildas andra ämnen än kloroform och som framkallar mutationer i Salmonella. I den sammanställning som gjorts av Loper 1980 anges att mutageniciteten i de refererade undersökningarna varierat mellan 20 och 2000 revertanter per liter. Både

bildningen av kloroform och bildningen av oidentifierade mutagener beror med största sannolikhet dels av mängden organiskt material i vattnet, dels av klordosen, varför bildningen kan minimeras genom god rening av vattnet och en optimal klordosering. Våra resultat visar dock att även vatten av hög kvalitet med låg klordosering uppvisar mutagenicitet gentemot *Salmonella*-bakterier.

Det finns med nuvarande kunskaper ingen möjlighet att utifrån de mutagenicitetsdata som producerats i denna och andra undersökningar kunna bedöma om, och i så fall i vilken utsträckning, konsumtion av vattnet medför en ökad cancerisk. Självklart bör dock alla tillskott av mutagena föreningar undvikas om det är möjligt och detta inte medför andra ökade risker. Med tanke på risken för smittspridning via dricksvatten bör i de flesta fall dricksvatten kloreras eller eventuellt desinficeras på annat sätt. Kloreringen bör ske på ett optimalt sätt så att bildningen av oönskade klorerade föreningar minimeras. Tillskott av mutagena ämnen från rörledningsnätet kan undvikas med rätt materialval. För att undvika att material installeras som kan avge mutagena eller andra toxiska ämnen till vattnet bör därför en förprovning ske från hygienisk synpunkt.

Att olämpliga material kan påverka vattenkvaliteten starkt illustreras t ex av en rapport från staden Falmouth i Massachusetts, USA, där upp till 18 mg/l tetrakloretylen påvisats i dricksvattnet till följd av vinylbelagda asbestcimentrör. Spolning under 24 timmar av en ledning där halten var 1,5 mg/l sänkte halten till 0,056 mg/l, dock ej till det av EPA föreslagna gränsvärdet 0,040 mg/l. Halten steg dock snabbt igen efter avslutad spolning. Resultaten tydde på att tetrakloretylen fortsatte att lakas ur även efter fem år (Wakeham m fl 1980).

Urlakningsförsök där kemisk analys görs av urlakningsvattnet är sannolikt i de flesta fall en känsligare metod för att detektera urlakning av specifika, kända, mutagena ämnen än vad mutagentest är. Det kan dock vara svårt att veta vilka ämnen det är motiverat att leta efter, och det kan även i vissa fall bli fråga om komplicerade analysmetoder. Därför är mutagentestning av ett koncentrat av vattnet ett värdefullt komplement till kemisk analys av enstaka ämnen för att ge en uppfattning om den mutagena effekten av den komplexa blandning av ämnen som kan tänkas lakas ur från rörledningsmaterial.

I vår undersökning gav glasfiberarmerad polyester och packningar av EPDM-gummi upphov till ett kraftigt mutagent koncentrat av urlakningsvattnet. Detta visar att den använda metodiken för urlakning, koncentrerings och mutagentestning kan användas för anrikning och detektering av mutagener i urlakningsvatten från rörledningsmaterial om de mutagena ämnena förekommer i tillräckligt hög koncentration. Resultaten med övriga material var dock i flera fall svårtolkade beroende på den "snäva" metoden som använts för att avgöra om ett prov är signifikant mutagent. Detektionsgränsen för mutagenicitet varierade dessutom mellan de olika materialen, dels eftersom mängden material avgjordes på grund av praktiska skäl, dels därför att extrakten var olika toxiska för bakterierna.

I vår undersökning har varje material endast undersökts i fabrication från en tillverkare. Resultaten kan därför inte sägas vara generella och representativa för andra tillverkningar av samma material.

I kommande avsnitt sammanfattas erfarenheterna från denna undersökning i form av rekommendationer vid ett eventuellt standardiserat urlakningsförfarande, där också de undersökta materialen bedöms.

9 REKOMMENDATIONER VID STANDARDISERAD MUTAGENICITETS TESTNING AV RÖRMATERIAL

Det förslag till urlakningsförfarande och kemisk-fysikalisk testning som tagits fram av SML (1982) bör enligt vår mening tillämpas vid hygienisk bedömning av rörmaterial etc samt kompletteras med mutagenicitetstestning. Endast testning med *Salmonella*-bakterier (Ames test) rekommenderas, eftersom mutagenicitetstestning med däggdjursceller bedöms vara alltför tids- och kostnadskrävande i förhållande till sitt extra informationsvärde i detta sammanhang. Däremot kan det vara motiverat att också komplettera den kemisk-fysikaliska undersökningen med ett enkelt cytotoxicitetstest, som det som använts i denna undersökning.

Eftersom urlaknings- och koncentrationsförfarandet är utrymme-krävande och innebär hantering av stora och tunga rör kan det vara lämpligt att detta görs på ett för ändamålet avsett laboratorium. Det behöver inte vara det samma som utför Ames-testet. Med tanke på vikten av standardisering vid denna typ av tester bör endast ett fåtal laboratorier anvisas av ansvarig myndighet.

9.1 Material

Metoden är tillämplig för samma typer av material som är aktuella för kemisk-fysikalisk testning, främst slangar och rör, ytbehandlingsmaterial och packningar. Armaturer bedöms inte kunna testas praktiskt (för liten exponerad yta). Materialet bör, liksom för kemisk-fysikalisk testning, vara representativt för hur det används i praktiken, där t ex rör om möjligt tas slumpmässigt ur den löpande produktionen och ytbehandlingsmaterial eventuellt kan appliceras på provplattor.

Eftersom metodiken är betydligt mer arbetskrävande för mutagenicitetstestning än för kemisk-fysikalisk testning undersöks endast två parallella prover i stället för tre från varje material, vilket rekommenderas vid kemisk-fysikalisk analys.

Mängden material bör vara minst 100 dm² för slangar och rör, minst 25 dm² för ytbehandlingsmaterial som används i vattenreservoarer och minst 10 dm² för packningar o dyl. Med tanke på den biologiska metodens relativa okänslighet rekommenderas att så stor mängd som möjligt används.

9.2 Förbehandling

Materialen sköljs med vattenledningsvatten under 3-4 timmar och sedan med destillerat vatten.

9.3 Urlakning

Som urlakningsvatten används destillerat eller avjoniserat vatten. Vi rekommenderar att även en urlakning görs med klorerat destillerat vatten (1 mg/l Cl₂) eftersom klorerat vatten i de

flesta fall givit högre mutagenicitet i vår undersökning, och ungefär hälften av alla vattenledningsvatten i praktiken kloreras.

Urlakningsvattnet bör hållas i cirkulation. Lämpligen kan vattnet pumpas igenom mindre slangar och rör, medan större rör roteras med minst 10 liter vatten i. Behandlade plattor och packningar får lakas ur i kärl av inert material där vattnet cirkuleras med hjälp av omrörning.

Urlakningen görs 3 gånger, vardera under 3 dygn i rumstemperatur.

9.4 Koncentrering av vattnet

Vi rekommenderar att i första hand endast det första urlakningsvattnet koncentreras och testas. Den tredje urlakningen görs endast i det fall mutagenicitet påvisas i det första urlakningsvattnet.

Koncentrering genom adsorption på XAD-4/8 rekommenderas. XAD-adsorptionen kan lämpligen automatiseras genom att pumpa vattnet med konstant flöde genom kolonnen. Om 20 ml tvättad 1:1 blandning av XAD-4/8 används är ett lämpligt flöde 20-40 ml/min. I vår undersökning gjordes tre på varandra följande XAD-adsorptioner vid pH 6, 12 och 2. Enligt resultaten bör dock adsorptionen vid pH 12 kunna uteslutas. Vi rekommenderar att den första adsorptionen görs efter justering av vattnets pH till 7. En extra adsorption görs sedan på ny XAD-kolonn efter det att vattnets pH sänkts till 2.

Det mesta av vattnet blåses ur kolonnerna med kvävgas, varefter de elueras med minst 60 ml aceton (flöde 10-20 ml/min). Eluatet slås samman, torkas med molekylsiktare (3R) och indunstatas vid högst 30°C till nästan torrhet varefter koncentratet späds till 2,0 ml med dimetylsulfoxid (DMSO), varefter det förvaras vid -20°C.

9.5 Ames test

Salmonellastammarna TA 98 och TA 100 används med och utan tillsats av metaboliserande system (S9). För att utnyttja provet maximalt görs endast två parallella plattor per dos. Testningen utföres med plattningjutningsmetoden enligt Ames et al (1975). Med den föreslagna adsorptionen och koncentreringen erhålles ett mer koncentrerat prov än i våra undersökningar. Den högsta dosen föreslås därför minskas från 100 µl till 75 µl per platta. Doserna 0, 10, 25, 50 och 75 µl är jämnare fördelade än de vi använt (0, 10, 20, 50 och 100 µl) vilket är en fördel vid regressionsanalysen. Med dessa doser räcker 2 ml provet för ett upprepat Ames test med någon av de använda bakteriestammarna. Upprepat Ames test rekommenderas i de fall mutagenicitet påvisas. För att kunna upprepa testningen med båda bakteriestammarna med och utan S9-tillsats åtgår drygt 2,5 ml.

Provets mutagenicitet anges som antalet revertanter/ μ l genom att beräkna regressionslinjens lutning i det fall lutningen med 99% sannolikhet är skild från noll. För att provet skall bedömas som mutagen bör resultatet med någon bakteriestam vara reproducerbart vid den upprepade testningen.

9.6 Bedömning av resultaten

För att ett material skall anses laka ur mutagena ämnen till vattnet bör två parallellt undersökta materialprover ge ett koncentrat från oklorerat eller klorerat destvatten som är mutagen med någon bakteriestam med eller utan S9 tillsats även vid upprepad testning. Som vid kemisk-fysikalisk testning bedöms resultatet från den tredje urlakningen, eftersom en snabbt övergående urlakningseffekt måste anses vara av mindre betydelse från hälsosynpunkt och kan motverkas med kraftig genomspolning innan en ny vatteninstallation tas i bruk. Hur hög mutagenicitet som skall tillåtas måste avgöras av den ansvariga myndigheten, Livsmedelsverket. Den principiella utgångspunkten bör vara att inga mutagena ämnen ska lakas ur till dricksvattnet. I praktiken betyder det att mutageniciteten skall underskrida detektionsgränsen för den använda metoden. Med den statistiska metod som använts för att avgöra om ett prov i Ames test är mutagen eller ej, har den lägsta påvisade mutageniciteten i vår undersökning varit ca 0,15 revertanter per μ l extrakt (tabell 2), dvs $0,15 \times 3\ 000 = 450$ revertanter/extrakt. Om mängden material som urlakats varit 100 dm^2 (minsta rekommenderade mängd) blir den nedre gränsen för vad som kan påvisas $450:100 = 4,5$ revertanter/ dm^2 exponerad yta. I de flesta fall var dock detektionsgränsen i vår undersökning betydligt högre än 0,15 revertanter/ μ l. 10 revertanter/ dm^2 är troligen en rimlig uppskattning av den föreslagna metodens detektionsgräns, och föreslås av den anledningen kunna användas som gränsvärde för vad som kan tillåtas lakas ur under de givna betingelserna.

10 DISKUSSION AV FÖRESLAGET GRÄNSVÄRDE SAMT BEDÖMNING AV
UNDERSÖKTA MATERIAL

Den eventuella ökade cancerrisk som rörledningsmaterial kan medföra för konsumenten är sannolikt liten. Eftersom många människor berörs måste den kollektiva risken dock beaktas. Det föreslagna gränsvärdet, 10 revertanter/dm² är i första hand ett uttryck för principen att inte onödigtvis öka människors belastning med mutagena ämnen. Det går inte att utifrån mutagentestning beräkna den eventuella cancerrisk som ett rörmaterial med denna urlakning kan medföra. Med det föreslagna låga gränsvärdet för mutagenicitet i Ames test, tillsammans med kemisk analys, minimeras dock denna risk.

När kännedom saknas om vilka ämnen det är som förorsakar mutageniciteten i ett prov kan mutagenicitetsdata heller inte användas för att jämföra olika provers eventuella carcinogenicitet. Med denna reservation kan det ändock ha visst intresse att göra vissa jämförelser.

För att få en uppfattning om vad 10 revertanter/dm² i urlakningsförsök kan motsvara i ett ledningsnät hänvisas till tabell 7, där det framgår att mängden rörledningsyta per producerad vattenmängd genomsnittligt i Stockholm är ca 0,5 dm² · d/l och i Kungsör ung 1,0 dm² · d/l. Den senare siffran är troligen mer representativ för landet. Om 10 revertanter/dm² under 3 dygns kontakttid förutsätts motsvara 3,3 revertanter/dm² och dygn, så skulle ett ledningsmaterial med denna urlakning teoretiskt ge 3,3 revertanter/l genomsnittligt i Kungsör och 1,7 revertanter/l i Stockholm.

Detta kan t ex jämföras med det tidigare nämnda (avsnitt 5.1.3) hygieniska gränsvärdet för bens(a)pyren i dricksvatten från WHO (WHO, 1984) som är 0,01 µg/l och baserat på cancerrisk. Bens(a)pyren har i fyra laboratorier givit en genomsnittlig mutagenicitet på 90 resp 245 revertanter/µg med Salmonella TA 98 resp TA 100 (Victorin och Ahlberg, 1982). 0,01 µg/l bens(a)pyren motsvarar alltså ungefär 1-3 revertanter/l, vilket är av samma storleksordning som det teoretiska bidraget från rörledningsmaterial, som har en urlakning av mutagena ämnen vid det föreslagna gränsvärdet. Jämförelsen är naturligtvis mest relevant för asfaltrör, som kan misstänkas laka ur just bens(a)pyren.

Om vattnet blir stående under 3 dygn i en ändledning med inre diametern 100 mm (yta:volymförhållande 4 dm²/dm³) skulle bidraget från rörmaterialet kunna bli 10 · 4 = 40 revertanter/l. Vattnet i smala rör i en fastighet skulle under motsvarande förhållanden kunna erhallas 10 · 20 = 200 revertanter/l om inre diametern är 20 mm (yta:volymförhållande 20 dm²/l).

Stockholms vattenledningsvatten har som jämförelse enligt våra mätningar en mutagenicitet motsvarande ca 50-100 revertanter/l, troligen till största delen härrörande från kloreringsprodukter.

Om de undersökta materialen bedöms enligt det föreslagna gränsvärdet så konstateras att följande material i någon testning avgivit mer än 10 revertanter/dm² (Tabell 3): Cementrör urlakat med klorerat vatten, GAP(A)-rör urlakat med klorerat och oklorerat vatten, GAP(C)-rör urlakat med oklorerat vatten, PUR-rör

urlakat med klorerat vatten samt EPDM-gummipackningarna urlakade med oklorerat vatten. Värdet för cement härrör dock från 1:a urlakningen. 2:a urlakningen gav $< 10 \text{ rev/dm}^2$, vilket sannolikt också skulle gälla för en 3:e urlakning. Mutageniciteten från PUR-röret var ej reproducerbar vid upprepade testning. Både asfalt- och PUR-rören uppfyller därför kraven. Om de tyska anvisningarna tillämpas som godkänner 50 ggr större urlakning från packningar än från rör, så uppfyller också EPDM-packningarna kraven. Beträffande GAP-rören så skulle GAP(A) ej godkännas. GAP-rören tillverkas dock numera enligt uppgift på samma sätt som GAP(B). Detta material uppfyller kraven. GAP(C) specialtillverkades för vår undersökning och finns ej i produktion. Dubbelprovet på det 1:a urlakningsvattnet från GAP(C)-röret understeg 10 rev/dm^2 , varför även detta material uppfyller kraven.

Abdelghani, AA, Lockwood, MP, Jaghabir, M, Al-Sekait, M och Anderson, AC, 1982, Screening studies for mutagenic effects of selected Louisiana potable water supplies. *Trace Subst. Environ. Health* 16, 347-354.

Alink, GM, 1982, Genotoxins in water. I: Mutagens in our environment, 261-276. Alan R Liss Inc., New York.

Ames BN, McCann, J och Yamasaki, E, 1975, Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.

Andersen, M, Binderup, M-L, Kiel, P, Larsen, H och Maxild, J, 1980, Mutagenic action of isocyanates used in the production of polyurethanes. *Scand. J. Work. Environ. Health* 6, 221-226.

Athanasίου, K och Kyrtopoulos, SA, 1983, Mutagenic and clastogenic effects on organic extracts from Athenian drinking water. *Sci. Total. Environ.* 27 (2-3), 113-120.

Baird, R, Gute, J, Jacks, C, Jenkins, R, Neisess, L, Scheybeler, B, van Sluis, R och Yanko, W, 1980, Health effects of water reuse: A combination of toxicological and chemical methods for assessment, in: *Water Chlorination; Environmental Impact and Health Effects*, ed. Jolley, RL, vol 3, Ann Arbor Science Publ. 925-935.

Baumann, U och Marek, B, 1980, Bestimmung migrierter aromatischer Amine in Lebensmittelsimulantien. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 71, 468-483.

Bradley, MO, Bhuyan, B, Frances, MC, Langenbach, R, Peterson, A och Huberman, E, 1981, Mutagenesis by chemical agents in V 79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 87, 81-142.

Bull, R, Robinson, Meier, JR och Stober, J, 1982, Use of biological assay systems to assess the relative carcinogenic hazards of disinfection by-products. *Environ. Health Perspect.* 46, 215-227.

Care, R, Morrison, JD och Smith, J, 1982, On the limits of detection of traces of volatile organics in water, using Amberlite XAD-2 resin. *Water Res.* 16, 663-665.

Carlberg, G, 1982, SI, Oslo. Personlig kommunikation.

Cheh, AM, Skochdopole, J, Koski, O och Cole, L, 1980, Nonvolatile mutagens in drinking water: Production by chlorination and destruction by sulfite. *Science* 207, 90-92.

Chriswell, CD, Glatz, BA, Fritz, JS och Svec, HJ, 1979, Mutagenic analysis of drinking water. *Environ. Sci. Res.* 15, 477-494.

Coleman, WE, Melton, RG, Kopfler, FC, Barone, KA, Aurand, TA och Jellison, MG, 1980, Identification of organic compounds in a mutagenic extract of a surface drinking water by a computerized gas chromatography/mass spectrometry system (GC/MS/COM). *Environ. Sci. Technol.* 14, 576-588.

DeMarini, DM, Plewe, MJ och Brockman, HE, 1982, Use of four short-term tests to evaluate the mutagenicity of municipal water. *J. Toxicol. Environ. Health* 9, 127-140.

Dressler, M, 1979, Extraction of trace amounts of organic compounds from water with porous organic polymers. *Chromatography* 165, 167-206.

Eklund, G, Josefsson, B och Roos, C, 1978, The leaching of volatile organic compounds from different types of water pipes. *Vatten* 3, 207-208.

Ekwall, B, 1983a, Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann. NY Acad. Sci.* 407, 64-77.

Ekwall, B, 1983b, Standardiserade cellmetoder för testning av akut toxicitet - ett nytt toxikologiskt hjälpmedel. *Statens Livsmedelsverk, Vår Föda* 35, 57-69.

Ekwall, B, 1984, Rapport angående akut cytotoxicitet för HeLa celler av 19 vattenkondensat lösta i DMSO, prövade på CTLU april 1984. *Analysrapport, Statens livsmedelsverk.*

Fallon, RD och Fliermans, CB, 1980, Formation of non-volatile mutagens by water chlorination: Persistence and relationship to molecular weight of organic material in water. *Chemosphere* 9, 385-391.

Forster, R och Wilson, J, 1981, The application of mutagenicity testing of drinking water. *J. Inst. Water Eng. Scient.* 35, 259-274.

Franck, R och Muhlschleger, H, 1979, *Kunststoffe in Lebensmittelverkehr. Empfehlungen des Bundesgesundheitsamtes.* Carl Heymanns Verlag KG.

Gaag van der, MA, Noordsij, A och Oranje, JP, 1982, Presence of mutagens in Dutch surface water and effects of water treatment processes for drinking water preparation. I: *Mutagens in our environment*, s 277-286, Alan Liss Inc., New York.

Glatz, BA, Chriswell, CD, Arguello, MD, Svec, HJ, Fritz, JB, Grimm, SM och Thomson, MA, 1978, Examination of drinking water for mutagenic activity. *J. Am. Water Works Ass.* 70, 465-468.

Grabow, WOK, Burger, JS och Hilner, CA, 1981, Comparison of liquid-liquid extraction and resin adsorption for concentrating mutagens in Ames Salmonella/microsome assays on water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27, 442-449.

Grimm-Kibalo, SM, Glatz, BA och Fritz, JS, 1981, Seasonal variation of mutagenic activity in drinking water. *Bull. Environ. Toxicol.* 26, 188-195.

Gruener, N, 1978, Mutagenicity of ozonated, recycled water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 522-526.

Gruener, N och Lockwood, MP, 1979, Mutagenicity and transformation by recycled water. *J. Toxicol. Environ. Health* 5, 663-670.

Gruener, N och Lockwood, MP, 1980, Mutagenic activity in drinking water. *Am. J. Public Health* 70:3, 276-278.

Heartlein, MW, DeMarini, DM, Katz, AJ, Means, JC, Plewa, MJ och Brockman, HE, 1981, Mutagenicity of municipal water obtained from an agricultural area. *Environ. Mutagenesis* 3, 519-530.

Jenssen, D, 1984, A quantitative test for mutagenicity in V 79 Chinese hamster cells. I: Handbook of mutagenicity test procedures, ed. Kilbey BJ, Legator M, Nichols W och Ramel C. Elsevier Science Publ. 1984. 269-290.

Jolley, RL, 1981, Concentrating organics in water for biological testing. *Environ. Sci. Technol.* 15:8, 874-880.

Junk, GA, Richard, JJ, Grieser, MD, Witiak, D, Witiak, JL, Arguello, MD, Vick, R, Svec, HJ, Fritz, JS och Calder, GV, 1974, Use of macroreticular resins in the analysis of water for trace organic contaminants. *J. Chromatography* 99, 745-762.

Jydsk teknologisk institut, 1984, Projekt positivliste. Undersøgelse af plastmaterialer till drikkevandinstallationer. TR-sags nr 1982-133/230-82.019, Århus, Danmark.

Kastenbaum, MA och Bowman, KO, 1970, Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* 9, 527-549.

Kool, HJ, van Kreijl, CF och van Kranen, HJ, 1981a, The use of XAD-resins for the detection of mutagenic activity in water. I. Studies with surface water. *Chemosphere* 10, 85-98.

Kool, HJ, van Kreijl, CF och van Kranen, HJ, 1981b, The use of XAD-resins for the detection of mutagenic activity in water. II: Studies with drinking water. *Chemosphere* 10, 99-108.

Kool, HJ, van Kreijl, CF, van Kranen, HJ och de Greef, E, 1981c, Toxicity assessment of organic compounds in drinking water in the Netherlands. *Sci. Total Environ.* 18, 135-153.

Kool, HJ, van Kreijl, CF, de Greef, E och van Kranen, H, 1982, Presence, introduction and removal of mutagenic activity during the preparation of drinking water in the Netherlands. *Environ. Health Perspect.* 46, 215.

Kool, HJ, van Kreijl, CF och van Oers, H, 1984, Mutagenic activity in drinking water in the Netherlands. A survey and a correlation study. *Toxicol. Environ. Chem.* 7, 111-129.

Kopfler, FC, Coleman, WE, Melton, RG, Tardiff, RG, Lynch, SC och Smith, JK, 1977, Extraction and identification of organic micro-pollutants: Reverse osmosis method. *Ann. NY Acad. Sci.* 298, 20-30.

Lang, DR, Kurzepa, H, Cole, MS och Loper, JC, 1980, Malignant transformation of BALB/3T3 cells by residue organic mixtures from drinking water. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 4, 41-54.

Livsmedelsverket, 1984, Krav på underlag m m för livsmedelsverkets hygieniska bedömningar av komponenter som ingår i vatteninstallationer och för vilka Planverkets typgodkännande sökes. Statens livsmedelsverk, Uppsala 1984-02-02.

Lindström, B, Medicinsk statistik. Kompendium för medicinstuderande, Stockholm.

Loper, JC, Lang, DR, Schoeny, RS, Richmond, BB, Gallagher, PM och Smith, CC, 1978, Residue organic mixtures from drinking water show in vitro mutagenic and transforming activity. *J. Toxicol. Environ. Health* 4, 919-938.

Loper, JC, 1980, Mutagenic effects of organic compounds in drinking water. *Mutat. Res.* 76, 241-268.

Loper, JC, Tabor, MW och MacDonald, SM, 1982, Mutagens from nonvolatile organics of drinking water. *Environ. Mutagenesis* 4, 380.

Maruoka, S och Yamanaka, S, 1980, Production of mutagenic substances by chlorination of waters. *Mutat. Res.* 79, 381-386.

Maruoka, S och Yamanaka, S, 1983, Mutagenic potential of laboratory chlorinated river water. *Sci. Total Environ.* 29, 143-154.

Meier, JR, Lingg, RD och Bull, RJ, 1983, Formation of mutagens following chlorination of humic acid. A model for mutagen formation during drinking water treatment. *Mutat. Res.* 118, 25-41.

Merck. Drying in the laboratory. Reagents Merck, Darmstadt, Årtal ej angivet.

Neeman, I, Kroll, R, Mahler, A och Rubin, RJ, 1980, Ames' mutagenic activity in recycled water from an Israeli water reclamation project. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 168-175.

Nestmann, ER, LeBel, GL, Williams, DT och Kowbel, DJ, 1979, Mutagenicity of organic extracts from Canadian drinking water in the Salmonella/mammalian-microsome assay. *Environ. Mutagenesis* 1, 337-345.

Nestmann, ER, Lee, EG-H, LeBel, GL och Williams, DT, 1982, Mutagenicity of extracts of drinking water from municipalities supplied by the Great Lakes. *Environ. Mutagenesis*, 4, 367.

Noordsij, A, van Beveren, J och Brandt, A, 1983, Isolation of organic compounds from water for chemical analysis and toxicological testing. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 13(3), 205-217.

Packham, RF, Beresford, SAA, och Fielding, M, 1981, Health related studies of organic compounds in relation to re-use in the United Kingdom. *Sci. Total. Environ.* 18, 167-186.

Rappaport, SM, Richard, MG, Hollstein, MC och Talcott, RE, 1979, Mutagenic activity in organic waste water concentrates. *Environ. Sci. Technol.* 13, 957-961.

Rossum van, PG och Webb, RG, 1978, Isolation of organic water pollutants by XAD resins and carbon. *J. Chromatography* 150, 381-392.

Rossum van, PG, Willemsse, JM, Hilner, C och Alexander, L, 1982, Examination of a drinking water supply for mutagenicity. *Water Sci. Technol.* 14 (4-5), 163-173.

Schwartz, DJ, Saxena, J och Kopfler, FC, 1979, Water distribution system, a new source of mutagens in drinking waters. *Environ. Sci. Technol.* 13, 1138-1141.

SML, 1982, Ang underlag för toxikologisk bedömning av material för vatteninstallationer i samband med typgodkännande. PM 500-1-72-82, Statens Miljömedicinska Laboratorium, Stockholm 1982-10-21.

SML, 1983, Toxikologisk bedömning av polyuretanbelagda rör för dricksvattendistribution. Dnr 500-021-83.

Tabor, WM och Loper, JC, 1980, Separation of mutagens from drinking water using coupled bioassay/analytical fractionation. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 8, 197-215.

Tye, RJ och Waite, WM, 1981, Mutagens, carcinogens and the water cycle. *Water Poll. Control*, 600-613.

WHO, 1984, Guidelines for drinking water quality, Vol I, Recommendations. WHO, Geneva.

Victorin, K, 1980, Trihalometaner i dricksvatten. Litteraturgenomgång och toxikologisk utvärdering. SML rapport nr 1/80, Statens miljömedicinska labororium.

Victorin, K, 1981, Hygienisk bedömning av rörmaterial samt testmetoder. I: Vattendistribution från hygienisk synpunkt -problem, kontroll och åtgärder, meddelande VAV M 32, 50-58. Svenska Vatten- och Avloppsverksförbundet, Stockholm.

Victorin, K, 1982, Urlakning av toxiska, speciellt mutagena, ämnen från vattenledningsmaterial. *Hälsovärldskontakt* 3, 41-44.

Victorin, K och Ahlberg UG, 1982, Interkalibrering av Ames Salmonella/mikrosom test på rökgasprover. Teknisk rapport nr 54, projekt Kol Hälsa Miljö. Statens Vattenfallsverk.

Victorin, K, Ahlborg, UG, Ståhlberg, M och Honkasalo, S, 1983, Mutagena stoftutsläpp från en kolpulvereldad anläggning - Långtidsvariationer. Teknisk rapport nr 63, projekt Kol Hälsa Miljö, Statens Vattenfallsverk.

Wakeham, SG, Davis, AC, Witt, RT, Tripp, BW och Frew NM, 1980, Tetrachloroethylene contamination of drinking water by vinyl-coated asbestos-cement pipe. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 25, 639-645.

Williams, DT, Nestmann, ER, Lebel, GL, Benoit, FM, Otson, R och Lee EGH, 1982, Determination of mutagenic potential and organic contaminants of Great Lakes drinking water. Chemosphere 11(3), 263-276.

Zoeteman, BCJ, Hrubec, J, de Greef, E och Kool, HJ, 1982, Mutagenic activity associated with by-products of drinking water disinfection by chlorine, chlorine dioxide, ozone and UV-irradiation. Environ. Health Perspect. 46, 197-205.

BILAGA 1: Tabeller 1-7

Tabell 1. Undersökta material

Material	Längd (m)	Inre diameter (cm)	Exponerad yta (dm ²)	Volym vid fyllt rör (l)	Yta/volym förhållande vid fyllt rör (dm ⁻¹)
Asfalt	2,0	10	63	16	4,0
Cement	2,5	10	80	20	4,0
Epoxi	2,1	19	125	60	2,1
GAP	1,0	50	157	196	0,8
PEH	50	2	314	16	20
PEL	50	1,2	189	5,7	33
PEX	50	2,3	361	23	17
PUR	3,0	10	94	24	4,0
PVC	8,0	5,6	141	20	7,1
GUMMIPACKNINGAR					
EPDM-gummi, fabr nr 1			13		
EPDM-gummi, fabr nr 2			28		
EPDM-gummi, fabr nr 3			7,1		
Butylgummi			7,0		
Styren-butadien- gummi			15		
PVC-lim, Tangit			2,3		
Silikon- lim			2,7		

Tabell 2. De olika extraktens mutagenicitet beräknat utifrån regressionslinjens lutning (revertanter/ μ l koncentrat) med konfidensintervallgränserna angivna för signifikansnivån 1%. De testade enskilda pH-fraktionerna från PEH, PEX, PUR och PVC samt från första testningen av kranvatten är koncentrerade till 2 ml. Enstaka pH-fraktioner från GAP-rören är koncentrerade till 1 ml prov. Övriga prover är hopslagna pH-fraktioner till 3 ml, där varje fraktion alltså späds 3 ggr, om inte annat anges. <-tecknet betyder att extraktet inte var statistiskt mutagent. - betyder att extraktet inte testats med rubricerad bakteriestam.

Undersökt material	Revertanter/ μ l koncentrat			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
ASFALT				
Asfalt, 1:a urlakning	<	<	<	<
Asfalt, 2:a urlakning koncentrerat till 1,5 ml	<	<	-	-
Asfalt + Cl, 1:a urlakning dubbelprov	0,19 \pm 0,14 <	< -	< -	< -
Asfalt + Cl, 2:a urlakning	<	<	<	<
CEMENT				
Cement, 1:a urlakning	<	<	<	<
Cement + Cl, 1:a urlakning	0,35 \pm 0,17	0,15 \pm 0,10	<	<
Cement + Cl, 2:a urlakning, koncentrerat till 1,5 ml	<	0,25 \pm 0,17	-	-
GLASFIBERARMERAD EPOXI, 1:a urlakning				
<	<	<	<	<
GLASFIBERARMERAD POLYESTER (GAP)				
GAP, tillverkningsatts nr 1 (A)				
GAP (A), 1:a urlakning	<	<	2,12 \pm 0,55	<
GAP (A), 2:a urlakning	<	<	1,41 \pm 0,34	0,59 \pm 0,55 ^a
GAP (A), 3:e urlakning	-	-	0,81 \pm 0,30	-
GAP (A), pH 6 fraktion	-	-	2,51 \pm 0,50	-
GAP (A), pH 12 fraktion	-	-	<	-
GAP (A), pH 2 fraktion	-	-	<	-
GAP (A), 4:e urlakning	-	-	1,35 \pm 0,23	-
GAP (A), pH 12 fraktion	-	-	3,63 \pm 2,04	-
GAP (A), pH 2 fraktion	-	-	0,78 \pm 0,33	-
GAP (A), pH 6 fraktion	-	-	<	-

forts.

Undersökt material	Revertanter/ μ l koncentrat			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
<u>GAP (A) + CL, 1:a urlakning</u>	0,65 \pm 0,20	0,90 \pm 0,47 ^a	2,74 \pm 0,34	0,79 \pm 0,16
GAP (A) + CL, 2:a urlakning	<	<	2,29 \pm 1,14 ^b	<
GAP (A) + CL, pH 6 frakt.	0,50 \pm 0,33 ^b	<	5,17 \pm 1,08 ^b	<
GAP (A) + CL, pH 12 frakt.	<	<	<	<
GAP (A) + CL, pH 2 frakt.	<	<	<	<
GAP (A) + CL, 3:e urlakning	0,51 \pm 0,15	<	2,31 \pm 0,57	1,32 \pm 1,25 ^a
<u>GAP, tillverkningsatts nr 2 (B), Lång uthärdningstid</u>				
GAP (B), 1:a urlakning	<	<	0,37 \pm 0,32	0,23 \pm 0,19
GAP (B), 2:a urlakning	<	<	<	0,24 \pm 0,20
<u>GAP (B) + CL, 1:a urlakning</u>	<	0,18 \pm 0,12	0,54 \pm 0,34	<
GAP (B) + CL, 2:a urlakning	<	<	<	0,49 \pm 0,31
<u>GAP, tillverkningsatts nr 3 (C)</u>				
GAP (C), 1:a urlakning	0,96 \pm 0,30 ^a	<	0,56 \pm 0,30	<
dubbelprov	0,41 \pm 0,09	-	0,32 \pm 0,20	-
POLYETEN (PEH)				
<u>PEH, första omgång slang (A)</u>				
PEH (A), 1:a urlakning, pH 6 fraktion	<	<	<	<
PEH (A), 2:a urlakning, pH 6 fraktion	<	<	<	<
<u>PEH (A) + CL, 1:a urlakning</u>	<	<	<	<
<u>PEH, ny omgång slang (B)</u>				
PEH (B), 1:a urlakning	<	0,19 \pm 0,18	<	<
PEH (B), 2:a urlakning, koncentrerat till 1,5 ml	<	<	-	-
POLYETEN (PEL)				
<u>PEL, 1:a urlakning</u>	<	<	<	<
<u>PEL + CL, 1:a urlakning</u>	<	<	<	<
PEL + CL, 2:a urlakning	<	<	<	<

forts.

Undersökt material	Revertanter/ μ l koncentrat				
	TA 98		TA 100		
	-S9	+S9	-S9	+S9	
TVÄRBUNDEN POLYETEN (PEX)					
<u>PEX, första omgång slang (A)</u>					
PEX (A), 1:a urlakning, pH 6 fraktion	<	<	<	<	
PEX (A), 2:a urlakning, pH 6 fraktion	<	<	<	<	
	<	<	<	<	
<u>PEX, ny omgång slang (B)</u>					
PEX (B), 1:a urlakning	<	0,14 \pm 0,14	<	<	
PEX (B), 2:a urlakning	<	<	-	-	
<u>PEX (B) + Cl</u> , 1:a urlakning	0,17 \pm 0,16	<	<	<	
PEX (B) + Cl, 2:a urlakning, koncentrerat till 1,5 ml	<	<	-	-	
POLYURETAN (PUR)					
<u>PUR, första omgång rör (A)</u>					
PUR (A), 1:a urlakning pH 6 fraktion	<	<	<	<	
	<	<	<	<	
	<	<	<	<	
<u>PUR (A) + Cl</u> , 1:a urlakning dubbelprov	<	<	<	<	
	0,15 \pm 0,10	<	-	-	
PUR (A) + Cl, 2:a urlakning dubbelprov	0,20 \pm 0,15	0,27 \pm 0,26	0,25 \pm 0,16	0,42 \pm 0,15	
	-	-	<	<	
<u>PUR, ny omgång rör (B)</u>					
PUR (B) 1:a + 2:a urlakning, dubbla doser	<	<	<	<	
	<	<	<	<	
<u>PUR (B) + Cl</u> , 1:a + 2:a urlakning, dubbla doser	<	<	<	0,21 \pm 0,17	
	<	0,15 \pm 0,09	<	<	
POLYVINYLKLORID (PVC)					
<u>PVC (A), första omgång rör</u>					
PVC (A), 1:a urlakning pH 6 fraktion	<	<	<	<	
	<	<	0,42 \pm 0,30	0,44 \pm 0,43	
	<	<	<	<	

forts.

Undersökt material	Revertanter/ μ l koncentrat				
	TA 98		TA 100		
	-S9	+S9	-S9	+S9	
PVC (A), 2:a urlakning, pH 6 fraktion	<	<	<	<	
pH 2 fraktion	<	<	<	<	
PVC, ny omgång rör (B)					
PVC (B), 1:a urlakning	<	<	<	<	
PVC (B), 2:a urlakning	<	<	<	<	
PVC (B) + Cl, 1:a urlakning	0,24 \pm 0,24	<	0,33 \pm 0,31	<	
PVC (B) + Cl, 2:a urlakning	<	<	<	<	
GUMMIPACKNINGAR					
EPDM-gummi, fabr nr 1	<	<	<	<	5,48 \pm 2,43 ^a
EPDM-gummi, fabr nr 2	<	<	<	<	2,22 \pm 1,82 ^a
EPDM-gummi, fabr nr 3	<	<	<	<	1,88 \pm 0,54 ^a
Butylgummi	<	<	<	<	
Styren-butadiengummi	<	<	<	<	
DRICKSVATTEN					
Kranvatten, Stockholm April -82					
pH 6 fraktion	<	<	<	<	
pH 2 fraktion	0,38 \pm 0,24	0,17 \pm 0,14	1,12 \pm 0,56	<	
Kranvatten, mars -83 Stockholm Järfälla					
	<	<	<	<	0,37 \pm 0,27
	0,31 \pm 0,05	0,22 \pm 0,21	<	<	0,33 \pm 0,32
Vattenverksvatten					
0,07 mg/l Cl ₂	0,22 \pm 0,17	0,22 \pm 0,14	<	<	0,35 \pm 0,33
0,3 mg/l Cl ₂ + NH ₃	<	<	<	<	0,37 \pm 0,26
KONTROLLER					
Kontroll, dest vatten (A)					
pH 6 fraktion	<	<	<	<	
pH 2 fraktion	<	<	<	<	
Kontroll, dest vatten (B)					
Kontroll, dest vatten (B) + Cl	<	<	<	<	
Silikon-lim					
PVC-lim, Tangit	<	<	<	<	

^a Om 100 μ l dosen utsluts vid beräkningen.^b Dosen 100 μ l ej testad.

Tabell 3. Förenklad sammanställning av erhållna resultat, där mutageniciteten uttrycks som antal revertanter per ytenhet (dm^2) efter urlakning med dels destillerat vatten, dels klorerat destvatten. För varje material har endast medtagits den högsta detekterade mutageniciteten vid någon testning för varje bakteriestam. <-tecknet betyder att ingen mutagenicitet påvisades i extraktet.

Undersökt material	Revertanter/ dm^2 exponerad yta			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
Asfalt	<	<	<	<
Asfalt + Cl	9,0 ^a	<	<	<
Cement	<	<	<	<
Cement + Cl	13	5,6	<	<
Epoxi	<	<	<	<
GAP (A)	<	<	41	11
GAP (A) + Cl	12	17	52	25
GAP (B) (lång uthärdningstid)	<	<	7,1	4,6
GAP (B) + Cl	<	3,4	10	9,4
GAP (C)	18	<	11	<
PEH	<	1,8 ^a	<	<
PEH + Cl	<	<	<	<
PEL	<	<	<	<
PEL + Cl	<	<	<	<
PEX	<	1,2 ^a	<	<
PEX + Cl	1,4 ^a	<	<	<
PUR	<	<	<	<
PUR + Cl	6,4	8,6	8,0	14
PVC	<	<	6,0	6,3
PVC + Cl	5,1	<	7,0	<
EPDM-gummi nr 1	<	<	<	420
"- nr 2	<	<	<	79
"- nr 3	<	<	<	270
Butylgummi	<	<	<	<
Styren-butadiengummi	<	<	<	<

a) Mutageniciteten möjligen beroende på en slumpmässigt fördelaktigt liten spridning av punkterna runt regressionslinjen (se figur 3, 10 och 13 samt tabell 2).

Tabell 4. Positiva kontroller. Medelvärdet (\bar{X}) och spridningen (SD) av antalet revertanter per platta vid olika testningstillfällen (n) med direkta mutagenerna 2-nitrofluoren (2-NF) och metylmetansulfonat (MMS) samt den indirekta mutagenen bens(a)pyren (B(a)P). Tre plattor per dos användes vid varje tillfälle. De spontana mutationsfrekvenserna anges också.

	n	\bar{X}	SD
TA 98-S9	10	23	6
2-NF, 2 μ g	6	2325	647
2-NF, 1 μ g	1	710	-
2-NF, 0,2 μ g	3	157	46
TA 98+S9	10	35	13
B(a)P, 2 μ g	6	226	109
B(a)P, 1 μ g	4	124	20
TA 100-S9	11	93	16
MMS, 50 μ g	5	341	221
2-NF, 2 μ g	2	999	102
2-NF, 1 μ g	4	337	116
TA 100+S9	10	98	24
B(a)P, 2 μ g	6	835	286
B(a)P, 1 μ g	4	299	67

Tabell 5. Resultat från mutagenicitetstestning med V79 hamsterceller (HGPRT-Locus). Extrakt från tre olika material testades två gånger utan tillsats av metaboliserande system (S9). Metylmetansulfonat (MMS) har använts som positiv kontroll.

a) Provet förlorat. b) För resultat från testning av flera enstaka doser, se texten.

Material (koncentrat av urlakningsvatten i 3 ml DMSO)	Dos µl per platta (4 ml medium)	Toxicitet % överlevande celler		Mutagenicitet Antal mutanter (6TG-resistenta celler) per 10 ⁵ kolonibildande celler	
		Försök 1	Försök 2	Försök 1	Försök 2
GAP	0	100	100	7,8	- ^a
	50 µl DMSO	112	98	5,8	3,8
	1	120	99	8,2	6,5
	2	106	96	6,1	8,4
	5	91	89	13,5	12,7
	10	43	84	12,9	8,3
PEL	0	100	100	7,2	0
	70 µl DMSO	102	119	5,7	0,5
	10	99	108	4,3	0,4
	20	102	92	6,2	3,2
	40	94	85	5,6	0,2
	70	94	101	9,7	0,4
PUR	0	100	osäkra resultat	14,1	9,1
	70 µl DMSO	114	91	11,4	10,2
	10	99	108	18,7	11,4
	20	122	105	10,5	10,9
	40	103	95	9,5	7,3
	70	91	13,0	14,3	13,7
MMS ^b	0 µg MMS i 10 µl DMSO	100		28,1	
	20 µg -"-	93		27,3	
	40 µg -"-	91		22,4	
	70 µg -"-	59		33,9	
	100 µg -"-	71		31,7	
	200 µg -"-	34		40,9	

Tabell 6. Approximativa IC50 (inhibitory conc 50%) för vattenkoncentrat lösta i DMSO, testade på HeLa-celler i MIT-24 systemet. Alla testade rörextrakt är från första urlakningen, utom det oklorerade vattnet från GAP(A) som är från det fjärde urlakningsvattnet. Från Ekwall (1984).

Prov	24 h IC50 vol% DMSO	7-dygns IC50 vol% DMSO	Anmärkningar
DMSO	2,0	1,3	
Klorerat destvatten	1,1	0,89	synergism?
Vattenledningsvatten, Stockholm 1983	1,3	1,1	synergism?
GAP A	1,3	0,18	
GAP A, CL	0,27	0,13	
GAP B	0,48	0,18	
GAP B, CL	0,27	0,18	
GAP C	0,028	0,018	
PEX A	1,6	1,1	synergism?
PEX A, CL	(2,0)	(1,3)	
PEL	(2,0)	(1,3)	
PEL, CL	(2,0)	(2,0)	antagonism?
PUR A	1,6	1,1	synergism?
PUR A, CL	1,6	1,1	synergism?
PVC A	1,3	1,1	synergism?
PVC A, CL	(2,5)	(1,3)	antagonism?
Cement	1,3	1,1	synergism?
Cement, CL	1,3	0,9	synergism?
Asfalt	0,18	1,3	
Asfalt, CL	(2,5)	(1,3)	antagonism?

synergism? och antagonism? anger värden nära DMSO:s egentoxicitet, vid vilka det ej kan uteslutas att de lösta substanserna bidrar till att variera DMSO-toxiciteten något. Samma förskjutningar från DMSO-toxiciteten kan också vara normal testvariation.

Tabell 7. Exponerad rörledningsyta (dm^2) per producerad vattenmängd (dm^3/dygn) i två olika vattenledningsnät. Beräkningar framtagna av Jan Hjort, Stockholms VA-verk.

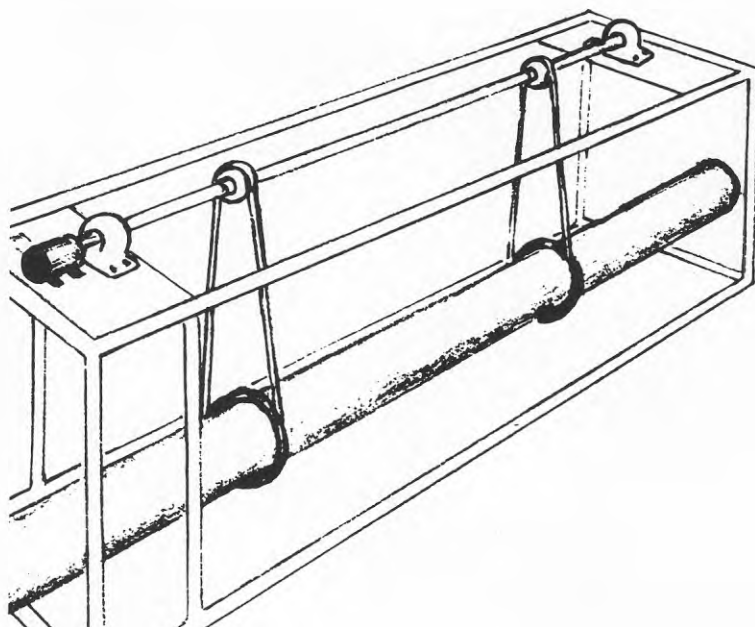
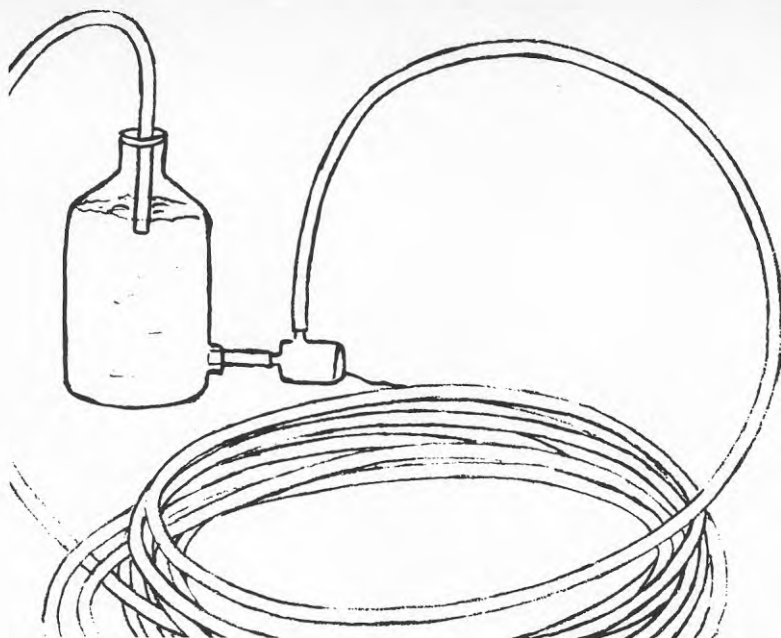
<u>Exponerad rörledningsyta per producerad vattenmängd ($\text{dm}^2 \cdot \text{d}/\text{dm}^3$)</u>			
	I huvudledningar ($\emptyset > 200 \text{ mm}$)	I distributions- ledningar ($\emptyset < 200 \text{ mm}$)	Totalt i nätet
Vid normal strömnings- hastighet			
Stockholm	0,29	0,19	0,48
Kungsör	0,22	0,67	0,89
Om vattnet blir stillastående i 3 dygn			
Stockholm	1,56	7,35	8,91
Kungsör	4,53	9,09	13,62

Tabell 8. Starkt förenklad sammanställning av erhållna resultat med Ames test, där mutageniciteten uttrycks dels per ytenhet av materialet (revertanter/dm²), dels per volym vatten (revertanter/l) vid fyllt rör. Det mest mutagena extrakt som erhållits vid någon urlakning med någon bakteriestam med eller utan S9-tillsats har använts för beräkningarna (se tabell 2 och 3). Antalet revertanter per liter anges också efter division med 6, vilket ger den teoretiska mutageniciteten efter 1/2 dygns urlakning (genomsnittlig uppehållstid i ett normalt vattenledningsnät). Yta- volymförhållande för olika rör (tabell 1) anges också. <-tecknet betyder att ingen mutagenicitet påvisades i extraktet. De undersökta dricksvattnets mutagenicitet anges också, där den bakteriestam som givit den högsta mutageniciteten använts för beräkningarna.

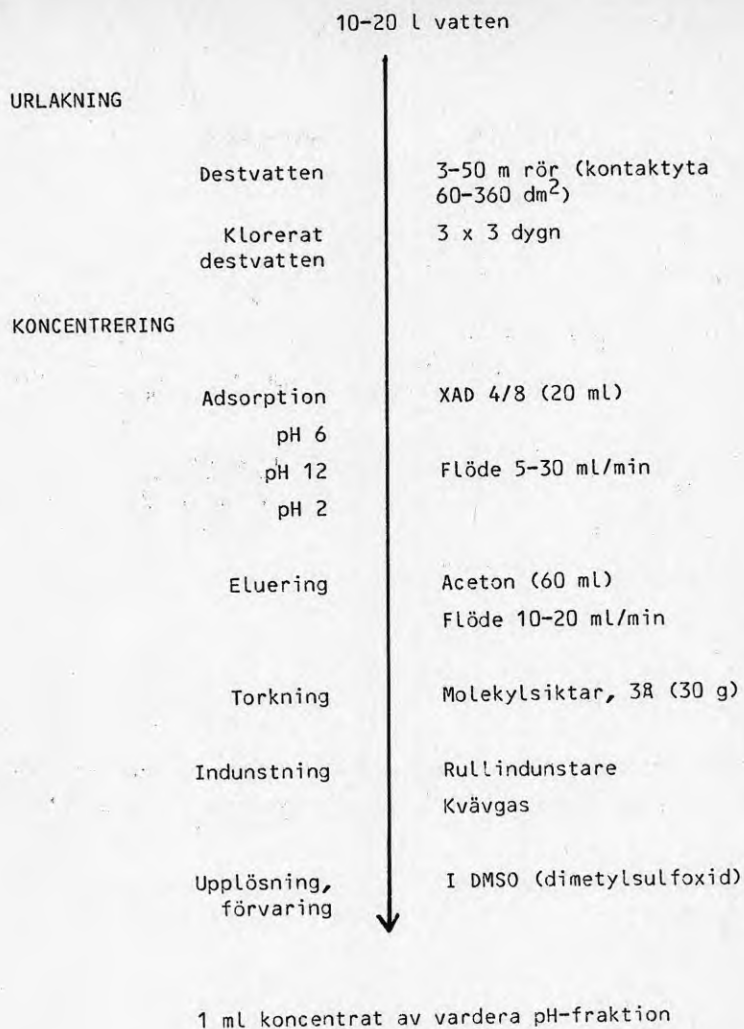
Undersökt material	Revertanter/dm ² exponerad yta	Yta/volymförhållande (dm ⁻¹)	Revertanter/l vatten vid fyllt rör	Teoretisk mutagenicitet efter 1/2 dygns urlakning (revertanter/l)
Asfalt	<	4,0	<	<
Asfalt + Cl	9,0 ^a	4,0	36 ^a	6,0 ^a
Cement	<	4,0	<	<
Cement + Cl	13	4,0	52	8,7
Epoxi	<	2,1	<	<
GAP (A)	41	0,8	33	5,5
GAP (A) + Cl	52	0,8	42	7,0
GAP (B)	7,1	0,8	5,7	0,95
GAP (B) + Cl	10	0,8	8,0	1,3
GAP (C)	18	0,8	14	2,3
PEH	1,8 ^a	20	36 ^a	6,0 ^a
PEH + Cl	<	20	<	<
PEL	<	33	<	<
PEL + Cl	<	33	<	<
PEX	1,2 ^a	17	20 ^a	3,3 ^a
PEX + Cl	1,4 ^a	17	24 ^a	4,0 ^a
PUR	<	4,0	<	<
PUR + Cl	14	4,0	56	9,0
PVC	6,3	7,1	45	7,5
PVC + Cl	7,0	7,1	50	8,3
Kranvatten				
Stockholm 82, -83			110, 55	
Järfälla			50	
Vattenverket, Lovö			52, 55	
Gummipackningar				
EPDM 1, 2, 3	420, 79, 270			
Butyl, styrenbutadien	<			

a) Mutageniciteten möjligen beroende på en slumpmässigt fördelaktigt liten spridning av punkterna runt regressionslinjen vid testning av extraktet.

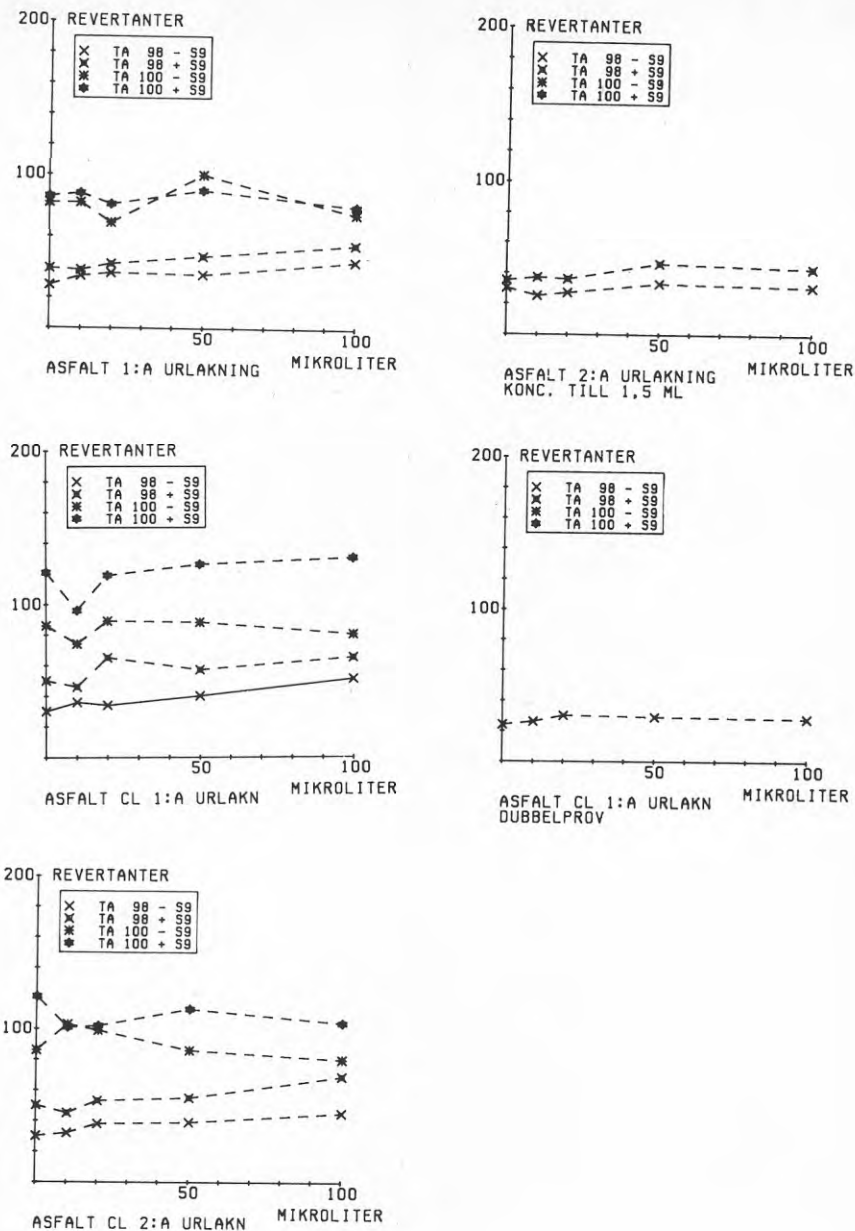
BILAGA 2: Figurer 1-23



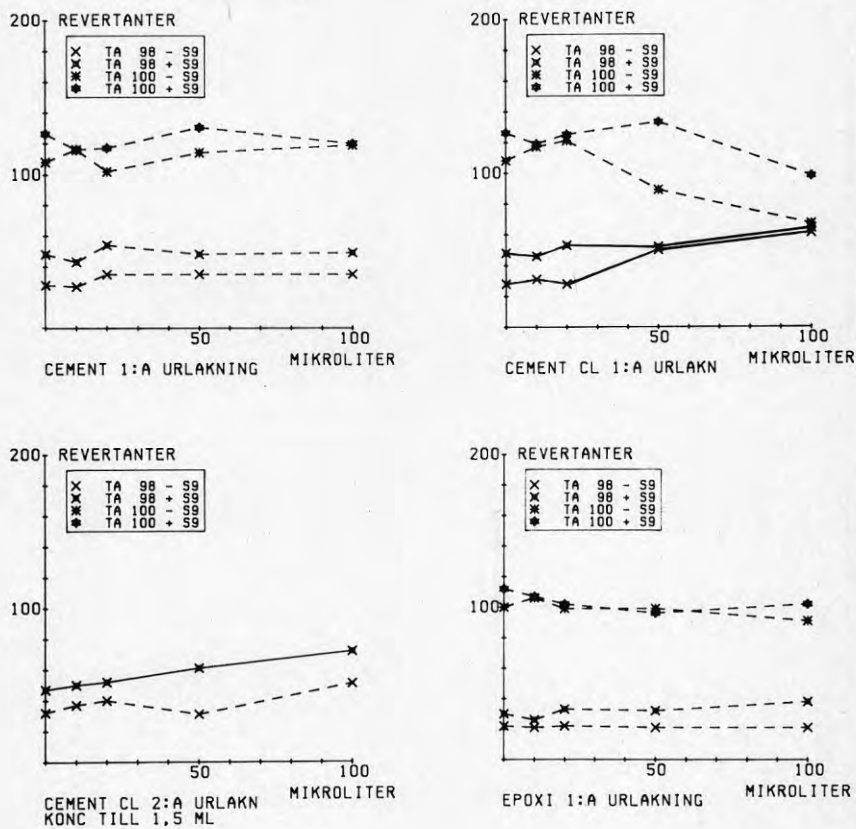
Figur 1. Anordning för urlakning av slangar och rör. Vattnet pumpas igenom slangarna med hastigheten 12,5 liter/min. Rören roteras 3-10 varv/min (ej helt fyllda).



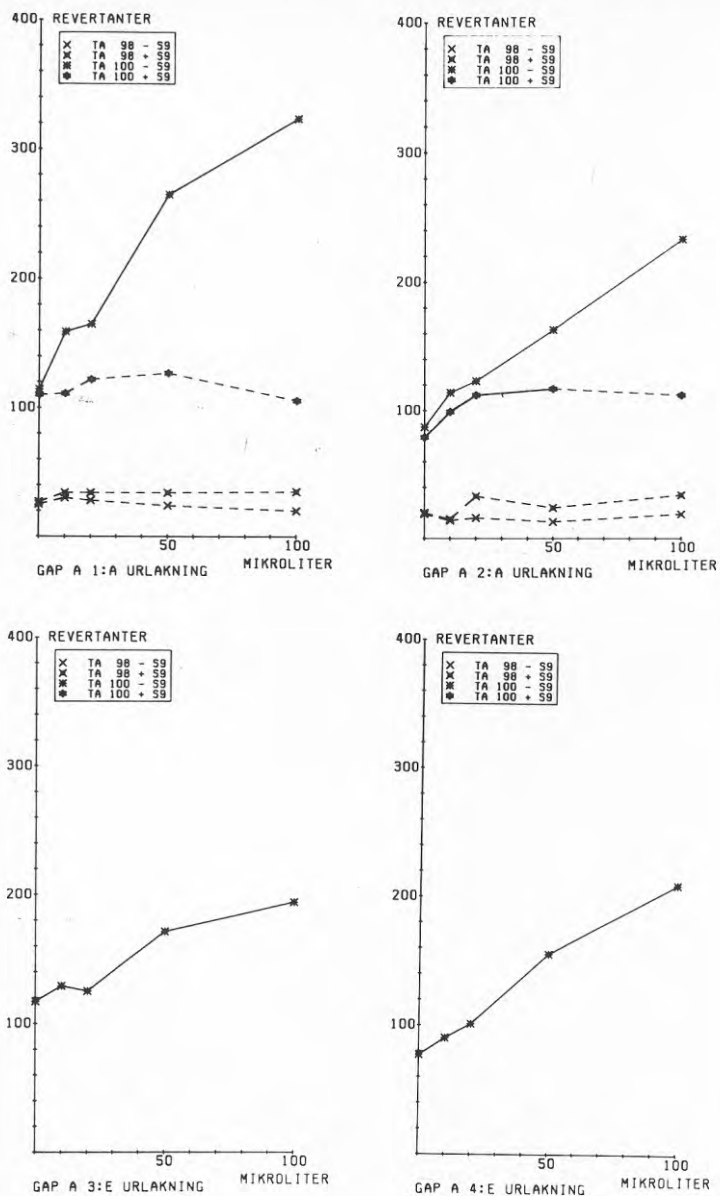
Figur 2. Principschema för använt urlaknings- och koncentrationsförfarande.



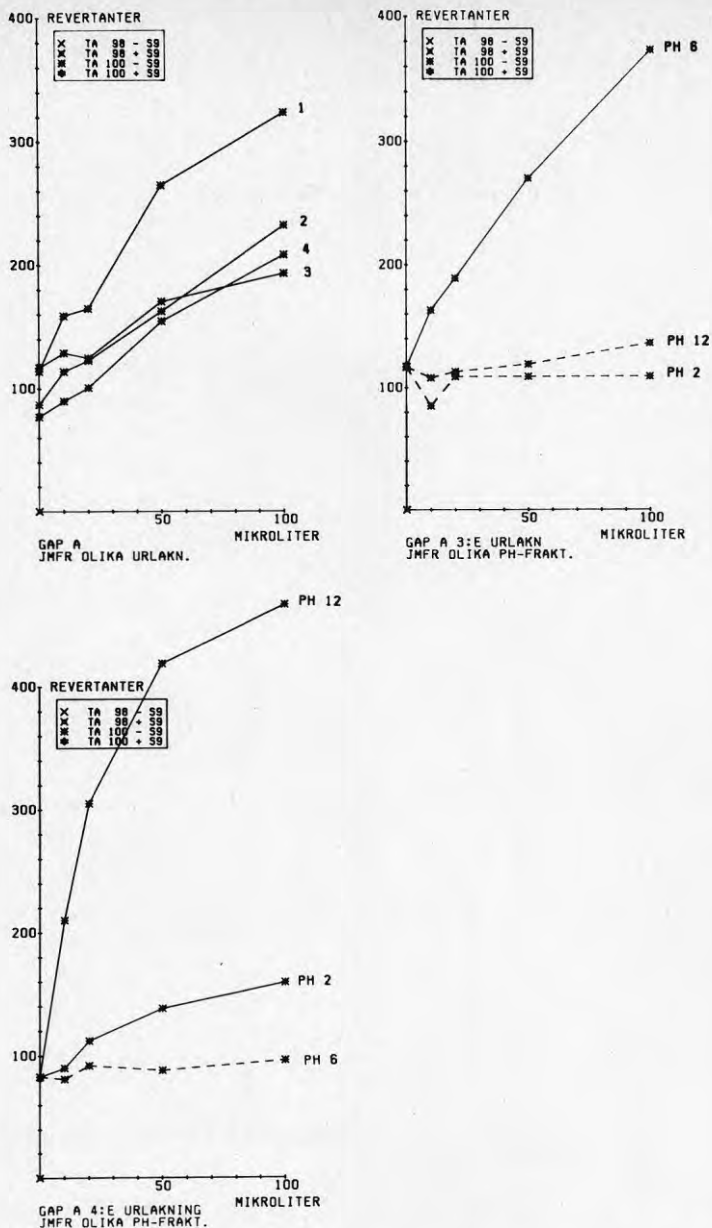
Figur 3. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat och klorerat destvatten från asfaltbehandlade järnrör. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Helledragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



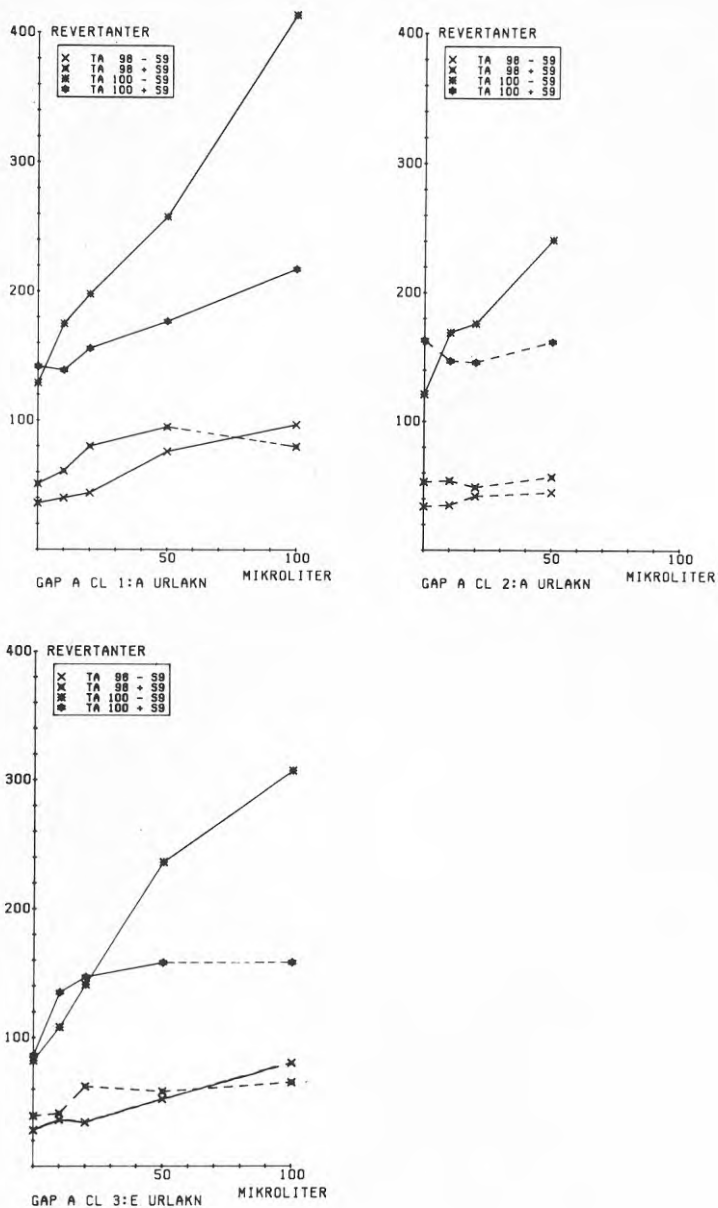
Figur 4. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat och klorerat destvatten från cementbehandlade järnrör och oklorerat destvatten från rör av glasfiberarmerad epoxi. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Heldragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



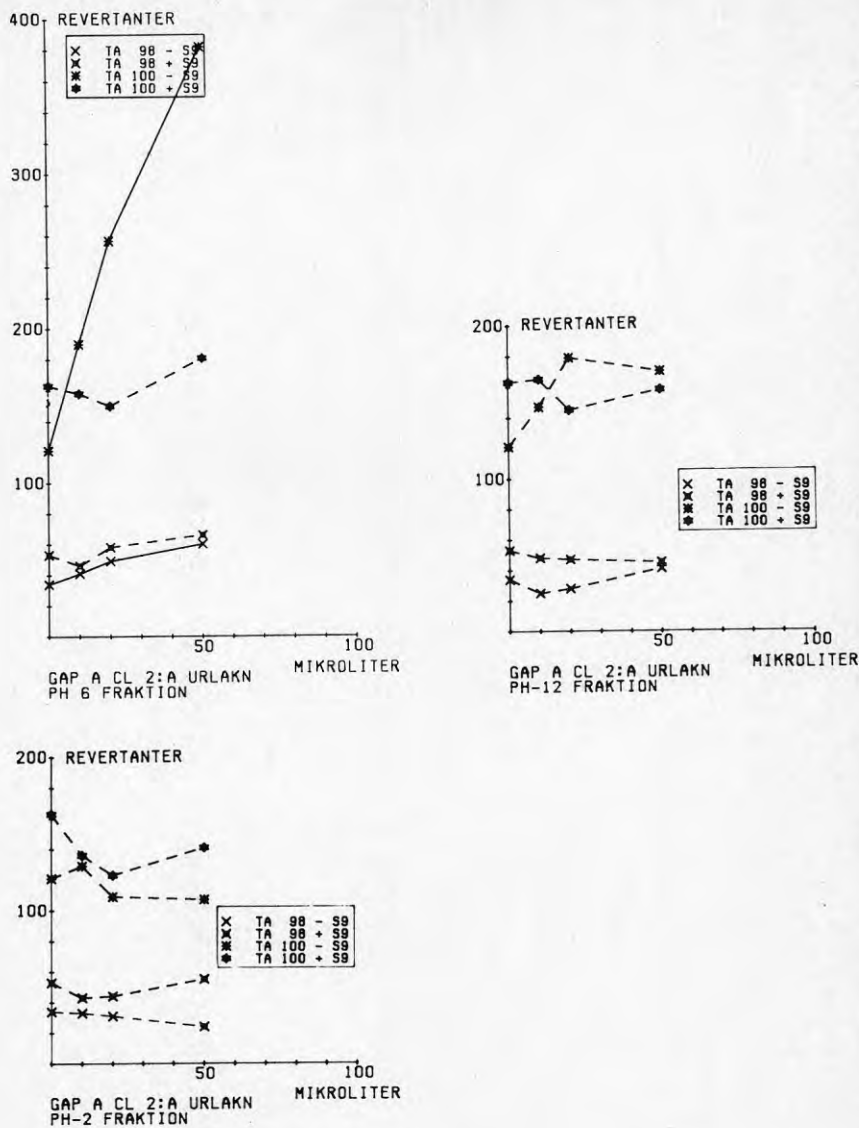
Figur 5. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat destvatten från fyra på varandra följande urlakningar av rör av glasfiberarmerad polyester (GAP), första tillverkning (A). Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Helledragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



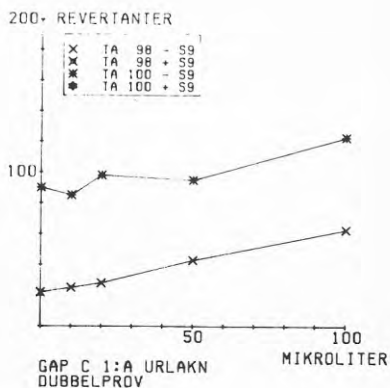
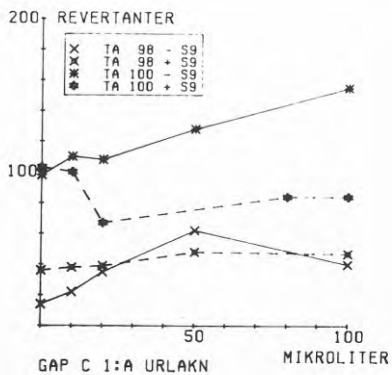
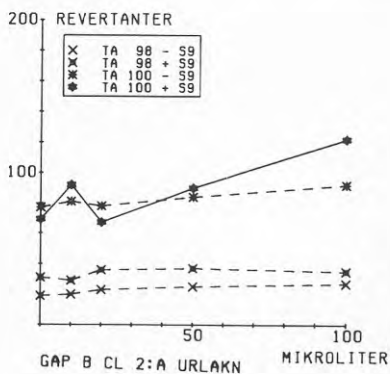
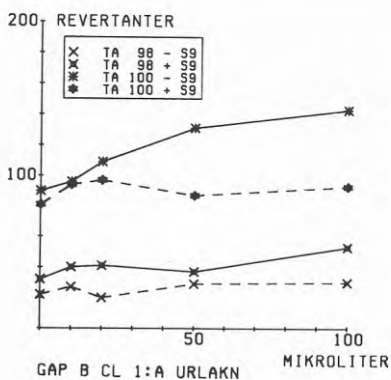
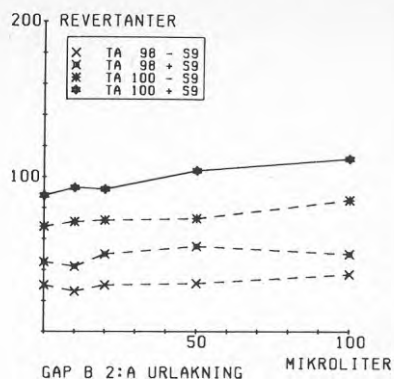
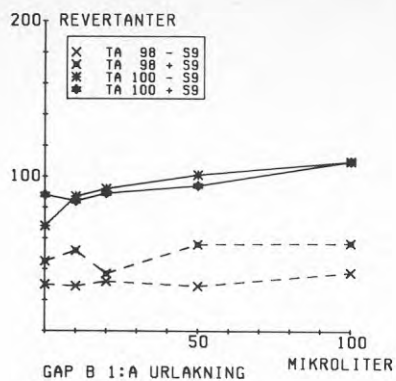
Figur 6. Jämförelse mellan mutagenicitet med Salmonella TA 100 utan S9 i extrakt från fyra urlakningar av GAP-rör (A) med oklorerat destvatten. Dessutom jämförelse mellan de olika enskilda fraktionernas mutagenicitet från XAD-adsorption vid olika pH-värden. I det första fallet gjordes adsorptionerna i ordningen pH 6, pH 12, pH 2 och i det andra fallet i ordningen pH 12, pH 2 och pH 6. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Heldragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



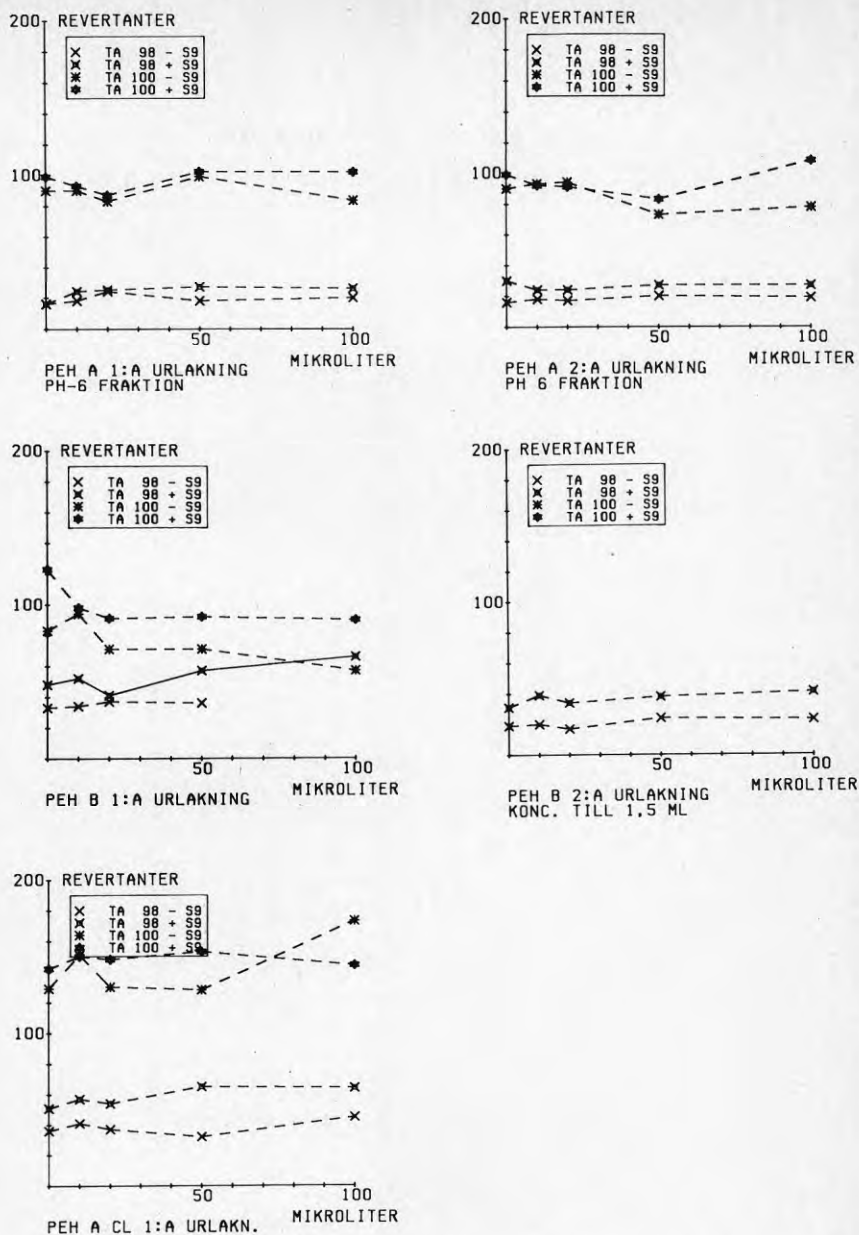
Figur 7. Mutagenicitet i koncentrat av klorerat vatten från GAP-rör (A). Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Helt dragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



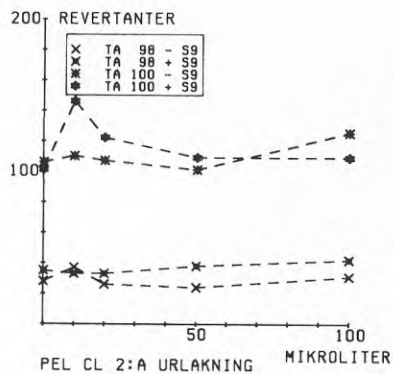
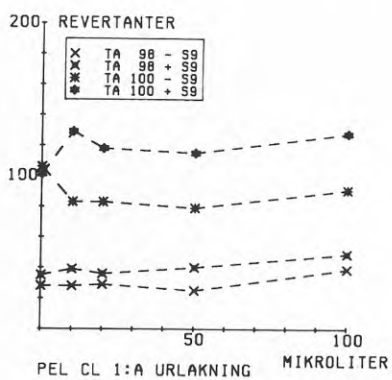
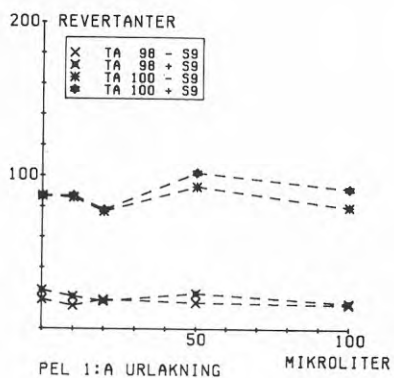
Figur 8. Jämförelse mellan de olika enskilda pH-fraktionernas mutagenicitet från det andra urlakningsvattnet med klorerat vatten från GAP-rör (A). XAD-adsorptionerna gjordes i ordningen pH 6, pH 12 och pH 2. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsatts av olika doser extrakt. Helden linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



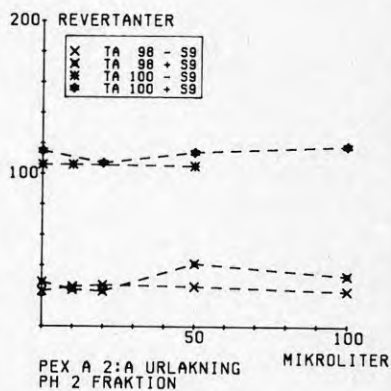
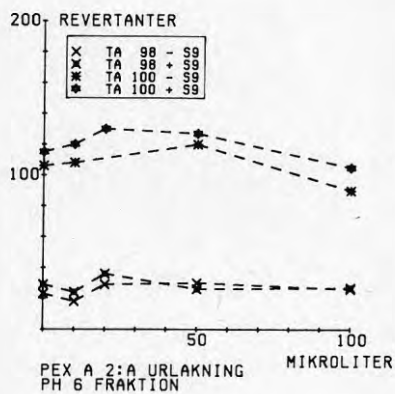
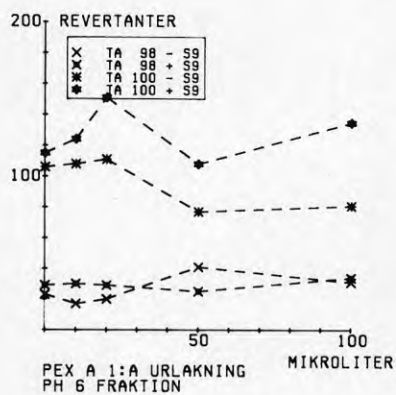
Figur 9. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat och klorerat destvatten från GAP-rör av tillverkningsats (B) samt oklorerat destvatten från tillverkning (C). Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Heldragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



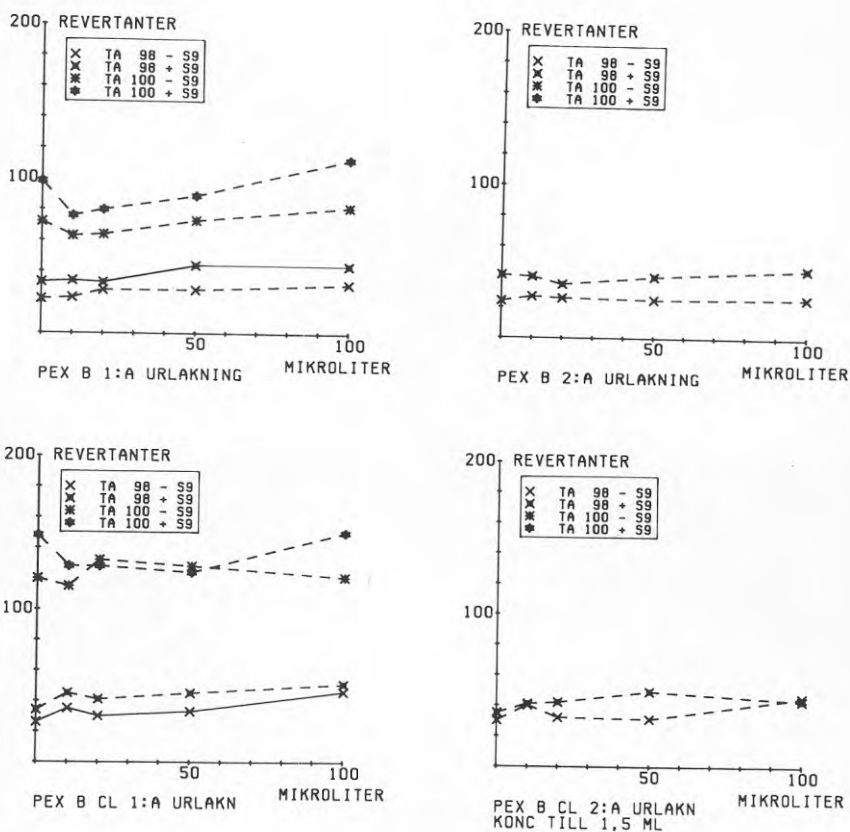
Figur 10. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat och klorerat destvatten från polyetenrör, PEH. Det oklorerade vattnet från första omgång slang PEH (A), adsorberades på XAD endast vid pH 6. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Helledragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



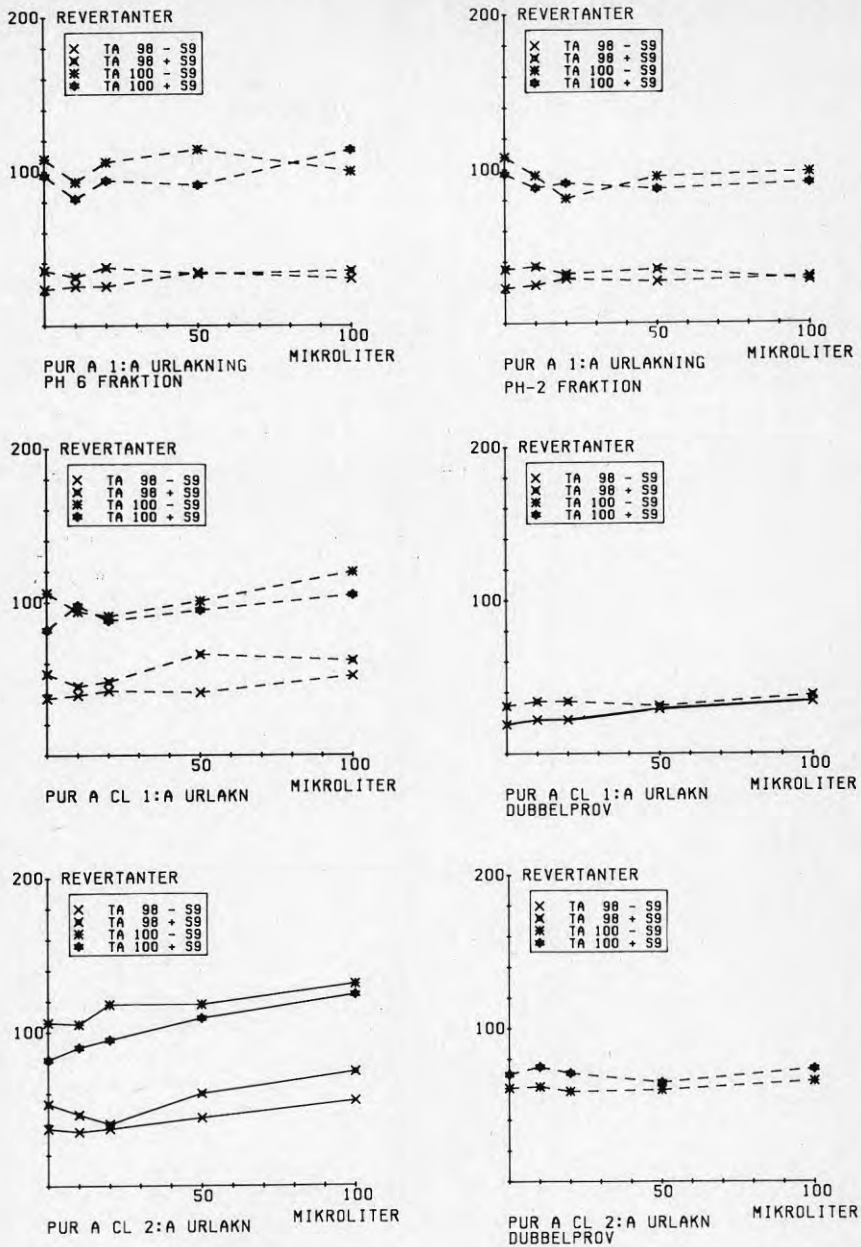
Figur 11. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat och klorerat destvatten från polyetenrör, PEL. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt.



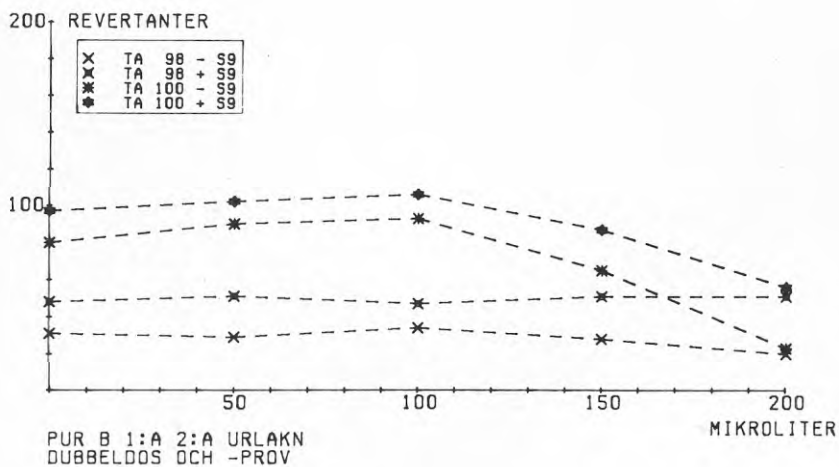
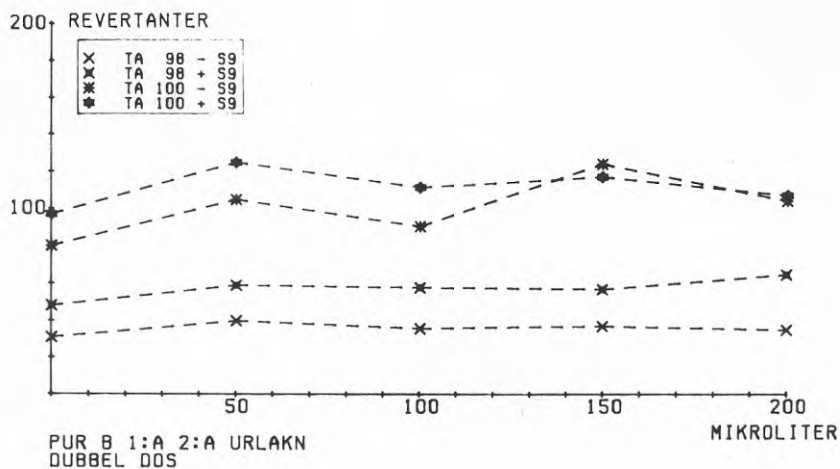
Figur 12. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat destvatten från rör av tvärbunden polyeten, PEX. Urlakningsvattnet från denna första omgång slang (A) adsorberades på XAD endast vid pH 6 (första urlakningsvattnet), respektive pH 6 och pH 2 (andra urlakningsvattnet). Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt.



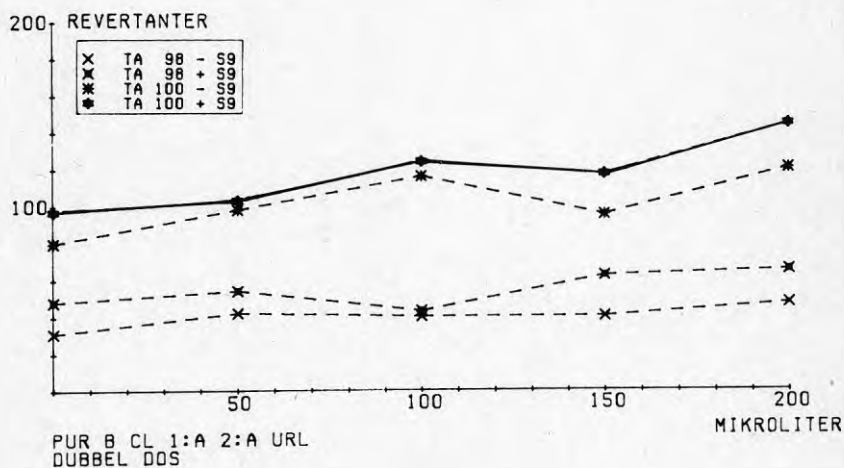
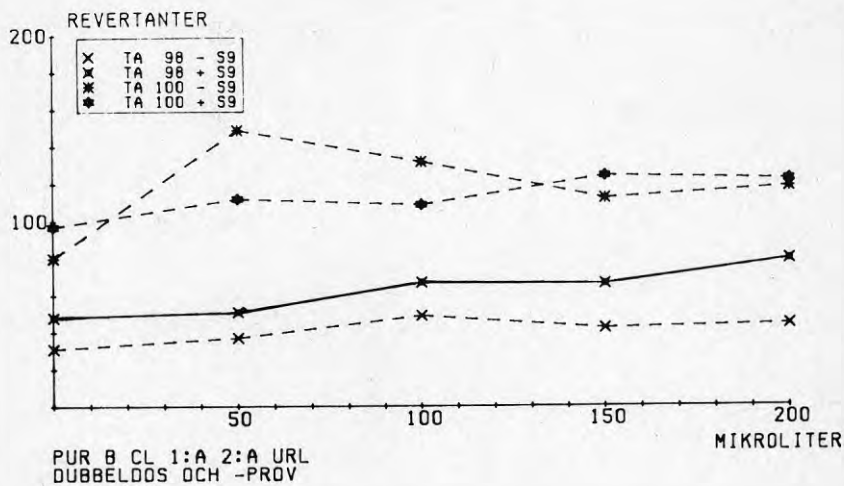
Figur 13. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat och klorerat destvatten från PEX-slang från andra omgången slang (B). Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Helt dragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



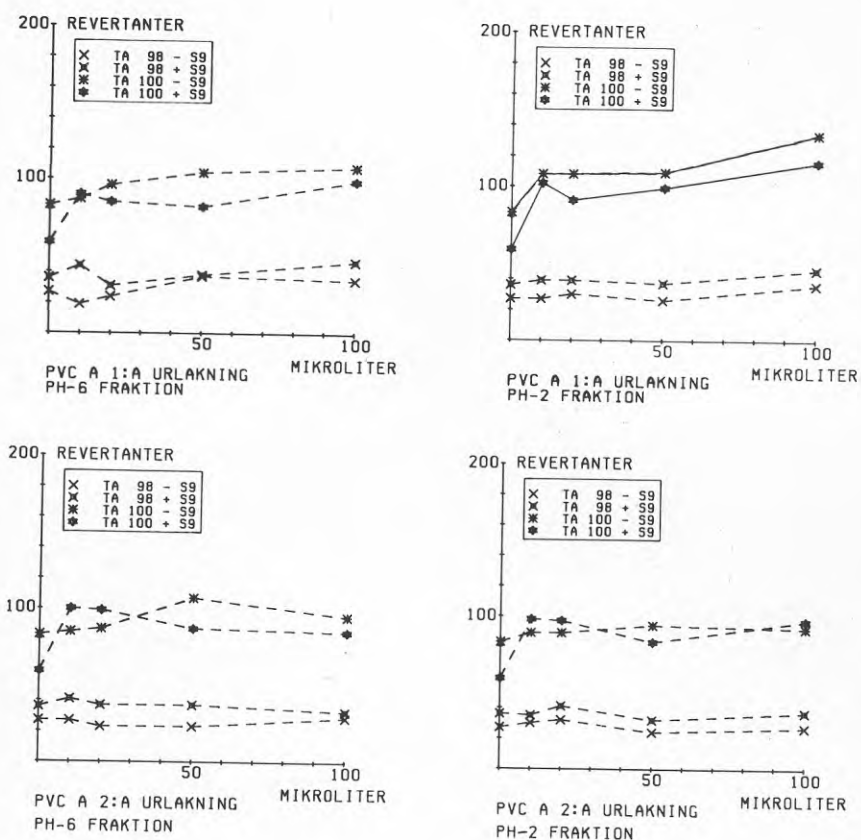
Figur 14. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat och klorerat destvatten från polyurethanbehandlade järnrör (PUR), första omgången rör (A). Det första urlakningsvattnet adsorberades bara på XAD vid pH 6 och pH 2. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Helledragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



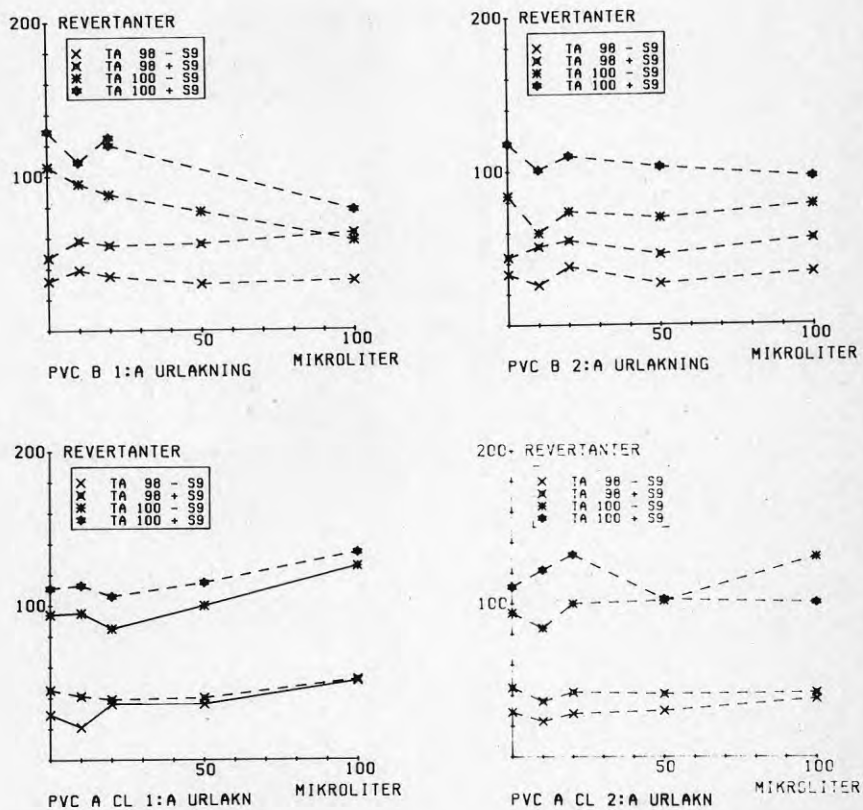
Figur 15. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat destvatten från PUR-rör, andra omgången (B). Hopslagna extrakt från första och andra urlakningen har testats med upp till dubbla doser jämfört med övriga försök. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Helledragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



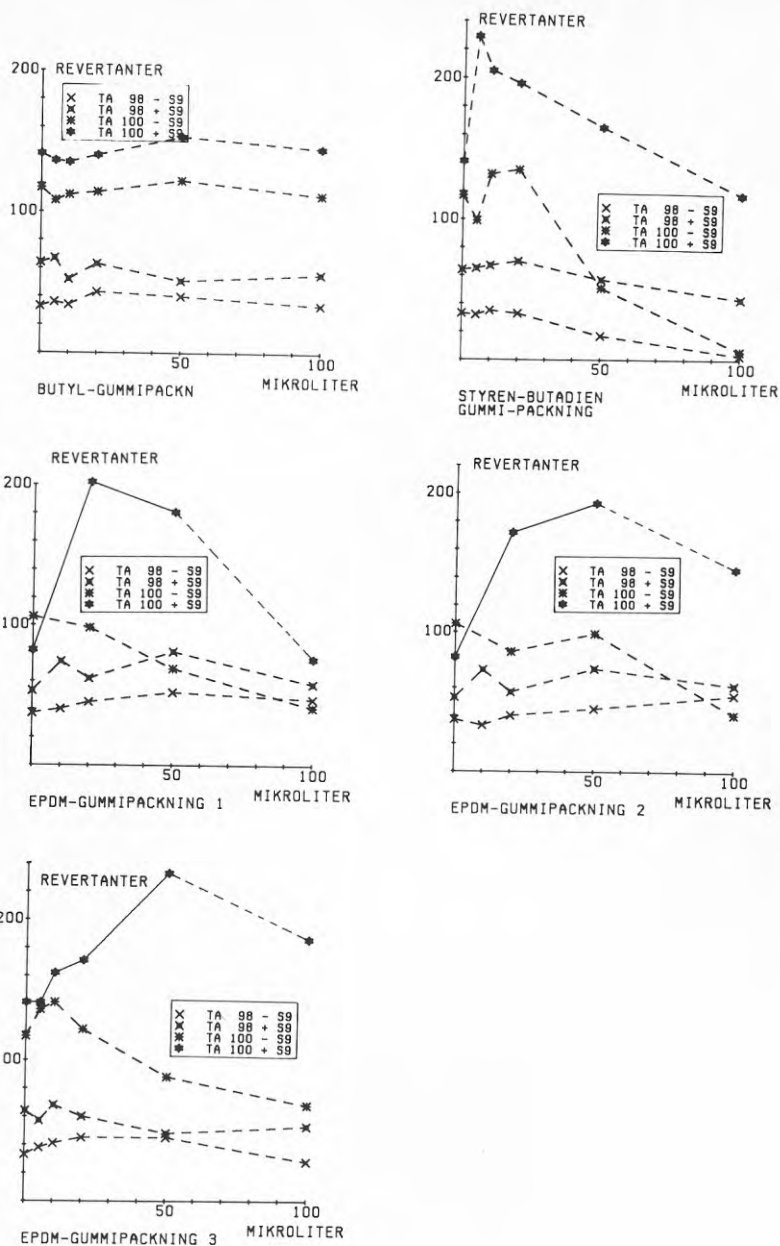
Figur 16. Mutagenicitet i koncentrat av klorerat destvatten från PUR-rör, andra omgången (B). Hopslagna extrakt från första och andra urlakningen har testats med upp till dubbla doser jämfört med övriga försök. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Heldragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



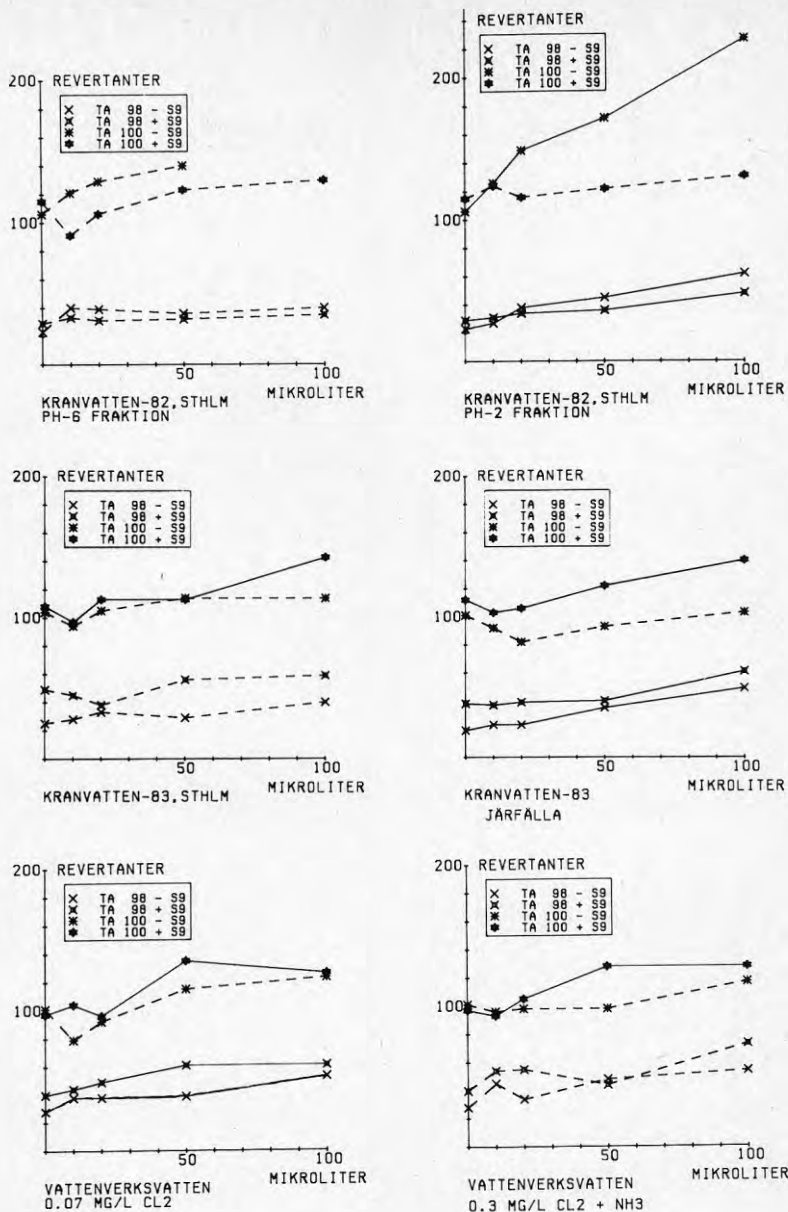
Figur 17. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat destvatten från PVC-rör, första omgången rör (A). XAD-adsorptionerna gjordes endast vid pH 6 och pH 2. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Heldragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



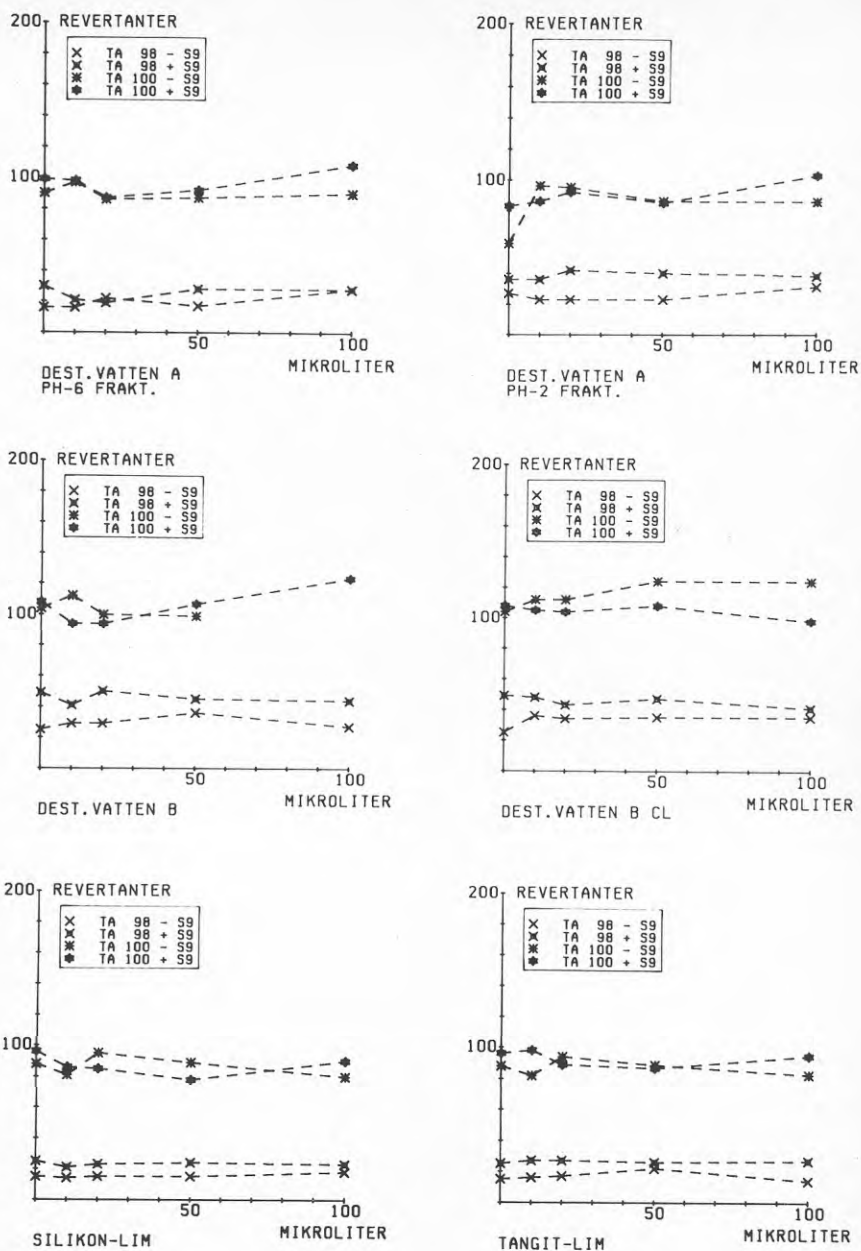
Figur 18. Mutagenicitet i koncentrat av klorerat destvatten från PVC-rör (A) samt oklorerat destvatten från andra omgången rör PVC (B). Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Heldragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



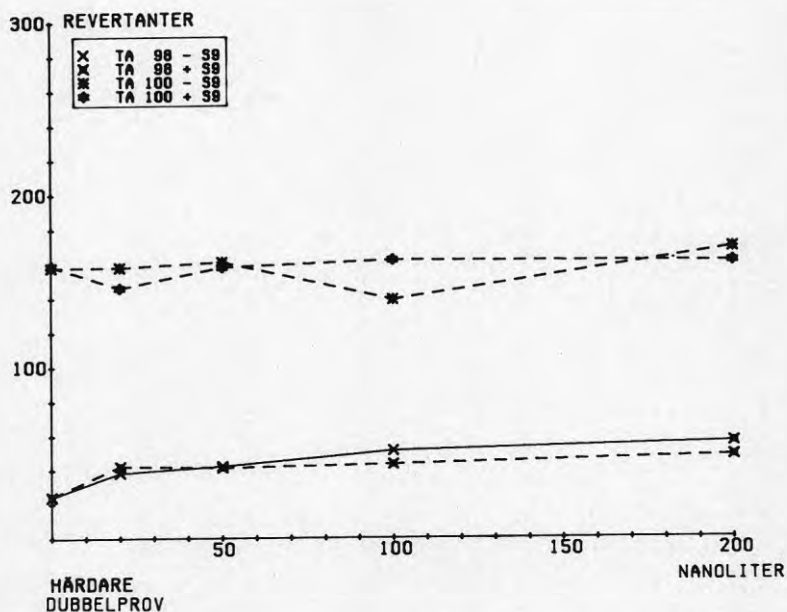
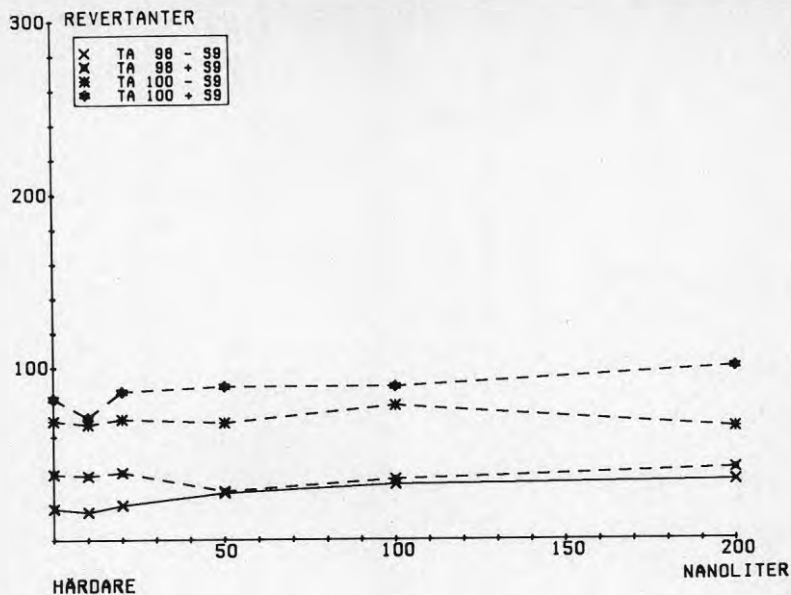
Figur 19. Gummipackningar. Mutagenicitet i koncentrat av oklorerat destvatten där materialen lakats ur. XAD-adsorptionerna gjordes endast vid pH 6. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Helldragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



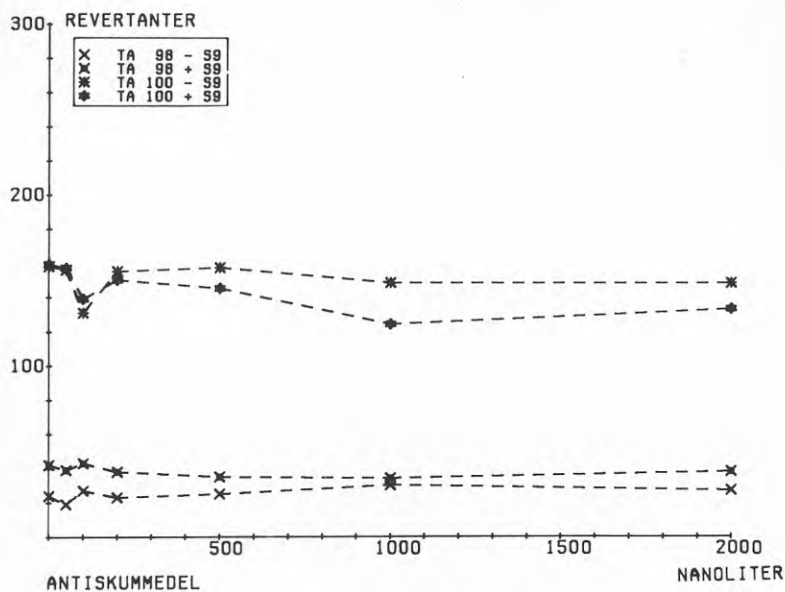
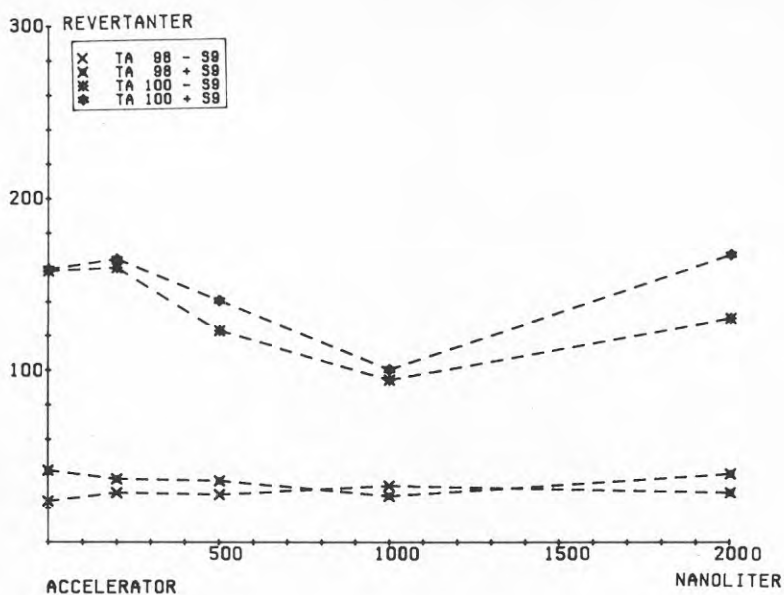
Figur 20. Mutagenicitet i koncentrat av dricksvatten. Kranvattnet som undersöktes 1982 adsorberades på XAD endast vid pH 6 och pH 2. Stockholmsprovet från 1983 togs på samma ställe. Vattenverksvattnen togs samtidigt på utgående vatten efter olika kloreringsförfaranden. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor vid tillsats av olika doser extrakt. Heldragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



Figur 21. Kontroller. Mutagenicitet dels i koncentrat av destvatten vid två olika tillfällen, dels av urlakningsvattnet från använda lim (XAD-adsorption endast vid pH 6). Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på två parallella plattor.



Figur 22. Mutagenicitetstest av den härdare som används vid framställning av GAP-rör. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på tre parallella plattor vid tillsats av olika doser, motsvarande mängden ospätt prov. Helt dragen linje anger att den beräknade regressionslinjen är signifikant skild från noll.



Figur 23. Mutagenicitetstest av den accelerator och det antiskummedel som används vid framställning av GAP-rör. Varje punkt anger medelvärdet av antalet revertanter på tre parallella plattor vid tillsats av olika doser, motsvarande mängden ospätt prov (acceleratorn var dock 10%-ig).

**Denna rapport hänför sig till forskningsanslag 810593-9
från Statens råd för byggnadsforskning till Statens
miljömedicinska laboratorium, Stockholm.**

Art.nr: 6705037

**Abonnemangsgrupp:
W. Installationer**

**Distribution:
Svensk Byggtjänst, Box 7853
103 99 Stockholm**

R37: 1985

ISBN 91-540-4349-2

Statens råd för byggnadsforskning, Stockholm

Cirkapris: 35 kr exkl moms