

POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ INŻYNIERII ŚRODOWISKA I ENERGETYKI
KATEDRA BIOTECHNOLOGII ŚRODOWISKOWEJ



Politechnika
Śląska



Detoksykacja ścieków w oczyszczalni hydrofitowej

*Detoxification of wastewater in constructed
wetlands*

Obszerne streszczenie rozprawy doktorskiej

mgr inż. Justyna Drzymała

Promotor pracy:
dr hab. inż. Joanna Kalka, prof. Pol. Śl.

Badania były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu
Mechanizm usuwania farmaceutyków w oczyszczalniach hydrofitowych
UMO-2012/05/B/ST8/0273
oraz przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
w ramach grantu badawczego BKM-565/RIE8/2015

Gliwice, 2019

Spis treści

1. Wprowadzenie.....	3
2. Tezy i cel pracy	4
3. Materiały i metody	5
3.1. Materiały	5
3.2. Metodyka analiz fizykochemicznych.....	7
3.3. Metodyka testów toksyczności	7
3.4. Metodyka badań statystycznych	8
3.5. Klasyfikacja toksyczności substancji chemicznych i ścieków.....	9
3.6. Wyznaczenie HC ₅ oraz RQ.....	9
3.7. Interakcje substancji w mieszaninie farmaceutyków	9
4. Wyniki.....	10
4.1. Badanie toksyczności farmaceutyków	10
4.2. Analizy fizykochemiczne ścieków z oczyszczalni hydrofitowej.....	14
4.3. Badanie toksyczności ścieków z oczyszczalni hydrofitowej	14
4.3.1. Toksyczność badanych ścieków	14
4.3.2. Test na reprodukcję dżdżownic <i>Eisenia fetida</i>	16
4.3.3. Test genotoksyczności względem komórek bobu <i>Vicia faba</i>	17
4.3.4. Testy aktywności enzymów antyoksydacyjnych	18
4.3.5. Wyznaczenie korelacji	20
4.4. Ocena detoksykacji ścieków	22
5. Dyskusja wyników	24
5.1. Toksyczność farmaceutyków	24
5.2. Analizy fizykochemiczne ścieków z oczyszczalni hydrofitowej.....	26
5.3. Zmienność ekotoksykologiczna ścieków z oczyszczalni hydrofitowej.....	26
6. Wnioski	29
7. Literatura	31

1. Wprowadzenie

Intensywny rozwój przemysłu farmaceutycznego, wzrost zużycia leków oraz niecałkowite usuwanie zanieczyszczeń w konwencjonalnych oczyszczalniach ścieków doprowadziły do wprowadzania mikrozanieczyszczeń do środowiska naturalnego. Substancje takie jak farmaceutyki czy środki higieny osobistej, stanowią poważny problem z powodu potencjalnego, szkodliwego działania na organizmy wodne i glebowe.

Na całym świecie obecnie stosowanych jest ponad 4 tysiące różnych środków farmaceutycznych oraz wiele innych związków chemicznych wykorzystywanych do leczenia chorób oraz profilaktyki ludzi i zwierząt (Boxall i in., 2012). Bardzo duża konsumpcja środków farmaceutycznych prowadzi do uwalniania ich pozostałości oraz produktów metabolizmu do środowiska naturalnego. Po wydaleniu farmaceutyków i wprowadzeniu ich do środowiska, zarówno związki macierzyste jak i metabolity mogą ulegać zmianom strukturalnym na skutek działania procesów biotycznych i abiotycznych.

Farmaceutyki mogą dostać się do środowiska naturalnego poprzez źródła punktowe oraz rozproszone. Pierwsze z nich charakteryzują się możliwością ich zlokalizowania, np. oczyszczalnia ścieków, szpital, szambo. Źródła rozproszone dotyczą spływów rolniczych z pól uprawnych czy wycieków z systemów oczyszczania ścieków (Li, 2014). W porównaniu do źródeł punktowych, mają one na ogół mniejsze znaczenie środowiskowe, ze względu na naturalne procesy oczyszczania zachodzące w glebie (Murray i in., 2010).

Istotnym zagrożeniem środowiskowym wynikającym z obecności farmaceutyków w wodach powierzchniowych i w glebie jest możliwość ich pobierania przez różne gatunki roślin. Na akumulację oraz transformację mikrozanieczyszczeń największy wpływ mają właściwości fizykochemiczne pobieranych substancji (np. hydrofobowość), ale również fizjologiczny charakter rośliny oraz właściwości gleby. Farmaceutyki obecne w środowisku w niskich stężeniach mogą również działać toksycznie lub hamować wzrost roślin oraz mikroorganizmów glebowych (Bartrons i Peñuelas, 2017).

Leki oraz ich metabolity wykrywane są w środowisku naturalnym od wielu lat. Ich obecność została potwierdzona nie tylko w wodzie powierzchniowej i glebie, ale również w wodach podziemnych oraz w wodzie pitnej. Badania prowadzone w wielu krajach dowodzą, że ścieki z oczyszczalni są główną drogą przez którą farmaceutyki zostają wprowadzone do wód powierzchniowych (Gardner i in., 2012) i mogą kumulować się w środowisku (Luo i in., 2014). Leki przeciwbólowe i przeciwzapalne należą do najczęściej wykrywanych PPCPs w ściekach ze względu na ich wysokie zużycie oraz dostępność bez recepty (Yang i in., 2017).

Obecność farmaceutyków w środowisku naturalnym niesie ze sobą zagrożenie zarówno dla organizmów zwierzęcych, roślinnych, jak i dla człowieka. Podstawowe testy toksyczności opierają się na określeniu efektów ostrych i chronicznych względem organizmów pochodzących z różnych poziomów troficznych. Jednak bardzo często stężenia wykrywane w środowisku naturalnym nie wywołują efektów ostrych u bioindykatorów. Z tego powodu analizuje się również zmiany w materiale genetycznym (Herrero i in., 2012), w strukturach komórkowych (Prado i in., 2015) oraz wpływ na reprodukcję organizmów modelowych (Załęska-Radziwiłł i in., 2011).

Oprócz toksyczności substancji aktywnych bardzo ważna jest również ocena interakcji zachodzących w mieszaninie. Aktywność każdego składnika mieszaniny może różnić się w zależności od stężenia oraz od mechanizmu działania. Zaobserwować można zwiększenie toksyczności mieszaniny (synergizm), zmniejszenie (antagonizm) lub działanie szkodliwe będące sumą toksyczności jej składników (działanie addytywne) (Vasquez i in., 2014).

Problem obecności substancji farmaceutycznych w środowisku jest stale aktualny o czym świadczy między innymi Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2013/39/UE z dnia 12 sierpnia 2013 r., która zobowiązuje wszystkie państwa członkowskie do monitorowania każdej substancji znajdującej się na liście obserwacyjnej. Przykładem takiej substancji jest diklofenak, czyli niesteroidowy lek o działaniu przeciwzapalnym i przeciwbólowym. Innym farmaceutykiem, który ma bardzo poważny wpływ na środowisko naturalne, jest sulfametoksazol. Jest to antybiotyk o działaniu bakteriostatycznym. Jedną z głównych obaw związanych z zanieczyszczeniem środowiska tą grupą leków jest coraz częściej występująca antybiotykooporność bakterii. Ze względu na ich powszechne stosowanie, szybkość wydalania, wysoką rozpuszczalność i trwałość stwarzają poważne ryzyko względem organizmów zamieszkujących środowisko naturalne.

Konwencjonalne oczyszczalnie ścieków, niezależnie od zastosowanej technologii, służą poprawie warunków higienicznych wód, usunięciu degradablealnych związków organicznych oraz składników odżywczych, związków azotu i fosforu, które są odpowiedzialne za zjawisko eutrofizacji. Stosowanie różnorodnych środków chemicznych (farmaceutyki, pestycydy, inhibitory korozji, metale ciężkie, barwniki) stwarza nowe wyzwania przed konwencjonalnie stosowanymi systemami (Eggen i in., 2014).

Oczyszczalnie ścieków oparte na pracy osadu czynnego, bioreaktory membranowe oraz membrany separacyjne są technologiami kosztownymi, które często nie są stosowane na obszarach wiejskich (Wu i in., 2015). Systemy wykorzystujące metody doczyszczania ścieków, takie jak koagulacja/flokulacja, adsorpcja na węglu aktywnym, ozonowanie czy zaawansowane procesy utleniania, obarczone są wysokimi kosztami inwestycyjnymi i eksploatacyjnymi (Luo i in., 2014). Z tych powodów poszukiwane są trwałe, naturalne, a jednocześnie ekonomiczne metody usuwania mikrozanieczyszczeń ze środowiska naturalnego. Jednym z przykładów takich rozwiązań są oczyszczalnie hydrofitowe (*ang. Constructed Wetlands – CWs*). Są to sztucznie wybudowane tereny podmokłe, łączące procesy biologiczne, chemiczne i fizyczne, zachodzące w warunkach naturalnych.

2. Tezy i cel pracy

Na podstawie dostępnych danych literaturowych dotyczących skuteczności oczyszczania ścieków w oczyszczalniach hydrofitowych, możliwości usuwania mikrozanieczyszczeń w tych systemach oraz właściwości wybranych do badań substancji farmaceutycznych sformułowano następujące tezy pracy:

Teza główna:

W oczyszczalni hydrofitowej możliwa jest detoksykacja ścieków zawierających modelowe substancje farmaceutyczne, takie jak diklofenak oraz sulfametoksazol.

Tezy cząstkowe:

- *Możliwe jest usunięcie substancji modelowych ze ścieków oczyszczanych metodą sztucznych mokradel.*
- *Istnieje zależność pomiędzy parametrami fizykochemicznymi ścieków a ich toksycznością.*

Celem przeprowadzonych badań była ocena detoksykacji ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej usuwającej modelowe substancje farmaceutyczne, takie jak diklofenak i sulfametoksazol, jak również ocena właściwości ekotoksykologicznych tych związków oraz ich mieszaniny.

Badania prowadzono w dwóch etapach:

Etap I obejmował ocenę właściwości ekotoksykologicznych wybranych modelowych substancji farmaceutycznych: diklofenaku oraz sulfametoksazolu oraz równowagowej mieszaniny tych leków. Ocena została dokonana przy użyciu 7 testów toksyczności, w tym testów ostrych, testów reprodukcji, genotoksyczności oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Etap II polegał na ocenie toksyczności ścieków pobranych z oczyszczalni hydrofitowej. Oceny dokonano przy wykorzystaniu tych samych testów toksyczności, które zastosowano w etapie I badań. Dodatkowo wykonano analizy fizykochemiczne próbek (oznaczono stężenia analizowanych farmaceutyków, stężenie azotu amonowego oraz całkowitego węgla organicznego).

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

Wybór diklofenaku, jako jednej z substancji modelowych wykorzystanych w badaniach, ma związek z Decyzją Wykonawczą Komisji Unii Europejskiej z 20 marca 2015 roku w sprawie ustanowienia listy obserwacyjnej substancji do celów monitorowania. Diklofenak znalazł się na liście 10 substancji lub grup substancji, które wykazują znaczne ryzyko względem środowiska wodnego, a dostępne dane z monitorowania są niewystarczające do określenia rzeczywistego ryzyka. Zgodnie z Dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2013/39/UE z dnia 12 sierpnia 2013 roku wszystkie państwa członkowskie są zobligowane do monitorowania każdej substancji znajdującej się na liście obserwacyjnej przez okres co najmniej 12 miesięcy w wybranych stacjach monitorowania.

Głównym zagrożeniem wynikającym z obecności antybiotyków, w tym sulfametoksazolu, w środowisku naturalnym jest pojawiająca się antybiotykooporność bakterii. Powszechne stosowanie, szybkość wydalania oraz trwałość w środowisku to cechy farmaceutyków, które sprzyjają lekooporności mikroorganizmów. Na skutek horyzontalnego transferu genów czy powstających mutacji genomowych bakterie zyskują oporność na najczęściej występujące w środowisku antybiotyki (Frost i in., 2005). Oporność mikroorganizmów na stosowane antybiotyki, zwłaszcza z grupy sulfonamidów, związana jest z obecnością genów *sul1*, *sul2* oraz *sul3*. Rozprzestrzenianie się tych genów sprawia, że

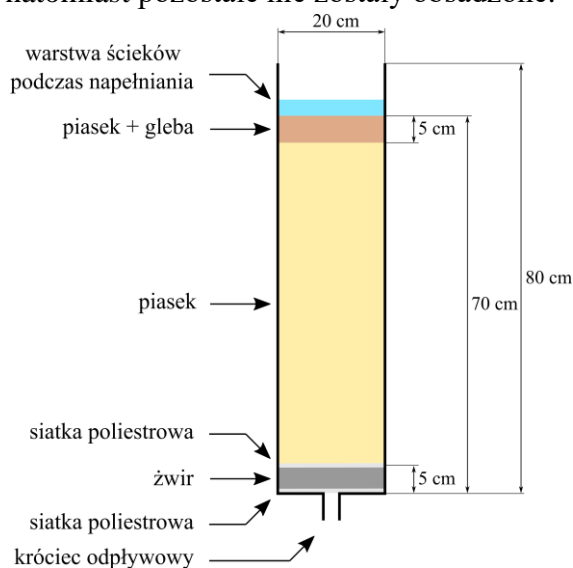
bakterie są niewrażliwe na działanie wielu leków. Badania wykazały, że *sul1* oraz *sul2* są genami najczęściej występującymi w środowisku naturalnym (Berendonk i in., 2015).

Podstawowe informacje na temat wybranych substancji farmaceutycznych przedstawia Tabela 1.

Tabela 1 Podstawowe informacje o DKF oraz SMX.

Analizowany związek	Diklofenak	Sulfametoksazol
Nazwa według IUPAC	kwask o-N-(2,6-dichlorofenyl) aminofenyllooctowy	4-amino-N-(5-metylo-1,2-oksazol-3-ilo) benzenosulfonamid
Wzór sumaryczny	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Numer CAS	15307-86-5	723-46-6
Masa molowa [g/mol]	296.15	253.28
pK _a	4.15	5.6 – 5.7
logK _{OW} (pH 8)	4.51	0.89

Stanowisko badawcze składało się z zestawu kolumn będących laboratoryjnym modelem oczyszczalni hydrofitowej o przepływie podpowierzchniowym pionowym. Reaktory z tworzywa sztucznego zostały wypełnione warstwą żwiru, piasku oraz piasku wymieszanego z glebą ogrodową (Rysunek 1). Połowa kolumn została obsadzona mискantem olbrzymim *M. giganteus*, natomiast pozostałe nie zostały obsadzone.



Rysunek 1 Schemat wypełnienia reaktora stosowanego w badaniach.

Stanowisko badawcze zasilane było ściekami syntetycznymi (przygotowanymi na podstawie zmodyfikowanego protokołu Nopens i in., 2001) zawierającymi dwie substancje farmaceutyczne: diklofenak i sulfametoksazol w stężeniach 2 mg/L każdy. Kolumny testowe były zasilane przygotowanymi ściekami w trybie zstępującym. Stanowisko badawcze oczyszczalni hydrofitowej zostało podzielone na dwa układy. Do pierwszego z nich dozowano ścieki w objętości 2.5 L/dobę 2 razy w tygodniu, natomiast do układu drugiego w objętości 1 L/dobę 5 razy w tygodniu. Układ badawczy działał w nieziennej konfiguracji przez 8 miesięcy przed rozpoczęciem poboru próbek. Ścieki surowe oraz oczyszczone

pobierano z układu w ośmiu cyklach w 2016 roku. Każdorazowo pobierano 1.5 L ścieków surowych oraz 1.5 L odcieków z każdego zestawu kolumn.

Ścieki dopływające do oczyszczalni oznaczono jako [Dopływ +CTRL] w przypadku ścieków kontrolnych oraz [Dopływ +Farm.] dla ścieków syntetycznych wzbogaconych o badane farmaceutyki: DKF i SMX w stężeniu 2 mg/L każdy. Odcieki pochodzące z oczyszczalni hydrofitowej oznaczono jako [Rośliny +CTRL] i [Rośliny +Farm.] dla kolumn obsadzonych *M. giganteus* oraz [Brak roślin +CTRL] i [Brak roślin +Farm.] dla kolumn nieobsadzonych. Kolumny oznaczone „U1” pochodzą z układu pierwszego, do którego dozowano ścieki w objętości 2.5 L/dobę 2 razy w tygodniu, natomiast kolumny „U2” oznaczają układ 2, do którego dozowano ścieki w objętości 1 L/dobę 5 razy w tygodniu.

3.2. Metodyka analiz fizykochemicznych

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena detoksykacji ścieków. Z tego powodu wykonano tylko podstawowe analizy fizykochemiczne ścieków, takie jak oznaczenie stężenia SMX oraz DKF, a także określenie stężenia azotu amonowego oraz całkowitego węgla organicznego. Badania prowadzone na opisanym modelu oczyszczalni hydrofitowej wykazały, że wymienione parametry miały największy wpływ na proces oczyszczania ścieków, co sugerować może, że parametry te będą wykazywały wpływ również na proces detoksykacji (Nowrotek i in., 2016).

Analizy stężeń badanych farmaceutyków wykonano zarówno w ściekach surowych jak i w odciekach z oczyszczalni hydrofitowej. W tym celu wykorzystano wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z detektorem o zmiennej długości fali (system UltiMate 3000, Dionex Corporation, USA). Analizę danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania Dionex Chromeleon™ 6.8. Stężenie azotu amonowego (N-NH₄) oznaczono metodą spektrofotometryczną przy użyciu testów kuwetowych firmy MERCK Millipore. Zakres pomiarowy wynosił 2 – 150 mg/L N-NH₄. Stężenie całkowitego węgla organicznego (TOC) oznaczono przy użyciu analizatora TOC-L (Shimadzu Corporation, Japonia).

3.3. Metodyka testów toksyczności

*Test inhibicji luminescencji bakterii *Vibrio fischeri**

Test Microtox służy do oceny krótkoterminowej toksyczności ostrej z wykorzystaniem bakterii wykazujących luminescencję. Test przeprowadzono zgodnie z normą ISO 11348-3 (2007). Ekspozycja bakterii na działanie substancji toksycznej powoduje zakłócenie procesów metabolicznych, co prowadzi do hamowania luminescencji w stosunku do próbki kontrolnej. Zmiana stopnia świecenia jest miarą toksyczności analizowanej substancji chemicznej.

*Test immobilizacji skorupiaków *Daphnia magna**

Test immobilizacji skorupiaków *D. magna* został przeprowadzony zgodnie z procedurą OECD 202 (2004). Młode organizmy, nie starsze niż 24 h, eksponowano na działanie badanych substancji. Po 24 oraz 48 h odczytano liczbę martwych lub unieruchomionych organizmów *D. magna*. Procentowa liczba unieruchomionych organizmów jest wprost proporcjonalna do toksyczności badanej substancji.

*Test inhibicji wzrostu roślin *Lemna minor**

Test inhibicji wzrostu roślin *L. minor* został przeprowadzony zgodnie z procedurą OECD 221 (2006). Rośliny eksponuje się na działanie substancji toksycznych. Po 7 dniach zlicza się liczbę listków roślin w każdym badanym roztworze i w każdym powtórzeniu celem określenia szybkości przyrostu listków w jednostce czasu. Zahamowanie szybkości wzrostu roślin *L. minor* jest proporcjonalne do toksyczności badanej substancji.

*Metodyka testu na reprodukcję dżdżownic *Eisenia fetida**

Badanie wpływu substancji chemicznej na reprodukcję organizmów *E. fetida* wykonano zgodnie z normą OECD 222 (2004). Test pozwala na sprawdzenie, czy badane substancje wpływają na liczbę organizmów potomnych po 56 dniach trwania testu. Spadek liczby młodych dżdżownic w porównaniu do warunków kontrolnych świadczy o negatywnym wpływie badanej substancji na reprodukcję organizmów *E. fetida*.

*Metodyka testu mikrojądrowego względem komórek bobu *Vicia faba**

Test mikrojądrowy umożliwia ocenę wpływu badanej substancji na komórki stożka wzrostu korzenia bobu *V. faba* poprzez obliczenie indeksu mitotycznego komórek oraz weryfikację występowania mikrojąder i aberracji chromosomowych. Test przeprowadzono zgodnie z normą ISO 29200 (2013). Zmniejszenie wartości indeksu mitotycznego, jak również obecność mikrojąder lub aberracji chromosomowych świadczy o potencjale genotoksycznym badanej substancji. Badania przeprowadzono zarówno dla hodowli wodnej jak i glebowej (gleba referencyjna przygotowana zgodnie z OECD 222 (2004)).

Metodyka testów cytotoksyczności

W ramach badań przeprowadzono analizy aktywności dwóch enzymów antyoksydacyjnych: katalazy CAT i dysmutazy ponadtlenkowej SOD. W tym celu organizmy testowe eksponowano na działanie farmaceutyków lub analizowanych ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej. Pomiar aktywności CAT i SOD oraz ilości białka w próbkach wykonano przy użyciu spektrofotometru Evolution 220 (Thermo Fisher Scientific, Polska) oraz oprogramowania Insight 2 (2014). Stężenie białka w próbkach oznaczono za pomocą metody Bradford (1976). Aktywność CAT (EC 1.11.1.6) mierzono metodą statyczną w jednym punkcie czasowym zgodnie z metodą Góth (1991). Aktywność enzymu wyrażono w jednostce [$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$]. Aktywność SOD (EC 1.15.1.1) mierzono wykorzystując reakcję samoczynnego utleniania adrenaliny do adrenochromu w pH 10.2 zgodnie z metodą Misra i Fridovich (1972). Aktywność SOD wyrażono w jednostce [JA/min/mg_{białka}].

3.4. Metodyka badań statystycznych

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica wersja 13 (StatSoft Inc., 2016). Analizy statystyczne wyników przeprowadzono za pomocą testu Shapiro-Wilka. W przypadku, gdy rozkład wyników był normalny oraz spełniony został warunek równości wariancji (test Browna – Forsythe’a), do dalszej analizy wykorzystywano test t-Studenta (poziom istotności $\alpha=0.05$). Grupy, które nie posiadały rozkładu normalnego,

analizowano za pomocą testu U Manna-Whitney'a. Różnice uznawano za istotne statystycznie jeśli $p < 0.05$. Korelacje między zmiennymi posiadającymi rozkład normalny określono na podstawie korelacji Petersona, natomiast jeśli zmienne nie posiadały rozkładu normalnego do określenia korelacji wykorzystano test rang Spearmana ($p < 0.05$).

3.5. Klasyfikacja toksyczności substancji chemicznych i ścieków

Oceny toksyczności analizowanych substancji dokonano zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej (Commission of the European Communities, 1996) (Tabela 2). Oceny toksyczności ścieków surowych oraz odcieków z oczyszczalni hydrofitowej dokonano zgodnie z klasyfikacją Persoone i in., 2003 (Tabela 3).

Tabela 2 Klasyfikacja toksyczności substancji na podstawie wytycznych Unii Europejskiej.

EC ₅₀ /IC ₅₀	Klasyfikacja toksyczności
> 100	nietoksyczny
10 – 100	szkodliwy
1 – 10	toksyczny
0.1 – 1	bardzo toksyczny
< 0.1	ekstremalnie toksyczny

Tabela 3 Klasyfikacja toksyczności ścieków na podstawie wartości TU.

TU [-]	Klasyfikacja toksyczności
TU < 0.4	brak toksyczności
0.4 < TU < 1	niska toksyczność
1 < TU < 10	średnia toksyczność
10 < TU < 100	wysoka toksyczność
TU > 100	ekstremalna toksyczność

3.6. Wyznaczenie HC₅ oraz RQ

W celu wyznaczenia stężeń niebezpiecznych dla 5% gatunków wykorzystano metodę zaproponowaną przez Aldenberg'a i Jaworską (2000). Metoda ta polega na ekstrapolacji danych uzyskanych z testów jednogatunkowych w celu oceny ryzyka środowiskowego wywołwanego przez badaną substancję. Analizy przeprowadzono przy użyciu programu E_TX 2.1. Do oszacowania wartości HC₅ mogą zostać wykorzystane wartości NOEC, EC₅₀ lub EC₁₀. Program umożliwia sprawdzenie, czy przedstawione dane posiadają rozkład normalny, umożliwia obliczenie wartości HC₅, wraz z 95% przedziałami ufności oraz przedstawienie uzyskanych wyników na wykresach (van Vlaardingen i in., 2004).

3.7. Interakcje substancji w mieszaninie farmaceutyków

W celu określenia interakcji zachodzących w mieszaninie farmaceutyków wykorzystano równanie Könemann'a, które umożliwia ocenę współdziałania zachodzącego pomiędzy pojedynczymi związkami w mieszaninie. Określenie interakcji opiera się na wartości MTI (*ang. Mixture Toxicity Index*). Klasyfikację zależności między składnikami mieszaniny przedstawia Tabela 4 (Nagata i in., 2008).

Tabela 4 Klasyfikacja interakcji w mieszaninie na podstawie wartości MTI.

Wartość MTI [-]	Klasyfikacja interakcji
MTI < 0	działanie antagonistyczne
MTI = 0	brak działania addytywnego
0 < MTI < 1	działanie częściowo addytywne
MTI = 1	działanie addytywne
MTI > 1	działanie synergistyczne

4. Wyniki

4.1. Badanie toksyczności farmaceutyków

Celem pierwszej części badań było określenie toksyczności dwóch wybranych farmaceutyków DKF i SMX oraz ich równowagowej mieszaniny MIX.

Na podstawie uzyskanych wyników przyporządkowano farmaceutyki do odpowiedniej klasy toksyczności zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej (Commission of the European Communities, 1996). Szczegółowe zestawienie przedstawia Tabela 5. Biorąc pod uwagę najbardziej wrażliwy organizm testowy DKF oraz MIX zostały zaklasyfikowane jako toksyczne, natomiast SMX jako szkodliwy względem organizmów pochodzących ze środowiska wodnego.

Tabela 5 Klasyfikacja toksyczności farmaceutyków i ich mieszaniny względem organizmów modelowych.

Organizm modelowy	Warunki eksperymentu	EC ₅₀ /IC ₅₀ [mg/L]	Klasyfikacja toksyczności
DKF			
<i>V. fischeri</i>	2% NaCl	8.7	toksyczny
	woda morska	13.9	
<i>D. magna</i>	24 h	29.3	
	48 h	9.8	
<i>L. minor</i>	7 dni	38.4	
SMX			
<i>V. fischeri</i>	2% NaCl	50.5	szkodliwy
	woda morska	55.3	
<i>D. magna</i>	24 h	52.4	
	48 h	44.0	
<i>L. minor</i>	7 dni	12.6	
MIX			
<i>V. fischeri</i>	2% NaCl	15.9	toksyczny
	woda morska	16.1	
<i>D. magna</i>	24 h	43.3	
	48 h	13.6	
<i>L. minor</i>	7 dni	4.8	

W celu określenia ryzyka wywołwanego obecnością badanych związków w środowisku naturalnym obliczono wartość stężenia niebezpiecznego dla 5% gatunków na podstawie przeprowadzonych testów toksyczności. Tylko DKF oraz SMX spełniały warunek normalności rozkładu. Tabela 6 przedstawia obliczone wartości stężenia niebezpiecznego dla 5% gatunków oraz 95% granice przedziału ufności (LL – granica dolna, UL – górna).

Tabela 6 Wyznaczone wartości HC₅ dla DKF oraz SMX.

Parametr [mg/L]	Diklofenak	Sulfametoksazol
LL HC ₅	0.90	4.63
HC₅	1.74	7.33
UL HC ₅	2.65	9.84

Wyniki uzyskane dla mieszaniny farmaceutyków nie spełniły kryteriów rozkładu normalnego i z tego powodu nie można ich było wykorzystać do obliczenia wartości HC₅. Wynikać to może ze złożonych mechanizmów toksyczności wywoływanych obecnością mieszaniny. W celu otrzymania wiarygodnych wyników należałoby zwiększyć liczbę wykonanych testów toksyczności oraz różnorodność organizmów modelowych.

Wykorzystując obliczone HC₅ oraz wyznaczone wartości EC₅₀ oraz IC₅₀ obliczono wartości PNEC. Do określenia ryzyka środowiskowego wybrano najniższą wartość wyznaczonych wskaźników, co odpowiada najwyższej toksyczności. Znaczne różnice między wartościami PNEC wynikają między innymi z uwzględnienia testów chronicznych, które często wykazują się wyższą wrażliwością na zanieczyszczenia niż testy krótkoterminowe. Wyniki przedstawia Tabela 7.

Tabela 7 Wyznaczenie wartości RQ dla DKF oraz SMX.

Substancja	PEC ¹ [µg/L]	HC ₅ [mg/L]	PNEC(HC ₅) [µg/L]	EC ₅₀ /IC ₅₀ [mg/L]	PNEC(EC ₅₀ /IC ₅₀) [µg/L]	RQ	Klasyfikacja ryzyka
DKF	18.74	1.74	348.0	8.7	8.7	2.15	wysokie
SMX	11.92	7.33	1466.0	12.6	12.6	0.95	niskie

¹Hughes i in., 2013;

Na podstawie uzyskanych wyników określono RQ. Ocena ryzyka w odniesieniu do organizmów wodnych na podstawie wartości PEC/PNEC wskazuje na wysokie ryzyko dla DKF oraz niskie ryzyko związane z obecnością SMX w wodach powierzchniowych.

Przeprowadzone testy toksyczności wykazały, że pomiędzy składnikami mieszaniny mogą zachodzić złożone interakcje, które różnią się w zależności od zastosowanego bioindykatora oraz czasu trwania testu. Wykorzystując równanie Könemann'a obliczono wartości indeksu toksyczności mieszaniny (MTI), a następnie określono współdziałanie zachodzące pomiędzy związkami w mieszaninie oraz przyporządkowano je do odpowiedniej klasy (Tabela 8).

Tabela 8 Klasyfikacja interakcji zachodzących w mieszaninie farmaceutyków na podstawie przeprowadzonych testów toksyczności.

Organizm testowy	Parametry testu	MTI [-]	Klasyfikacja interakcji
<i>V. fischeri</i>	2% NaCl	0.6	działanie częściowo addytywne
<i>V. fischeri</i>	woda morska	2.4	działanie synergistyczne
<i>D. magna</i>	24 h	0.7	działanie częściowo addytywne
<i>D. magna</i>	48 h	1.8	działanie synergistyczne
<i>L. minor</i>	7 d	5.8	działanie synergistyczne
<i>E. fetida</i>	28 d (śmiertelność)	3.3	działanie synergistyczne
<i>E. fetida</i>	56 d (zahamowanie reprodukcji)	3.4	działanie synergistyczne

Wszystkie przeprowadzone testy wskazują na wzmacniające działanie toksyczne mieszaniny w odniesieniu do pojedynczych farmaceutyków. Im wyższe wartości MTI tym silniejsze działanie wzmacniające mieszaniny. Działanie synergistyczne oznacza, że mieszanina badanych farmaceutyków stwarza większe zagrożenie względem organizmów modelowych oraz środowiska naturalnego niż oszacowano to na podstawie testów przeprowadzonych dla pojedynczych związków aktywnych.

DKF, SMX i MIX spowodowały zahamowanie reprodukcji *E. fetida*. Najbardziej toksyczny okazał się SMX. W przypadku DKF dopiero stężenie 1 mg/kg s.m.g. miało wpływ na liczbę organizmów potomnych. Dla MIX różnice istotne statystycznie zaobserwowano już w stężeniu 0.063 mg/kg s.m.g. Zaobserwowano ponadto silny efekt toksyczny powodowany przez najwyższe stężenia badanych leków. Dla DKF przeżywalność *E. fetida* po 28 dniach eksperymentu w stężeniu 2 mg/kg s.m.g. wynosiła 86.7%, dla SMX 33.3%, natomiast dla MIX w stężeniu 4 mg/kg s.m.g. przeżywalność wynosiła 0.0%, a w stężeniu 2 mg/kg s.m.g. wynosiła tylko 20.0%. Wyznaczono wartości EC_{50} , czyli stężenie powodujące 50% zahamowanie reprodukcji *E. fetida*. Dla DKF wyznaczone EC_{50} wynosi 1.2 ± 0.2 mg/kg s.m.g., dla SMX 0.4 ± 0.1 mg/kg s.m.g., natomiast dla MIX 0.3 ± 0.1 mg/kg s.m.g.

Badane farmaceutyki oraz ich mieszanina miały wpływ na liczbę podziałów komórek stożka wzrostu korzenia bobu *V. faba*. W niskich stężeniach farmaceutyków dla hodowli glebowej (DKF do 0.008 mg/kg s.m.g., SMX do 0.016 mg/kg s.m.g., MIX do 0.063 mg/kg s.m.g.) nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w odniesieniu do kontroli negatywnej. Powyżej wymienionych stężeń badane substancje miały negatywny wpływ na MI komórek bobu. Przeprowadzone analizy genotoksyczności względem bobu *V. faba* świadczą o tym, że badane substancje wykazują zależność między MI oraz uszkodzeniami materiału genetycznego a analizowanymi stężeniami farmaceutyków. Można zatem jednoznacznie określić, że analizowane związki wykazują działanie genotoksyczne, a tym samym mogą prowadzić do zaburzeń funkcjonowania całego organizmu.

Analizując wyniki aktywności CAT uzyskane dla *L. minor* zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia DKF oraz SMX wzrastała aktywność enzymu w roślinach. SMX indukował wzrost aktywności CAT już w najniższych stężeniach. W przypadku DKF w stężeniach z zakresu 0.008 – 0.016 mg/L nie zaobserwowano istotnego statystycznie wzrostu aktywności analizowanego enzymu. W przypadku mieszaniny aktywność CAT we wszystkich stężeniach utrzymywała się na stałym poziomie, w zakresie 79.9 – 103.3 $\mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$. Mieszanina wykazywała silny wpływ na aktywność CAT, ponieważ już w najniższym, analizowanym stężeniu (0.016 mg/L) aktywność enzymu wzrosła o ponad 700% w porównaniu do próbki kontrolnej.

Analizując wyniki aktywności CAT uzyskane dla komórek *V. faba* pochodzących z hodowli wodnej zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia DKF i SMX wzrastała aktywność enzymu. Obecność farmaceutyków oraz ich mieszaniny w hodowli hydroponicznej miała wpływ na wzrost aktywności CAT, co może świadczyć o wywoływaniu stresu oksydacyjnego przez badane substancje. W przypadku hodowli glebowej zaobserwowano niższy efekt toksyczny. W stężeniach 0.008 – 0.016 mg/kg s.m.g. dla DKF i 0.008 – 0.063 mg/kg s.m.g. dla SMX zaobserwowano zmniejszenie aktywności CAT w liściach bobu w odniesieniu do kontroli negatywnej. W wyższych stężeniach zaobserwowano wzrost aktywności enzymu, potwierdzony przeprowadzonymi analizami statystycznymi. W przypadku mieszaniny aktywność badanego enzymu była wyższa niż aktywność CAT dla próbki kontrolnej w całym zakresie badanych stężeń.

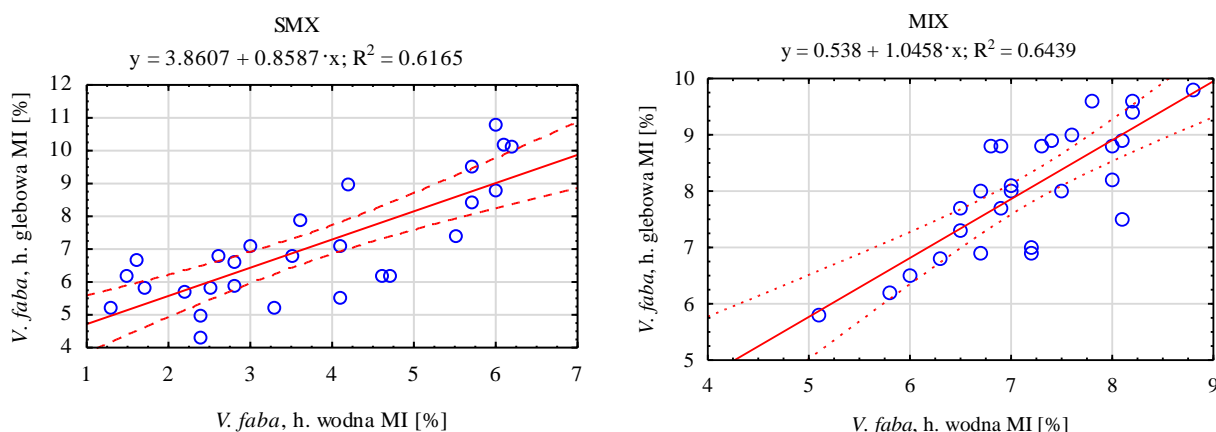
Analizując wyniki aktywności CAT w dżdżownicach *E. fetida* zaobserwowano, że obecność farmaceutyków powodowała obniżenie aktywności enzymu. Najwyższy efekt w odniesieniu do warunków kontrolnych dla DKF zaobserwowano w stężeniu 0.25 mg/kg s.m.g. i wynosił on od 43.7 do 73.6%. Po przekroczeniu tego stężenia nastąpił wzrost

aktywności enzymu. Podobny efekt zaobserwowano dla SMX. Najwyższy efekt obserwowano w stężeniu 0.063 mg/kg s.m.g i wynosił on od 41.4 do 64.9%. Po przekroczeniu tego stężenia nastąpił wzrost aktywności CAT. W przypadku MIX najwyższy efekt zaobserwowano w stężeniu 0.125 mg/kg s.m.g. i wynosił on od 32.9 do 71.3%. W stężeniach 0.25 – 2 mg/kg s.m.g. aktywność CAT wahała się od 15.2 do 16.8 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$.

Aktywność SOD w liściach *V. faba* badano zarówno w roślinach pochodzących z hodowli hydroponicznej jak i glebowej. Analizując uzyskane wyniki nie zaobserwowano statystycznie istotnego wzrostu aktywności analizowanego enzymu w odniesieniu do kontroli negatywnej ani kontroli pozytywnej. Ponadto nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie porównując aktywność SOD w hodowli hydroponicznej oraz glebowej. Wykonane analizy statystyczne świadczą o tym, że farmaceutyki oraz ich mieszanina w badanych stężeniach nie mają wpływu na aktywność SOD w komórkach liści *V. faba*.

Wyniki aktywności SOD w homogenatach z dżdżownic *E. fetida* świadczą o tym, że zarówno DKF jak i SMX powodowały wzrost aktywności tego enzymu. Również w przypadku MIX można zauważyć, że we wszystkich stężeniach nastąpił wzrost aktywności SOD. Aktywność enzymu utrzymywała się na stałym poziomie i wynosiła 1.5 – 1.7 JA/min/mg_{białka}. Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały, że już najniższe stężenia farmaceutyków powodowały zwiększenie aktywności SOD. Może to świadczyć o wpływie tych substancji na wywoływanie stresu oksydacyjnego w komórkach *E. fetida*.

Na podstawie uzyskanych wyników określono korelacje występujące między analizowanymi zmiennymi w celu weryfikacji potencjalnych zależności. Przykładowo zaobserwowano, że MI komórek *V. faba* pochodzących z hodowli hydroponicznej koreluje z tym samym parametrem dla hodowli glebowej (Rysunek 2). Środowisko glebowe wpływa ochronnie na rośliny między innymi dzięki zjawisku sorpcji substancji szkodliwych na cząsteczkach gleby. Z tego powodu toksyczność w środowisku wodnym, gdzie mikrozanieczyszczenia są łatwiej dostępne, jest zazwyczaj wyższa. Na podstawie poniższych analiz można przewidzieć efekt jaki wywoła badana substancja w innym środowisku.



Rysunek 2 Korelacje między indeksem mitotycznym *V. faba* w hodowli wodnej i glebowej dla SMX oraz MIX.

4.2. Analizy fizykochemiczne ścieków z oczyszczalni hydrofitowej

Ocena oczyszczania ścieków opierała się na kontroli standardowych parametrów takich jak stężenie całkowitego węgla organicznego (TOC, mg/L) czy stężenie azotu amonowego (N-NH₄, mg/L) oraz na monitorowaniu usunięcia badanych leków. Opisane parametry oznaczono zarówno w dopływie jak i odpływie z oczyszczalni hydrofitowej. Efektywność usuwania farmaceutyków oraz TOC i N-NH₄ przedstawia Tabela 9.

Tabela 9 Efektywność usuwania DKF, SMX, TOC oraz N-NH₄ w oczyszczalni hydrofitowej.

Układ badawczy		Efektywność usuwania [%]			
		TOC	N-NH ₄	DKF	SMX
U1	Rośliny + CTRL	85.6	6.8		
	Rośliny + Farm.	88.8	2.9	68.8	79.1
	Brak roślin + CTRL	92.0	26.6		
	Brak roślin + Farm.	92.3	7.4	13.7	78.9
U2	Rośliny + CTRL	94.3	36.0		
	Rośliny + Farm.	92.4	51.4	86.8	98.0
	Brak roślin + CTRL	94.7	16.0		
	Brak roślin + Farm.	94.1	50.8	76.6	97.4

Analizując wyniki uzyskane dla stężenia TOC można stwierdzić, że proces oczyszczania ścieków przebiegał prawidłowo. Usunięcie całkowitego węgla organicznego było wysokie (powyżej 85%) we wszystkich kolumnach testowych. Na proces usunięcia TOC w oczyszczalni hydrofitowej wpływ miała częstotliwość dozowania ścieków.

Usunięcie N-NH₄ w ściekach wahało się w granicach 2.9 – 51.4%. Podobnie jak w przypadku TOC obecność roślin nie miała statystycznie istotnego wpływu na usunięcie N-NH₄. Zaobserwowano natomiast wpływ częstotliwości dozowania oraz obecności leków. Lepsze usunięcie obu parametrów zaobserwowano w ściekach pochodzących z układu 2.

Efektywność usuwania DKF we wszystkich analizowanych ściekach była niższa niż efektywność usuwania SMX. Stwierdzono ponadto, że na efektywność usuwania DKF i SMX wpływała częstotliwość dozowania. W odciekach pochodzących z układu 2 zaobserwowano wyższe usunięcie farmaceutyków niż w odciekach z układu 1. Różne tryby dozowania ścieków do oczyszczalni hydrofitowych mogą wpływać na zachodzące procesy utleniania i redukcji oraz na dyfuzję tlenu do złoża.

Parametry pracy oczyszczalni hydrofitowej miały wpływ na właściwości fizykochemiczne analizowanych ścieków a tym samym na proces oczyszczania. Jednak usunięcie zanieczyszczeń takich jak węgiel organiczny, związki azotu czy ksenobiotyki nie jest jednoznaczne ze zmniejszeniem toksyczności odcieków. Z tego powodu bardzo istotne jest sprawdzenie, czy parametry pracy oczyszczalni wpływają na parametry ekotoksykologiczne ścieków.

4.3. Badanie toksyczności ścieków z oczyszczalni hydrofitowej

4.3.1. Toksyczność badanych ścieków

Na podstawie klasyfikacji zaproponowanej przez Persoone i in., 2003 przyporządkowano badane ścieki do odpowiedniej klasy toksyczności. Wyniki przedstawia

Tabela 10. Na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć, że ścieki dopływające charakteryzowały się wysoką toksycznością względem organizmów pochodzących ze środowiska wodnego. Ścieki po oczyszczaniu zmniejszyły swoją toksyczność. Wszystkie odcieki po procesie oczyszczania charakteryzowały się średnią toksycznością.

Tabela 10 Klasyfikacja toksyczności ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej.

Analizowane ścieki		TU [-]				Klasyfikacja toksyczności
		<i>V. fischeri</i> w. morska	<i>D. magna</i> 24 h	<i>D. magna</i> 48 h	<i>L. minor</i> 7 dni	
Dopływ	CTRL	1.1	3.1	4.1	11.2	wysoka
	Farm.	1.0	2.8	3.9	11.5	wysoka
Układ 1	Rośliny +CTRL	1.3	2.7	3.6	8.8	średnia
	Rośliny +Farm.	1.4	2.3	3.6	7.1	średnia
	Brak roślin +CTRL	1.3	1.6	2.8	6.3	średnia
	Brak roślin +Farm.	1.0	1.7	2.3	7.4	średnia
Układ 2	Rośliny +CTRL	0.5	0.9	2.7	4.7	średnia
	Rośliny +Farm.	0.4	0.5	1.2	3.1	średnia
	Brak roślin +CTRL	0.9	1.6	2.4	4.0	średnia
	Brak roślin +Farm.	0.6	0.6	1.5	2.2	średnia

Na podstawie wyników przeprowadzonych testów obliczono wartości HC₅ dla ścieków, które oznaczają stężenie niebezpieczne dla 5% gatunków. Tabela 11 przedstawia obliczone wartości HC₅ oraz 95% granice przedziałów ufności. Do obliczenia HC₅ wykorzystano wyznaczony parametr NOEC, oznaczający najwyższe stężenie niepowodujące szkodliwego efektu względem organizmów modelowych.

Tabela 11 Wartości HC₅ dla ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej.

Parametr [%]	Dopływ CTRL		Dopływ Farm.	
LL HC ₅	4.03		3.99	
HC ₅	5.71		5.76	
UL HC ₅	7.17		7.30	
Parametr [%]	U1: Rośliny +CTRL	U1: Rośliny +Farm.	U1: Brak roślin +CTRL	U1: Brak roślin + Farm.
LL HC ₅	13.61	14.08	13.90	18.57
HC ₅	15.84	16.38	17.20	22.10
UL HC ₅	17.76	18.54	20.73	25.14
Parametr [%]	U2: Rośliny +CTRL	U2: Rośliny +Farm.	U2: Brak roślin +CTRL	U2: Brak roślin+Farm.
LL HC ₅	13.93	15.99	18.12	19.37
HC ₅	16.99	18.52	21.54	24.03
UL HC ₅	19.54	20.81	23.05	26.54

Niskie wartości HC₅ ścieków świadczą o tym, że nawet niewielkie skażenie wód powierzchniowych analizowanymi ściekami może powodować występowania szkodliwych efektów u organizmów zamieszkujących to środowisko. Odcieki pochodzące z układu 2 charakteryzowały się niższą szkodliwością niż ścieki pochodzące z układu 1. Przeprowadzone badania toksyczności wykazały, że częstotliwość dozowania może mieć znaczny wpływ na właściwości ekotoksykologiczne ścieków.

Próbki środowiskowe są mieszaniną różnych składników, a jej dokładny skład nie jest znany albo zmienia się w czasie. Z tego powodu wyznaczenie wartości stężenia

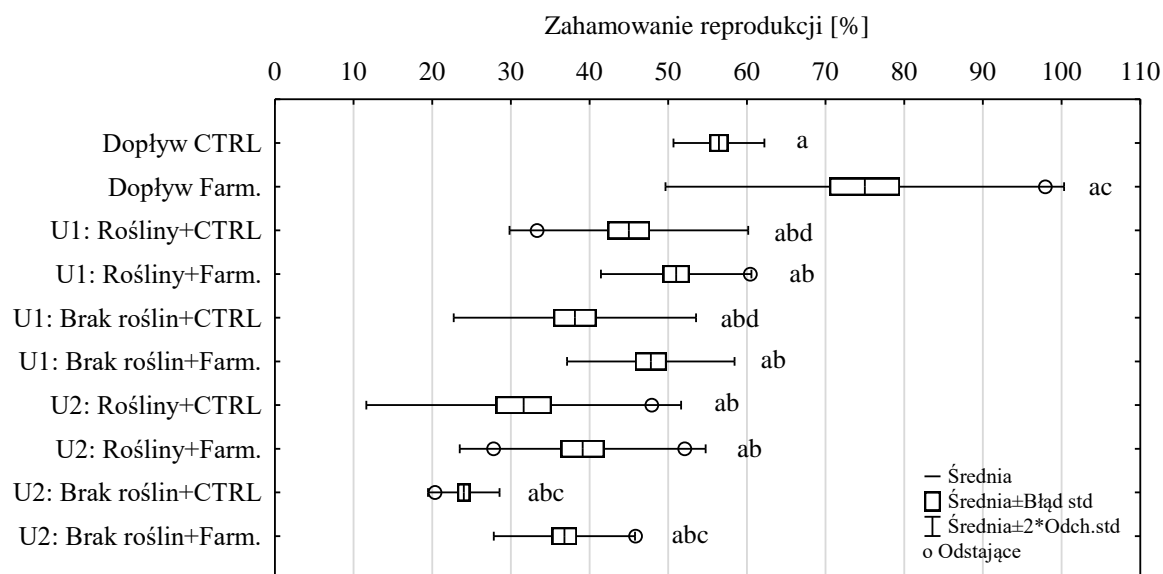
niebezpiecznego dla 5% gatunków może być bardzo pomocne w celu określenia zachodzących zmian lub oceny procesu oczyszczania.

4.3.2. Test na reprodukcję dżdżownic *Eisenia fetida*

Test wpływu substancji chemicznych na reprodukcję dżdżownic *E. fetida* został przeprowadzony dla ścieków surowych i oczyszczonych w oczyszczalni hydrofitowej. Zahamowanie reprodukcji (po 56 dniach) wywołane obecnością ścieków przedstawia Rysunek 3.

Na zahamowanie reprodukcji *E. fetida* największy wpływ miała częstotliwość dozowania ścieków. Obecność roślin wpływała na zahamowanie reprodukcji tylko w przypadku odcieków kontrolnych pochodzących z układu 1. Zaobserwowano, że obecność farmaceutyków wpływała na właściwości ekotoksykologiczne ścieków pochodzących z kolumn nieobsadzonych roślinami z układu 2.

W trakcie testu zaobserwowano silne działanie toksyczne ścieków dopływających do oczyszczalni hydrofitowej zawierających farmaceutyki. Obserwowana śmiertelność dorosłych dżdżownic wynosiła 41.1% i miała wpływ na liczbę osobników potomnych. Ponadto po 28 dniach w pojemnikach testowych podlewanych ściekami dopływającymi do oczyszczalni i zawierającymi DKF i SMX zaobserwowano znacznie uszkodzenie dżdżownic, które przeżyły eksperyment.

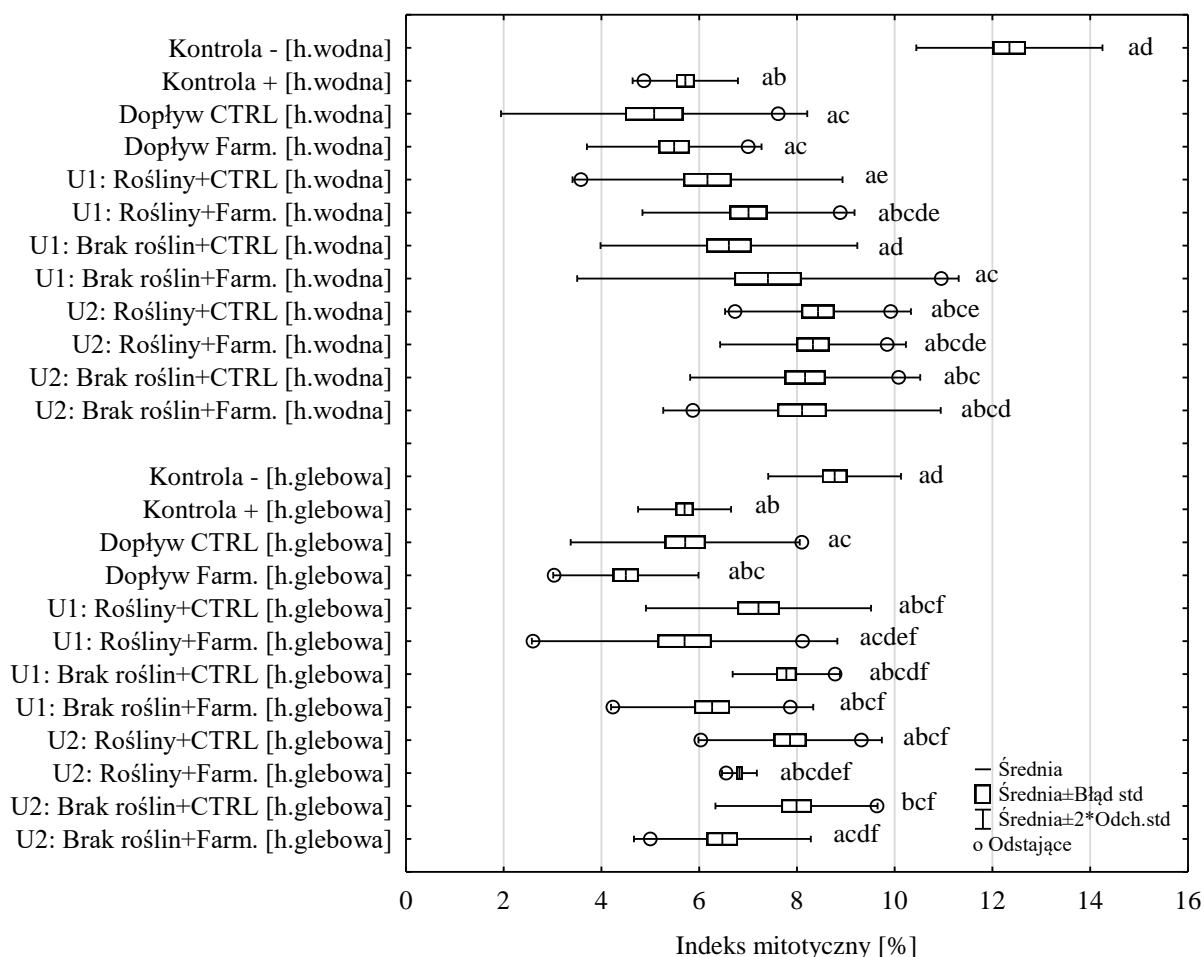


Rysunek 3 Wpływ ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej na zahamowanie reprodukcji *E. fetida*.

- ^a - występowanie różnic istotnych statystycznie między dopływem i odpływem ścieków (test U M-W, $p < 0.05$),
- ^b - występowanie różnic istotnych statystycznie między układami (test U M-W, $p < 0.05$),
- ^c - występowanie różnic istotnych statystycznie między ściekami kontrolnymi oraz zawierającymi farmaceutyki (test U M-W, $p < 0.05$),
- ^d - występowanie różnic istotnych statystycznie między ściekami pochodzącymi z kolumn obsadzonych roślinami oraz z kolumn bez roślin (test U M-W, $p < 0.05$).

4.3.3. Test genotoksyczności względem komórek bobu *Vicia faba*

Średnie wartości MI dla ścieków pochodzących z układu badawczego przedstawia Rysunek 4. Obecność roślin nie wpływała na MI komórek korzenia bobu. Wpływ zaobserwowano natomiast w przypadku obecności farmaceutyków jednak tylko w hodowli glebowej. Częstotliwość dozowania ścieków wpływała na analizowany parametr tylko w przypadku odcieków pochodzących z kolumn obsadzonych roślinami dla hodowli hydroponicznej oraz kolumn [Rośliny +Farm.] dla hodowli glebowej.



Rysunek 4 Wpływ ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej na indeks mitotyczny komórek *V. faba*.

- ^a - występowanie różnic istotnych statystycznie w odniesieniu do kontroli negatywnej (test U M-W, $p < 0.05$),
- ^b - występowanie różnic istotnych statystycznie w odniesieniu do kontroli pozytywnej (test U M-W, $p < 0.05$),
- ^c - występowanie różnic istotnych statystycznie między dopływem i odpływem ścieków (test U M-W, $p < 0.05$),
- ^d - występowanie różnic istotnych statystycznie między hodowlą wodną i glebową (test U M-W, $p < 0.05$),
- ^e - występowanie różnic istotnych statystycznie między układami (test U M-W, $p < 0.05$),
- ^f - występowanie różnic istotnych statystycznie między ściekami kontrolnymi oraz zawierającymi farmaceutyki (test U M-W, $p < 0.05$),
- ^g - występowanie różnic istotnych statystycznie między ściekami pochodzącymi z kolumn obsadzonych roślinami oraz z kolumn bez roślin (test U M-W, $p < 0.05$).

Na liczbę MN oraz CA nie miała wpływu obecność roślin ani zastosowany system dozowania ścieków. Częstotliwość występowania mikrojąder w korzeniach poddanych

działaniu analizowanych ścieków w sposób istotny statystycznie nie różniła się od kontroli negatywnej. Na podstawie uzyskanych wyników z testu mikrojądrowego oraz przeprowadzonych analiz względem DKF, SMX i MIX można jednoznacznie określić, że ścieki pochodzące z oczyszczalni hydrofitowej wpływały na indeks mitotyczny komórek bobu *V. faba* oraz prowadziły do powstawania uszkodzeń materiału genetycznego takich jak aberracje chromosomowe. W komórkach narażonych na działanie ścieków nie zaobserwowano natomiast obecności mikrojader, co może świadczyć o zbyt krótkim czasie kontaktu komórek *V. faba* ze ściekami.

4.3.4. Testy aktywności enzymów antyoksydacyjnych

Aktywność CAT badano dla czterech organizmów narażonych na działanie ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej: *L. minor*, *V. faba*, *M. giganteus* oraz *E. fetida*.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane ścieki powodowały wzrost aktywności CAT w komórkach *L. minor*. Zaobserwowano ponadto, że na aktywność CAT nie wpływała obecność roślin oraz farmaceutyków. Istotny statystycznie wpływ zaobserwowano natomiast w przypadku częstotliwości dozowania ścieków dla odcieków pochodzących z kolumn [Brak roślin +Farm.]. Podobne wyniki uzyskano podczas badań wstępnych względem DKF, SMX i MIX. Wzrost aktywności CAT świadczy o uruchomieniu mechanizmów ochronnych komórki przed uszkodzeniami powstającymi na skutek stresu oksydacyjnego.

Na aktywność CAT w komórkach *V. faba* nie wpływała częstotliwość dozowania ścieków. Ponadto w przypadku hodowli wodnej nie zaobserwowano wpływu obecności roślin oraz farmaceutyków na aktywność enzymu. W hodowli glebowej zaobserwowano natomiast istotny statystycznie wpływ obecności roślin w przypadku ścieków pochodzących z kolumn zawierających farmaceutyki z układu 1, natomiast wpływ obecności analizowanych leków zaobserwowano dla odcieków z kolumn obsadzonych *M. giganteus* z układu 1.

Analizując wyniki aktywności CAT uzyskane dla liści *M. giganteus* pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej zaobserwowano, że aktywność enzymu w roślinach narażonych na działanie ścieków surowych z farmaceutykami była wyższa niż w przypadku roślin zasadzonych w kolumnach kontrolnych. Aktywność CAT w badanej roślinie zależy od częstotliwości dozowania ścieków. Wyższą aktywność zaobserwowano w roślinach pochodzących z układu 2. Aktywność CAT w liściach *M. giganteus* pochodzących układu 2 z kolumny [Rośliny +CTRL] wynosiła $169.7 \pm 13.4 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$, a z kolumny [Rośliny +Farm.] $205.9 \pm 14.5 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$. W przypadku roślin pochodzących z układu 1 aktywność CAT wynosiła odpowiednio: 136.7 ± 18.4 oraz $165.3 \pm 15.4 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$. Wysokie wartości aktywności CAT w badanych komórkach wynikały najprawdopodobniej z długotrwałego kontaktu roślin testowych z analizowanymi ściekami. Z powodu braku danych na temat aktywności CAT w roślinach znajdujących się w warunkach kontrolnych nie można jednoznacznie potwierdzić tej zależności. Liście roślin *M. giganteus* pobierano w 241 – 290 dniu trwania eksperymentu. Aktywność CAT w komórkach *M. giganteus* była prawie 10-krotnie wyższa od aktywności enzymu w komórkach *V. faba* pochodzących z hodowli hydroponicznej (czas kontaktu ze ściekami: 48 h), prawie 20-krotnie dla komórek z hodowli glebowej (czas kontaktu: 5 dni) oraz ponad 2-krotnie wyższa od aktywności CAT w *L. minor* (czas kontaktu: 7 dni).

Aktywność CAT w komórkach *E. fetida* narażonych na działanie ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej badano po 28 dniach trwania eksperymentu. Analizując uzyskane wyniki zaobserwowano obniżenie aktywności CAT w komórkach narażonych na działanie ścieków surowych i oczyszczonych w porównaniu do warunków kontrolnych. Zaobserwowano ponadto, że na aktywność CAT nie wpływała obecność roślin oraz częstotliwość dozowania ścieków. Uzyskane wyniki pokrywają się z obserwacjami aktywności CAT dla DKF, SMX i MIX w komórkach *E. fetida*. W badaniach wstępnych zaobserwowano obniżenie aktywności CAT i powiązano go z silnie toksycznym działaniem badanych leków względem analizowanych komórek i hamowaniem aktywności tego enzymu. Zaobserwowane wnioski potwierdzają również wyniki związane ze śmiertelnością organizmów modelowych po 28 dniach eksperymentu. Silne działanie toksyczne, zwłaszcza ścieków surowych, spowodowało fizyczne uszkodzenie organizmów modelowych, co może być związane z zahamowaniem aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Aktywność SOD badano dla trzech organizmów narażonych na działanie ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej: roślin *V. faba* i *M. giganteus* oraz dżdżownic *E. fetida*.

Aktywność SOD w liściach bobu *V. faba* narażonych na działanie ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej badano zarówno w roślinach pochodzących z hodowli hydroponicznej jak i glebowej. Analizując uzyskane wyniki dla komórek z hodowli wodnej można zauważyć, że we wszystkich próbkach nastąpił wzrost aktywności tego enzymu. Natomiast w przypadku hodowli glebowej zaobserwowano wzrost aktywności SOD tylko przypadku ścieków surowych zawierających farmaceutyki. Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały ponadto, że na aktywność SOD nie miała wpływu częstotliwość dozowania ścieków oraz obecność roślin. Zaobserwowano natomiast wpływ obecności farmaceutyków na aktywność tego enzymu, jednak różnice istotne statystycznie zaobserwowano tylko dla hodowli wodnej.

Analizując wyniki aktywności SOD w komórkach liści *M. giganteus* można zauważyć, że aktywność enzymu w roślinach pochodzących z kolumn, do których dozowane były farmaceutyki, była wyższa niż w przypadku roślin pochodzących z kolumn kontrolnych. Wyższą aktywność SOD zaobserwowano w roślinach pochodzących z układu 2, dla kolumn [Rośliny + CTRL] wynosiła ona 46.1 ± 6.9 JA/min/mg_{białka}, a dla kolumn [Rośliny + Farm.] 59.6 ± 6.7 JA/min/mg_{białka}. W roślinach pochodzących z układu 1 aktywność dysmutazy wynosiła odpowiednio: 37.2 ± 4.5 oraz 52.4 ± 8.2 JA/min/mg_{białka}. Tak wysokie wartości aktywności SOD w badanych komórkach liści *M. giganteus*, podobnie jak to miało miejsce w przypadku aktywności CAT, mogą być skutkiem długotrwałego kontaktu roślin testowych z analizowanymi ściekami.

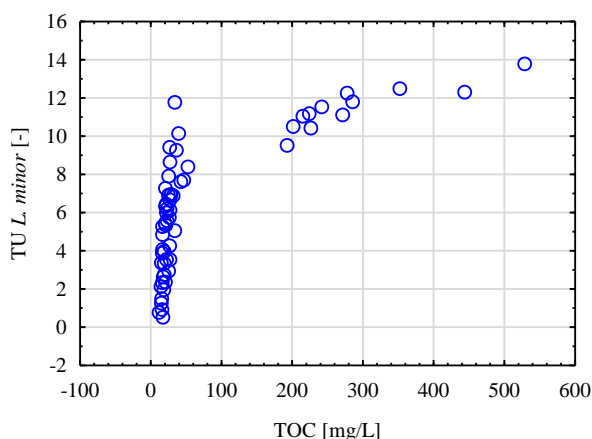
Aktywność SOD w komórkach dżdżownic *E. fetida* narażonych na działanie ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej badano po 28 dniach trwania eksperymentu. Analizując uzyskane wyniki zaobserwowano, że w przypadku wszystkich próbek nastąpił wzrost aktywności SOD w odniesieniu do warunków kontrolnych. Analizy wykazały, że na aktywność SOD w homogenatach z *E. fetida* nie wpływała obecność roślin. Różnice istotne statystycznie zaobserwowano natomiast dla częstotliwości dozowania ścieków w przypadku odcieków pochodzących z kolumn obsadzonych *M. giganteus*. Zaobserwowano ponadto wpływ obecności farmaceutyków na aktywność SOD w przypadku odcieków pochodzących

z kolumn obsadzonych roślinami z układu 2. Analogiczne wyniki uzyskano podczas badań wstępnych, gdzie również zaobserwowano wpływ farmaceutyków na wzrost aktywności SOD. Wzrost aktywności tego enzymu świadczy o wpływie badanych farmaceutyków na stres oksydacyjny oraz uruchomieniu mechanizmów ochronnych w komórkach.

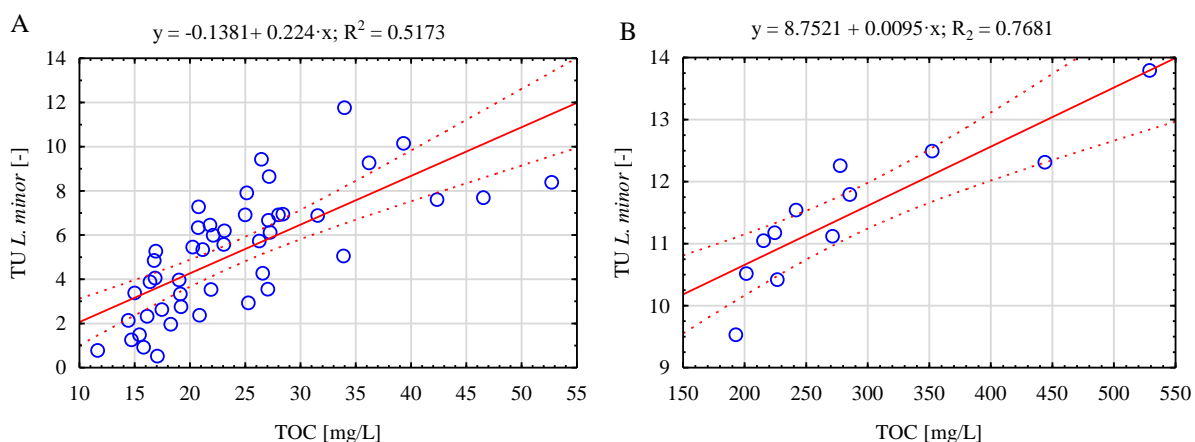
4.3.5. Wyznaczenie korelacji

Na podstawie uzyskanych wyników określono korelacje występujące między analizowanymi parametrami w celu określenia potencjalnych zależności.

Podczas wykonywania analiz korelacji dla TOC zaobserwowano, że wykres składał się z dwóch oddzielnych zestawów danych (Rysunek 5). Z tego powodu zdecydowano się rozważyć dwa przypadki: gdy stężenie $TOC < 100$ mg/L, co odpowiada analizie ścieków oczyszczonych, oraz gdy $TOC \geq 100$ mg/L, czyli dla ścieków surowych (Rysunek 6). Analiza ta pozwoliła na precyzyjniejsze dopasowanie prostej do uzyskanych wyników.



Rysunek 5 Korelacje między TOC i TU *L. minor* – cały zakres stężeń TOC.



A – poniżej 100 mg/L, B – powyżej 100 mg/L.

Rysunek 6 Korelacje między TOC i TU *L. minor* – dwa zakresy stężeń TOC.

Dla każdego wskaźnika ekotoksykologicznego wyznaczono zależność między TOC i N-NH₄, dzięki czemu możliwe staje się określenie parametrów ścieków w taki sposób, aby były one nietoksyczne. W każdym przypadku uwzględniono dwa przedziały dla stężenia TOC (powyżej i poniżej 100 mg/L).

A. Dla TOC < 100 mg/L:

<i>V. fischeri</i>	$TU = 0.1509 + 0.0029 \cdot x + 0.01 \cdot y$	(1)
<i>D. magna</i> , 24 h	$TU = -0.5706 + 0.0216 \cdot x + 0.0213 \cdot y$	(2)
<i>D. magna</i> , 48 h	$TU = -0.1875 + 0.0334 \cdot x + 0.0266 \cdot y$	(3)
<i>L. minor</i>	$TU = -1.4193 + 0.045 \cdot x + 0.0803 \cdot y$	(4)
<i>E. fetida</i>	$TU = -8.7923 + 0.4703 \cdot x + 0.0322 \cdot y$	(5)
	$CAT = 20.5509 + 0.0633 \cdot x + 0.0466 \cdot y$	(6)
	$SOD = 0.0774 + 0.0113 \cdot x + 0.0019 \cdot y$	(7)
<i>V. faba</i> h. wodna	$MI = 7.358 + 0.0049 \cdot x + 0.0003 \cdot y$	(8)
	$MN = 0.0011 + 2.136 \cdot 10^{-5} \cdot x + 1.2929 \cdot 10^{-5} \cdot y$	(9)
	$CA = 0.0073 + 0.0003 \cdot x + 9.051 \cdot 10^{-5} \cdot y$	(10)
<i>V. faba</i> h. glebowa	$MI = 6.6349 + 0.004 \cdot x + 0.0055 \cdot y$	(11)
	$MN = 0.0011 + 2.136 \cdot 10^{-5} \cdot x + 1.2929 \cdot 10^{-5} \cdot y$	(12)
	$CA = 0.0073 + 0.0003 \cdot x + 9.051 \cdot 10^{-5} \cdot y$	(13)

B. Dla TOC ≥ 100 mg/L:

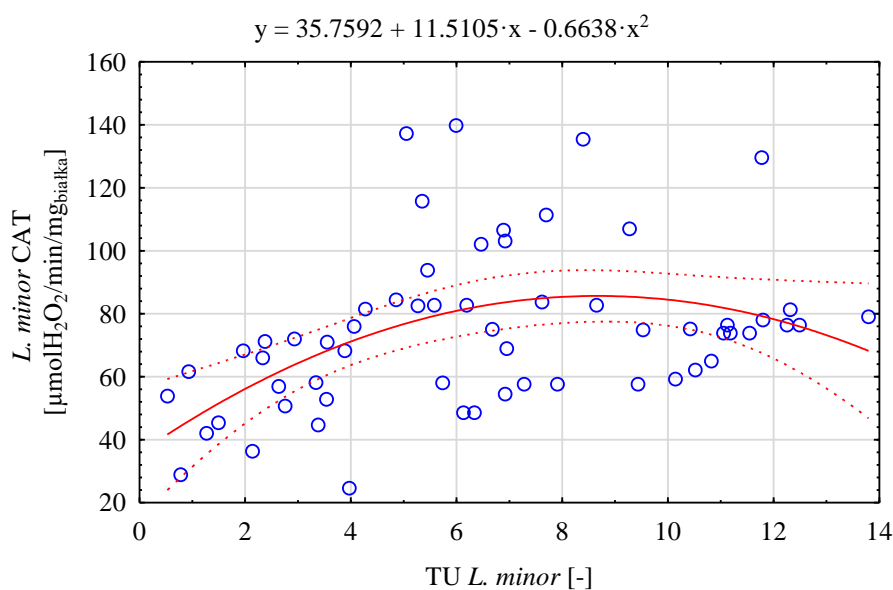
<i>V. fischeri</i>	$TU = 0.5195 + 0.0014 \cdot x + 0.0015 \cdot y$	(14)
<i>D. magna</i> , 24 h	$TU = 1.6187 + 0.0037 \cdot x + 0.0037 \cdot y$	(15)
<i>D. magna</i> , 48 h	$TU = 2.0676 + 0.0044 \cdot x + 0.0075 \cdot y$	(16)
<i>L. minor</i>	$TU = 8.9237 + 0.01 \cdot x - 0.0031 \cdot y$	(17)
<i>E. fetida</i>	$TU = -6.2231 + 0.0138 \cdot x + 0.3662 \cdot y$	(18)
	$CAT = 13.3858 + 0.0323 \cdot x - 0.0121 \cdot y$	(19)
	$SOD = 0.1439 + 0.0002 \cdot x + 0.0048 \cdot y$	(20)
<i>V. faba</i> h. wodna	$MI = 2.7045 + 0.0097 \cdot x - 0.001 \cdot y$	(21)
	$MN = -0.0464 + 0.0002 \cdot x + 9.1156 \cdot 10^{-5} \cdot y$	(22)
	$CA = -0.036 + 0.0002 \cdot x + 0.0002 \cdot y$	(23)
<i>V. faba</i> h. glebowa	$MI = 3.8047 + 0.0059 \cdot x - 0.0045 \cdot y$	(24)
	$MN = -0.0101 + 8.2852 \cdot 10^{-6} \cdot x + 9.5751 \cdot 10^{-5} \cdot y$	(25)
	$CA = -0.004 + 4.367 \cdot 10^{-5} \cdot x + 0.0001 \cdot y$	(26)

Gdzie: x to stężenie TOC [mg/L], natomiast y to stężenie azotu amonowego [mg/L].

Uzyskane zależności mogą pomóc oszacować toksyczność próbek na podstawie znajomości tylko parametrów fizykochemicznych. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014 roku maksymalne stężenie TOC oraz azotu amonowego w ściekach wprowadzanych do wód lub do ziemi wynosi 30 oraz 10 mg/L odpowiednio. W takim przypadku średnia wartość TU dla badanych organizmów testowych wynosi około 0.6. Dodatkowo ścieki o takiej charakterystyce fizyko-chemicznej nie powinny wywołać śmiertelności u organizmów *E. fetida*, uszkodzeń materiału genetycznego w komórkach *V. faba* oraz nie powinny mieć wpływu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w organizmach modelowych.

Dodatkowo wykonano analizę wpływu parametrów ekotoksykologicznych na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w celu określenia poziomu toksyczności, który będzie indukował stres oksydacyjny. Zaobserwowano korelacje na przykład między aktywnością CAT w *L. minor* (Rysunek 7). Kształt krzywej przybliżono wykorzystując równanie kwadratowe. Na podstawie uzyskanego równania funkcji dopasowania można obliczyć, że aktywność CAT będzie najwyższa przy wartości toksyczności TU wynoszącej 8.7. Biorąc pod uwagę fakt, że aktywność CAT w próbkach kontrolnych wynosiła średnio $37.1 \mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$ oraz przyjmując, że badane ścieki mogą zostać wprowadzone do środowiska naturalnego przy wartości TU wynoszącej 0.6, aktywność enzymu w roślinach może wzrosnąć do około $42.4 \mu\text{molH}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}_{\text{białka}}$.

CAT jest jednym z enzymów biorących udział w ochronie roślin przed akumulacją i toksycznością H_2O_2 w komórkach. Doniesienia literaturowe wskazują, że aktywność tego enzymu może wzrastać lub obniżać się w organizmach narażonych na stres (Cui i Zhao, 2011). Aktywność enzymów antyoksydacyjnych nie jest stała i zmienia się w czasie. Najczęściej obserwuje się wzrost aktywności CAT, gdy organizm narażony jest na stres o niskim poziomie, a następnie obniżenie aktywności enzymu w warunkach wysokiego stresu, na przykład na skutek silnej toksyczności (Song i in., 2012).



Rysunek 7 Korelacje między aktywnością CAT i toksycznością organizmów *L. minor*.

4.4. Ocena detoksykacji ścieków

Detoksykacja, według definicji zaproponowanej przez Fortney i in., (2018), jest to zbiór procesów, których celem jest identyfikacja, neutralizacja i eliminacja toksycznych substancji oraz ich produktów rozkładu. Definicja ta może odnosić się zarówno do aspektu medycznego jak i środowiskowego tego procesu. Zatem detoksykacja może zostać zdefiniowana jako proces zmniejszenia toksyczności substancji lub ścieków do poziomu bezpiecznego dla środowiska.

Porównując wartości wskaźników toksyczności otrzymane dla ścieków surowych dozowanych do oczyszczalni hydrofitowej z wartościami tych samych wskaźników uzyskanymi dla odcieków określono stopień detoksykacji (Tabela 12).

Tabela 12 Stopień detoksykacji ścieków.

Organizmy testowe	Stopień detoksykacji ścieków [%]								
	Układ 1				Układ 2				
	Rośliny +CTRL	Rośliny +Farm.	Brak roślin +CTRL	Brak roślin +Farm.	Rośliny +CTRL	Rośliny +Farm.	Brak roślin +CTRL	Brak roślin +Farm.	
<i>V. fischeri</i>		-19.2	-35.4	-16.8	4.5	54.4	60.1	14.1	43.9
<i>D. magna</i>	24 h	14.6	19.4	49.0	40.8	72.6	82.6	49.2	77.3
	48 h	12.4	8.9	32.0	42.5	34.2	70.1	64.3	80.8
<i>L. minor</i>		21.5	38.0	43.8	35.1	58.1	72.8	64.3	80.8
<i>E. fetida</i>	56 dni	20.3	32.0	32.4	36.3	44.0	47.8	57.4	50.9
<i>V. faba</i> h. wodna	MI	21.5	27.7	30.1	34.9	66.0	51.7	60.8	47.6
	MN	100.0	100.0	82.5	85.7	65.0	100.0	100.0	71.4
	CA	24.2	40.7	30.0	85.2	47.5	51.9	18.3	48.1
<i>V. faba</i> h. glebowa	MI	26.2	26.7	36.2	39.2	37.6	51.6	39.9	43.9
	MN	b.d.*	100.0	b.d.	100.0	b.d.	100.0	b.d.	100.0
	CA	55.6	57.1	66.7	71.4	77.8	71.4	77.8	64.3

*brak danych – z powodu braku występowania mikrojąder w komórkach narażonych na działanie kontrolnych ścieków dopływających nie można było wyznaczyć stopnia detoksykacji ścieków.

W przypadku bakterii *V. fischeri* zaobserwowano brak detoksykacji w ściekach pochodzących z kolumn układu 1 (za wyjątkiem [Brak roślin +Farm.]). Efekt ten może być związany ze wzrostem toksyczności ścieków na skutek pojawienia się bardziej toksycznych produktów ubocznych, które nie ulegały dalszemu rozkładowi. Podobny efekt wzrostu szkodliwości zaobserwowano w badaniach rozkładu SMX (Qi i in., 2014) czy DKF (Naddeo i in., 2010) oraz podczas procesu oczyszczania ścieków (Punzi i in., 2015). Może to również oznaczać, że zastosowana częstotliwość dozowania ścieków miała znaczny wpływ na skład odcieków, a tym samym na ich właściwości ekotoksykologiczne.

Całkowitą detoksykację ścieków zaobserwowano tylko w przypadku testu na obecność mikrojąder w komórkach *V. faba*, gdzie w próbkach odcieków wspomniane uszkodzenia materiału genetycznego nie występowały. W przypadku aberracji chromosomowych zaobserwowano tylko częściową detoksykację, co może świadczyć o tym, że czas kontaktu ze ściekami był zbyt krótki, aby zaobserwować występowanie MN.

Na podstawie uzyskanych wyników można zauważyć, że w przypadku testów toksyczności względem organizmów *D. magna* i *L. minor*, testów genotoksyczności względem *V. faba* oraz testów reprodukcji dżdżownic *E. fetida* we wszystkich kolumnach testowych zaobserwowano częściowy proces detoksykacji ścieków.

Nie można jednoznacznie stwierdzić, że obserwowane zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych świadczą o narażeniu na substancje farmaceutyczne. Z tego powodu nie określono stopnia detoksykacji dla tych parametrów. W bioindykacji aktywność enzymów antyoksydacyjnych stanowi dodatkowy parametr ułatwiający określenie mechanizmu działania analizowanej substancji.

5. Dyskusja wyników

Obecność ksenobiotyków w środowisku naturalnym stwarza poważne zagrożenie względem organizmów tam bytujących. Bardzo istotne jest opracowanie nowoczesnych metod oczyszczania ścieków, charakteryzujących się wysoką skutecznością w usuwaniu mikrozanieczyszczeń, ale równie istotne jest zmniejszenie toksyczności odcieków. Produkty rozkładu, powstające podczas procesu oczyszczania, mogą charakteryzować się gorszymi właściwościami ekotoksykologicznymi niż związek pierwotny. Z tego powodu kontrola pracy oczyszczalni ścieków powinna opierać się nie tylko na monitoringu standardowych parametrów fizykochemicznych, ale również na określeniu ekotoksyczności względem organizmów modelowych.

Mikrozanieczyszczenia pozostające w ściekach oczyszczonych mogą również stanowić poważne zagrożenie prowadząc do zmian w materiale genetycznym czy przedwczesnego starzenia komórek. Zmiany takie mogą wskazywać na bardzo złożony mechanizm toksyczności danej substancji oraz dotyczyć wielu pokoleń organizmów modelowych. Z tych powodów bardzo istotna jest również analiza potencjału genotoksycznego, cytotoksycznego oraz wpływu na reprodukcję analizowanych ścieków.

5.1. Toksyczność farmaceutyków

Badania wstępne dotyczące toksyczności DKF i SMX oraz ich równowagowej mieszaniny wskazały, że związki te są szkodliwe lub toksyczne względem organizmów modelowych (Commission of the European Communities, 1996).

Na podstawie uzyskanych wyników obliczono wartości RQ i określono, że DKF wykazuje wysokie ryzyko związane z jego obecnością w środowisku naturalnym, natomiast SMX charakteryzuje się niskim zagrożeniem. Ocena RQ jest często stosowanym parametrem do oszacowania możliwego zagrożenia wywołanego przez obecność mikrozanieczyszczeń w środowisku naturalnym (Thomaidi i in., 2017). Najbardziej wrażliwymi organizmami na SMX okazała się rzęsa wodna *L. minor*, natomiast w przypadku DKF był on najbardziej toksyczny dla bakterii *V. fischeri*.

Dodatkowo badania wykazały, że analizowane leki działają genotoksycznie względem organizmów modelowych. Zaobserwowano również wpływ farmaceutyków na wywoływanie stresu oksydacyjnego w komórkach oraz wpływ na reprodukcję. Związki te mogą wywoływać wielopokoleniowe skutki, których nie można zaobserwować w testach ostrych czy chronicznych. W takich przypadkach zaleca się zastosowanie testów wielopokoleniowych.

Podczas analizy reprodukcji organizmów *E. fetida* zaobserwowano znaczne różnice między efektem toksycznym wywoływanym przez DKF i SMX. Bardzo istotnymi czynnikami podczas badań prowadzonych w środowisku glebowym są właściwości fizykochemiczne analizowanych związków, takie jak pK_a czy współczynnik podziału oktanol:woda ($\log K_{OW}$), które mogą wyjaśniać zaobserwowane różnice w toksyczności. Parametry te mają wpływ na akumulację ksenobiotyków w glebie. Związki hydrofobowe, posiadające $\log K_{OW} > 3$, będą ulegały sorpcji na cząsteczkach gleby, czyli będą mniej dostępne dla organizmów glebowych. Innym ważnym parametrem jest pK_a związku w stosunku do pH gleby. Gdy odczyn gleby jest wyższy niż wartość pK_a substancja występuje w formie

zdysocjowanej i słabiej ulega akumulacji. Natomiast gdy wartość pK_a jest zbliżona lub wyższa od wartości pH gleby, substancja będzie ulegała zjawisku sorpcji (Revitt i in., 2015). DKF charakteryzuje się wysokim współczynnikiem $\log K_{OW}$ (4.51) oraz niską wartością pK_a (4.15) w odniesieniu do pH gleby (5.8), a jego toksyczność względem organizmów *E. fetida* obserwowano dopiero w stężeniu 1 mg/kg s.m.g. Wynikać to może z sorpcji DKF na cząsteczkach gleby, przez co analizowany związek nie był tak łatwo dostępny dla organizmów modelowych. Natomiast SMX charakteryzuje się niskim współczynnikiem $\log K_{OW}$ (0.89) oraz pK_a zbliżonym do wartości pH gleby (5.6 – 5.7), co sprawiało, że był on łatwiej dostępny dla organizmów glebowych, o czym świadczy również obserwowane zahamowanie reprodukcji *E. fetida* już w stężeniu 0.125 mg/kg s.m.g.

System antyoksydacyjny działający w komórkach ma za zadanie neutralizację reaktywnych form tlenu, które mogą powstawać w kontakcie z ksenobiotykami. Przeprowadzone analizy aktywności enzymów antyoksydacyjnych wykazały, że nie wszystkie wybrane organizmy modelowe były dobrymi wskaźnikami stresu oksydacyjnego. Bardzo dobrym bioindykatorem okazała się *L. minor*, dla której zaobserwowano korelację między zahamowaniem wzrostu oraz aktywnością CAT.

W przypadku organizmów *V. faba* analizy aktywności enzymów antyoksydacyjnych nie były jednoznaczne. Wzrost aktywności CAT świadczył o wzroście liczby ROS w komórkach, które mogą prowadzić do uszkodzeń materiału genetycznego. Obserwowane wahania aktywności mogą jednak świadczyć o tym, że wzrost ROS, nie był jedynym czynnikiem mającym wpływ na powstawanie uszkodzeń materiału genetycznego. Innym mechanizmem genotoksyczności może być tworzenie adduktów DNA. Związki chemiczne, które posiadają w swojej budowie wolne grupy metylowe lub etylowe mogą łatwo łączyć się z zasadami azotowymi w DNA prowadząc do powstawania uszkodzeń materiału genetycznego (Theodorakis, 2008).

Dobrym bioindykatorem w analizie aktywności enzymów antyoksydacyjnych były również dżdżownice *E. fetida*. Zaobserwowano, że w badanych organizmach następował wzrost aktywności SOD oraz zmniejszenie aktywności CAT. Wzrost SOD informuje o uruchomieniu mechanizmów obronnych komórki. Spadek aktywności CAT może świadczyć o silnie toksycznym działaniu badanych farmaceutyków. Wywołany stres oksydacyjny był tak wysoki, że część mechanizmów obronnych uległa zahamowaniu. Może to prowadzić do dysfunkcji komórek oraz apoptozy. Spadek przeżywalności *E. fetida* w najwyższych analizowanych stężeniach potwierdza zaobserwowane wnioski.

Przeprowadzone testy toksyczności wykazały, że pomiędzy DKF i SMX znajdującymi się w równowagowej mieszaninie mogą zachodzić złożone interakcje. Na podstawie obliczonych wartości MTI określono, że badane farmaceutyki wykazują działanie synergistyczne lub addytywne. Obserwowana wyższa toksyczność mieszaniny, w odniesieniu do pojedynczych substancji aktywnych, stwarza poważne zagrożenie środowiskowe, które może okazać się trudne do przewidzenia.

Maksymalne stężenie DKF wykrywane w wodzie powierzchniowej wynosi 0.0187 mg/L, natomiast dla SMX wynosi ono 0.0119 mg/L (Hughes i in., 2013). Oznacza to, że analizowane związki w stężeniach wykrywanych w środowisku naturalnym nie będą powodowały toksyczności ostrej u organizmów modelowych. Zaobserwowano jednak, że farmaceutyki w niskich stężeniach mogą wywoływać uszkodzenia materiału genetycznego

oraz wpływać na wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Stężenia farmaceutyków w glebie są znacznie niższe niż stężenia wykrywane w wodzie (Li, 2014). DKF został wykryty w glebie w Chinach w stężeniach 0.35 – 1.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Li, 2014), natomiast SMX został wykryty w Afryce 1.43 – 5.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Yang i in., 2016). Stężenia wykrywane w glebie są na tyle niskie, że nie będą powodowały toksyczności ostrej, wpływu na reprodukcję oraz genotoksyczności u organizmów modelowych.

5.2. Analizy fizykochemiczne ścieków z oczyszczalni hydrofitowej

Zastosowana technologia oczyszczania ścieków pozwoliła na zredukowanie TOC o 85.0 – 94.7% oraz N-NH_4 o 2.9 – 51.4%. Na usunięcie analizowanych parametrów największy wpływ miała częstotliwość dozowania ścieków. Zastosowany tryb pracy oczyszczalni może wpływać na zachodzące procesy utleniania i redukcji oraz na dyfuzję tlenu do złoża. Dozowanie okresowe, poprzez zapewnienie warunków tlenowych, może zapewnić lepszą wydajność usuwania zanieczyszczeń niż podlewanie ciągłe (Zhang i in., 2012), jednak w takich systemach proces denitryfikacji zostaje ograniczony.

Według Li i in., (2014) farmaceutyki usuwane w oczyszczalni hydrofitowej można sklasyfikować jako łatwo usuwalne (średni stopień usunięcia >70%), umiarkowanie usuwalne (50 – 70%), ciężko usuwalne (20 – 50%) oraz prawie nieusuwalne (średni stopień usunięcia <20%). Zgodnie z tą klasyfikacją DKF był związkiem umiarkowanie usuwalnym (średnie usunięcie 61.5%), natomiast SMX był łatwo usuwalny w oczyszczalni hydrofitowej (średnie usunięcie 88.4%).

5.3. Zmienność ekotoksykologiczna ścieków z oczyszczalni hydrofitowej

Badania zmienności ekotoksykologicznej uzupełnione o analizy fizykochemiczne pozwalają na kompleksową ocenę procesu oczyszczania ścieków. Usunięcie związków łatwo rozkładalnych oraz ksenobiotyków nie gwarantuje zmniejszenia toksyczności ścieków. Przeprowadzone badania pozwalają na ocenę detoksykacji, czyli zmiany właściwości ekotoksykologicznych ścieków.

Na podstawie przeprowadzonych testów toksyczności oraz klasyfikacji zaproponowanej przez Persoone i in., (2003) badane ścieki przyporządkowane zostały do odpowiedniej klasy toksyczności. Ścieki dopływające do oczyszczalni hydrofitowej charakteryzowały się wysoką toksycznością względem organizmów wodnych. Odcieki po oczyszczaniu zmniejszyły swoją szkodliwość i charakteryzowały się średnią toksycznością. Na tej podstawie można sądzić, że nastąpił proces zmniejszenia toksyczności ścieków na skutek zaproponowanego systemu oczyszczania.

Podczas analizy wyników toksyczności względem *V. fischeri* zaobserwowano występowanie odpowiedzi negatywnej (hormezy). Zjawisko to charakteryzuje się zależnością między dawką i reakcją danego organizmu. W niskiej dawce następuje stymulacja reakcji, natomiast w dawce wysokiej – zahamowanie odpowiedzi. Zjawisko hormezy jest często spotykane podczas analizowania ścieków ze względu na duże ilości składników odżywczych mogących stymulować świecenie bakterii (Flohr i in., 2012). Pobudzający wpływ, w przypadku organizmów *V. fischeri*, zaobserwowano dla składników odżywczych

zawierających jony: K^+ , Ca^{2+} czy Na^+ . Zmniejszenie wpływu tych składników na uzyskane wyniki można osiągnąć przez wybór odpowiedniego roztworu kontrolnego, który będzie odnośnikiem dla zachodzącej reakcji. W celu stymulacji bakterii do maksymalnej produkcji światła można zastosować roztwór kontrolny zawierający następujące składniki: NaCl, KCl oraz $CaCl_2$ (Ma i in., 2014). W ramach tej pracy przeprowadzono modyfikację testu toksyczności ostrej względem *V. fischeri* poprzez zastosowanie jako roztworu kontrolnego syntetycznej wody morskiej. Dzięki zastosowaniu roztworu wzbogaconego w dodatkowe składniki ($MgCl_2$, Na_2SO_4 , $CaCl_2$, KCl, $NaHCO_3$, H_3BO_3) zniwelowano odpowiedź negatywną obecną w klasycznym teście.

Przeprowadzone testy reprodukcji oparte na organizmach *E. fetida* również okazały się bardzo wiarygodnym źródłem informacji odnośnie toksyczności ścieków. Dżdżownice mogą uczestniczyć w bioakumulacji, biodegradacji i biotransformacji metali ciężkich, pestycydów, herbicydów i innych substancji organicznych. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano silne działanie toksyczne ścieków zawierających farmaceutyki dopływających do oczyszczalni hydrofitowej. Zaobserwowano ponad 40% śmiertelność organizmów dorosłych po 28 dniach trwania testu. Podobne wyniki uzyskano w testach wstępnych, gdzie śmiertelność w stężeniu 4 mg/kg s.m.g. wynosiła 100%. Silne działanie toksyczne analizowanych leków miało znaczny wpływ na reprodukcję oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Działanie ścieków kontrolnych doprowadziło do zmniejszenia liczby młodych osobników o 56%, natomiast działanie ścieków zawierających badane leki o prawie 75%. Ścieki po procesie oczyszczania wykazywały niższe działanie toksyczne, jednak zahamowanie reprodukcji wahało się w granicach od 24 do 51%.

Ścieki pochodzące z oczyszczalni hydrofitowej miały wpływ na toksyczność względem komórek *V. faba*. Badania wstępne wykazały działanie genotoksyczne DKF, SMX i MIX. Analizy wykonane dla ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej potwierdziły te zależności. Zaobserwowano ponadto występowanie aberracji chromosomowych oraz brak mikrojąder. Może to świadczyć o zbyt krótkim czasie kontaktu ścieków z badanymi organizmami. Mikrojądra mogą powstawać na skutek zaburzenia działania aparatu mitotycznego oraz pęknięć chromosomów. Może to również świadczyć o tym, że uruchomione zostały mechanizmy naprawy DNA, których zadaniem jest eliminacja powstających uszkodzeń (Theodorakis, 2008). W procesie oczyszczania ścieki znacząco zmniejszyły swoją toksyczność w odniesieniu do ścieków surowych, jednak nadal obserwowano zmniejszenie MI o prawie 40% dla hodowli wodnej oraz o 20% dla hodowli glebowej w odniesieniu do warunków kontrolnych.

Przeprowadzone analizy wykazały, że najlepszymi bioindykatorami stresu oksydacyjnego były *L. minor* oraz *E. fetida*. W przypadku rzęsy wodnej zaobserwowano wzrost aktywności CAT pod wpływem działania badanych ścieków. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych nie jest stała i w przypadku tego organizmu modelowego wykazano, że zmienia się ona w zależności od toksyczności analizowanych próbek. Wraz ze wzrostem toksyczności wzrastała aktywność CAT aż do wartości TU wynoszącej 8.7. Świadczy to o maksymalnej mobilizacji systemu antyoksydacyjnego do przeciwdziałania nadmiarowi ROS. Powyżej tej wartości aktywność enzymu zaczynała spadać. Świadczy to o zbyt dużej liczbie reaktywnych cząsteczek, a tym samym zbyt dużej toksyczności analizowanych próbek, co może prowadzić do uszkodzenia rośliny a nawet ich obumierania (Song i in.,

2012). Rośliny są stale narażone na zmiany zachodzące w środowisku, co powoduje, że dostosowują one procesy zachodzące w komórkach tak aby utrzymać równowagę między wytwarzaniem energii i jej zużyciem. Równowaga ta zależy od sieci sygnalizacyjnej, która kontroluje najważniejsze procesy zachodzące w roślinach: fotosyntezę i fotorespirację. Procesy zachodzące w komórkach roślinnych są wrażliwe na zmiany warunków środowiskowych, które mogą powodować stres oksydacyjny poprzez promowanie tworzenia i akumulacji reaktywnych cząsteczek tlenu (Suzuki i in., 2012).

Podczas analizy wyników dla *V. faba* zaobserwowano znaczne wahania aktywności CAT. Zdecydowanie lepsze wyniki uzyskano podczas analizy SOD. Aktywność tego enzymu, zgodnie z przypuszczeniami, wzrastała pod wpływem działania ścieków z oczyszczalni hydrofitowej. Wykorzystanie tego parametru może być przydatne w ocenie zmian zachodzących w komórkach *V. faba*.

W przypadku sztucznych mokradeł aktywność enzymów antyoksydacyjnych często jest wykorzystywana do określenia wpływu zanieczyszczeń na rośliny stosowane w tych systemach. W badaniach przeprowadzonych w ramach tej pracy wykazano występowanie stresu oksydacyjnego w roślinach *M. giganteus*, którymi obsadzony był układ badawczy. Zaobserwowano wzrost aktywności dwóch enzymów: CAT i SOD. Bardzo duże wartości aktywności enzymów w roślinach *M. giganteus* zdają się potwierdzać wnioski Yan i in., (2016) mówiące, że wzrost aktywności enzymów związany jest ze wzrostem czasu kontaktu roślin ze ściekami.

Wyznaczono zależność pomiędzy parametrami fizykochemicznymi oraz toksycznością analizowanych próbek. Korelacje takie pozwalają na określenie stężenia ścieków, które będzie spełniało warunki braku toksyczności dla danego bioindykatora.

Na podstawie uzyskanych równań obliczono, że jeśli ścieki będą spełniały wymagania wprowadzone przez Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014 roku w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, to nie powinny wywoływać śmiertelności *E. fetida*, uszkodzenia materiału genetycznego ani stresu oksydacyjnego. Średnia toksyczność ścieków powinna wynosić około 0.6 TU. Dzięki określeniu korelacji występujących między parametrami fizykochemicznymi oraz ekotoksykologicznymi możliwe jest oszacowanie zagrożenia wywołwanego obecnością ścieków w środowisku naturalnym. Wyznaczone zależności mogą być pomocne w szybkim oszacowaniu właściwości ekotoksykologicznych ścieków tylko na podstawie ich właściwości fizykochemicznych. Należy jednak być bardzo ostrożnym podczas przeprowadzania takich analiz, ponieważ właściwości ścieków oraz ich skład mogą zmieniać się w czasie, więc zależności te powinny być monitorowane.

Analiza danych dotyczących toksyczności różnych substancji chemicznych jest ważnym elementem w ocenie ryzyka środowiskowego. Na podstawie tylko stężenia TOC (średnia wartość dla odcieków z oczyszczalni hydrofitowej wynosiła 26 mg/L) można by błędnie sądzić, że ścieki oczyszczone mogą zostać bezpiecznie wprowadzone do wód powierzchniowych lub do ziemi zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014 roku. Bardzo istotnym elementem są również parametry ekotoksykologiczne ścieków. Pomocne może również okazać się zastosowanie metod statystycznych, które umożliwiają określenie dopuszczalnych stężeń w środowisku naturalnym. W przypadku próbek środowiskowych należy być jednak bardzo ostrożnym, ponieważ skutki

oddziaływania między składnikami mieszaniny mogą być trudne do przewidzenia. Wartości HC₅ były dotychczas wyznaczane dla substancji chemicznych. Istnieje bardzo mała liczba danych literaturowych dotyczących wyznaczania wartości HC₅ dla ścieków (Kalka, 2013; Wilke i in., 2008). Wynikać to może ze znacznej zmienności ich składu a tym samym toksyczności.

Proces zmniejszenia toksyczności ścieków zaobserwowano w obu układach badawczych. Najlepszymi bioindykatorami, służącymi do oceny detoksykacji ścieków okazały się: *D. magna*, *L. minor*, *V. faba* oraz *E. fetida*. Jednak proces detoksykacji, definiowany jako zmniejszenie toksyczności substancji lub ścieków do poziomu bezpiecznego dla środowiska, nie został zrealizowany. Konieczne byłoby wprowadzenie dodatkowego systemu oczyszczania ścieków, który pozwoliłoby na zmniejszenie toksyczności odcieków. Do popularnie wykorzystywanych systemów doczyszczania należy: adsorpcja na węglu aktywnym, ozonowanie, zaawansowane procesy utleniania czy procesy membranowe (Luo i in., 2014). Skutecznym rozwiązaniem mogłoby okazać się zastosowanie hybrydowej oczyszczalni hydrofitowej, która składałaby się z dwóch systemów: VF-CWs oraz HF-CWs. Oczyszczalnie hydrofitowe często stosowane są jako drugi stopień oczyszczania ścieków (Wu i in., 2008). Wstępnie oczyszczone ścieki, np. z wykorzystaniem osadu czynnego są poddawane procesowi doczyszczania, którego celem jest usunięcie związków azotu oraz związków organicznych pozostałych w ściekach. Zastosowanie oczyszczalni hydrofitowych jako procesu mającego na celu usunięcie pozostałych zanieczyszczeń może okazać się skuteczną alternatywą dla drogich technologii takich jak, ozonowanie czy procesy zaawansowanego utleniania.

Wykorzystane w tej pracy testy ostre, testy genotoksyczności oraz testy reprodukcji dają bardzo szeroki obraz wpływu analizowanych substancji na organizmy pochodzące ze środowiska naturalnego oraz pozwalają na analizę skuteczności oczyszczania ścieków. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych jest parametrem, który może okazać się bardzo przydatny do oceny zmian występujących na poziomie komórkowym oraz może świadczyć o nieprawidłowościach w funkcjonowaniu organizmu. Analizy fizykochemiczne ścieków są standardem wykorzystywanym do oceny procesu oczyszczania, jednak nie świadczą one jednoznacznie o właściwościach ekotoksykologicznych oczyszczonych ścieków. Przeprowadzone badania wykazały, że ścieki pochodzące z oczyszczalni hydrofitowej nie powinny zostać wprowadzone do środowiska naturalnego. Wymagają one zastosowania dodatkowego systemu doczyszczania ścieków. Z tego powodu bardzo istotne jest monitorowanie zarówno parametrów fizykochemicznych jak i ekotoksykologicznych pracy oczyszczalni ścieków.

6. Wnioski

1. W oczyszczalni hydrofitowej możliwe jest przeprowadzenie częściowego procesu detoksykacji ścieków syntetycznych oraz ścieków, które zawierają DKF i SMX. Ścieki surowe charakteryzowały się wysoką szkodliwością względem organizmów wodnych, natomiast odcieki wykazywały średnią toksyczność.

2. Oczyszczalnia hydrofitowa o przepływie pionowym może być skutecznym narzędziem do usuwania mikrozanieczyszczeń ze środowiska naturalnego. W analizowanym układzie uzyskano wysokie usunięcie badanych farmaceutyków (średnie usunięcie DKF 61.5%, SMX 88.4%).
3. Wykazano zależność pomiędzy parametrami fizykochemicznymi analizowanych próbek ścieków a ich toksycznością. Analizy takie przeprowadzone dla całego układu mogą pomóc w oszacowaniu toksyczności ścieków.
4. Największy wpływ na obniżenie toksyczności miał zastosowany tryb dozowania ścieków. Potencjalny wpływ miała również obecność roślin *M. giganteus*. Nie był to jednak parametr kluczowy, jedynie intensyfikujący proces.
5. Najlepszymi bioindykatorami, służącymi do oceny procesu detoksykacji ścieków okazały się: skorupiaki *D. magna*, rośliny *L. minor* oraz *V. faba* oraz dżdżownice *E. fetida*.
6. Zaobserwowano wpływ analizowanych ścieków na reprodukcję dżdżownic *E. fetida*, na genotoksyczność względem komórek stożka wzrostu korzenia bobu *V. faba* oraz na aktywność enzymów antyoksydacyjnych: katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej.
7. Wykazano toksyczność badanych farmaceutyków względem biocenoz wodnych. DKF został zaklasyfikowany jako toksyczny, natomiast SMX jako szkodliwy względem organizmów modelowych. Równowagowa mieszanina analizowanych leków została sklasyfikowana jako toksyczna.
8. Na podstawie wartości HC₅ określono, że DKF wykazuje wysokie ryzyko związane z jego obecnością w środowisku naturalnym, natomiast SMX charakteryzuje się niskim zagrożeniem dla biocenoz wodnych.
9. Na podstawie wartości indeksu toksyczności mieszaniny (MTI) określono, że DKF i SMX występujące w mieszaninie wykazują działanie synergistyczne lub addytywne w zależności od wykorzystanego bioindykatora.
10. Diklofenak, sulfametoksazol oraz ich równowagowa mieszanina wykazywały negatywny wpływ na reprodukcję organizmów *E. fetida*, a także prowadziły do powstania uszkodzeń materiału genetycznego w komórkach *V. faba*.
11. Diklofenak i sulfametoksazol w stężeniach wykrywanych w środowisku naturalnym nie będą powodowały toksyczności ostrej u organizmów modelowych. Zaobserwowano jednak, że niskie stężenia farmaceutyków wykrywane w wodach powierzchniowych mogą wywoływać uszkodzenia materiału genetycznego oraz wpływać na wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

7. Literatura

1. Aldenberg T., Jaworska J.S. (2000): Uncertainty of the Hazardous Concentration and Fraction Affected for Normal Species Sensitivity Distributions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46, 1 – 18.
2. Bartrons M., Peñuelas J. (2017): Pharmaceuticals and Personal-Care Products in Plants. *Trends in Plant Science*, 22(3), 194 – 203.
3. Berendonk T.U., Manaia C.M., Merlin Ch., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Walsh F., Bürgmann H., Sørum H., Norström M., Pons M.-N., Kreuzinger N., Huovinen P., Stefani S., Schwartz T., Kisand V., Baquero F., Martinez J.L. (2015): Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13, 310 – 317.
4. Boxall A.B.A., Rudd M.A., Brooks B.W., Caldwell D.J., Choi K., i in. (2012): Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? *Environmental Health Perspectives*, 120(9), 1221 – 1229.
5. Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248 – 254.
6. Commission of the European Communities, 1996: Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for existing substances, Part II-Environmental risk assessment. Brussels, Belgium.
7. Cui Y., Zhao N. (2011): Oxidative stress and change in plant metabolism of maize (*Zea mays* L.) growing in contaminated soil with elemental sulfur and toxic effect of zinc. *Plant, Soil and Environment*, 57(1), 34 – 39.
8. Decyzja Wykonawcza Komisji (UE) 2015/495 z dnia 20 marca 2015 r. u ustanawiająca listę obserwacyjną substancji do celów monitorowania obejmującego całą Unię w zakresie polityki wodnej na podstawie dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE.
9. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2013/39/UE z dnia 12 sierpnia 2013 r. zmieniająca dyrektywy 2000/60/WE i 2008/105/WE w zakresie substancji priorytetowych w dziedzinie polityki wodnej.
10. Dz.U., poz. 1800 (2014). Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego.
11. Eggen R.I.L., Hollender J., Joss A., Schärer M., Stamm Ch. (2014): Reducing the Discharge of Micropollutants in the Aquatic Environment: The Benefits of Upgrading Wastewater Treatment Plants. *Environmental Science & Technology*, 48, 7683 – 7689.
12. Flohr L., de Castilhos Júnior A.B., Matias W.G. (2012): Acute and Chronic Toxicity of Soluble Fractions of Industrial Solid Wastes on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *The Scientific World Journal*, 2012, 643904.
13. Fortney L., Podein R., Hernke M. (2018): Detoxification, w: Integrative Medicine. (Ed.) Rakel D., Elsevier, 2018, 996 – 1002.
14. Frost L.S., Leplae R., Summers A.O., Toussaint A. (2005): Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722 – 732.
15. Gardner M., Comber S., Scrimshaw M.D., Cartmell E., Lester J., Ellor B. (2012): The significance of hazardous chemicals in wastewater treatment works effluents. *Science of the Total Environment*, 437, 363 – 372.
16. Góth L. (1991): A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196, 143 – 152.
17. Herrero O., Pérez Martín J.M., Fernández Freire P., Carvajal López L., Peropadre A., Hazen M.J. (2012): Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research*, 743, 20 – 24.

18. Hughes S.R., Kay P., Brown L.E. (2013): Global Synthesis and Critical Evaluation of Pharmaceutical Data Sets Collected from River Systems. *Environmental Science & Technology*, 47, 661 – 677.
19. ISO 11348-3:2007. Water quality – Determination of the inhibitory effect of waste samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
20. ISO 29200:2013. Soil quality — Assessment of genotoxic effects on higher plants — *Vicia faba* micronucleus test. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
21. Kalka J.: Bioindykacja w ocenie skuteczności oczyszczania ścieków ze składowisk odpadów. Monografia, Gliwice, 2013.
22. Li W.C. (2014): Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*, 187, 193 – 201.
23. Li Y., Zhu G., Ng W.J., Tan S.K. (2014): A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: Design, performance and mechanism. *Science of the Total Environment*, 468 – 469, 908 – 932.
24. Luo Y., Guo W., Ngo H.H., Nghiem L.D., Hai F.I., Zhang J., Liang S., Wang X.C. (2014): A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 473 – 474, 619 – 641.
25. Ma X.Y., Wang X.C., Ngo H.H., Guo W., Wu M.N., Wang N. (2014): Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. *Science of the Total Environment*, 468 – 569, 1 – 11.
26. Misra H.P., Fridovich I. (1972): The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170 – 3175.
27. Murray K.E., Thomas S.M., Bodour A.A. (2010): Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. *Environmental Pollution*, 158, 3462 – 3471.
28. Naddeo V., Belgiorno V., Kassinos D., Mantzavinos D., Meric S. (2010): Ultrasonic degradation, mineralization and detoxification of diclofenac in water: Optimization of operating parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 179 – 185.
29. Nagata S., Zhou X., Okamura H. (2008): Antagonistic and synergistic effects antifouling chemicals in mixture. w: *Ecotoxicology. A derivative of Encyclopedia of Ecology*. (Ed.) Jørgensen S.E., Academic Press, Elsevier, 193 – 202.
30. Nopens I., Capalozza C., Vanrolleghem P.A.: Technical report: Stability analysis of a synthetic municipal wastewater. Universiteit Gent, Belgium, 2001.
31. Nowrotek M., Sochacki A., Felis E., Miksch K. (2016): Removal of diclofenac and sulfamethoxazole from synthetic municipal waste water in microcosm downflow constructed wetlands: start-up results. *International Journal of Phytoremediation*, 18(2), 157 – 163.
32. OECD (2004), Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
33. OECD (2004), Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
34. OECD (2006), Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
35. Persoone G., Marsalek B., Blinova I., Törökne A., Zarina D., Manusadzianas L., Nalecz-Jawecki G., Tofan L., Stepanova N., Tothova L., Kolar B. (2003): A Practical and User-Friendly Toxicity Classification System with Microbiotests for Natural Waters and Wastewaters. *Environmental Toxicology*, 18(6), 395 – 402.
36. Prado R., García R., Rioboo C., Herrero C., Cid Á. (2015): Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 117 – 125.

37. Punzi M., Nilsson F., Anbalagan A., Svensson B.-M., Jönsson K., Mattiasson B., Jonstrup M. (2015): Combined anaerobic–ozonation process for treatment of textile wastewater: Removal of acute toxicity and mutagenicity. *Journal of Hazardous Materials*, 292, 52 – 60.
38. Qi Ch., Liu X., Lin Ch., Zhang X., Ma J., Tan H., Ye W. (2014): Degradation of sulfamethoxazole by microwave-activated persulfate: Kinetics, mechanism and acute toxicity. *Chemical Engineering Journal*, 249, 6 – 14.
39. Revitt D.M., Balogh T., Jones H. (2015): Sorption behaviours and transport potentials for selected pharmaceuticals and triclosan in two sterilised soils. *Journal of Soils and Sediments*, 15, 594 – 606.
40. Song G., Gao Y., Wu H., Hou W., Zhang Ch., Ma H. (2012): Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(9), 2147 – 2152.
41. Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012): ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell and Environment*, 35, 259 – 270.
42. Theodorakis C.W. (2008): Mutagenesis. w: *Ecotoxicology. A derivative of Encyclopedia of Ecology.* (Ed.) Jørgensen S.E., Academic Press, Elsevier, 154 – 163.
43. Thomaidi V.S., Matsoukas Ch., Stasinakis A.S. (2017): Risk assessment of triclosan released from sewage treatment plants in European rivers using a combination of risk quotient methodology and Monte Carlo simulation. *Science of the Total Environment*, 603 – 604, 487 – 494.
44. Vasquez M.I., Lambrianides A., Schneider M., Kümmerer K., Fatta-Kassinos D. (2014): Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 169 – 189.
45. van Vlaardingen P., Traas T.P., Wintersen A., Aldenberg T. (2004): ETX 2.0. A Program to Calculate Hazardous Concentrations and Fraction Affected, Based on Normally Distributed Toxicity Data. RIVM report 601501028/2004.
46. Wilke B.-M., Riepert F., Koch Ch., Kühne T. (2008): Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 283 – 293.
47. Wu Y., Chung A., Tam N.F.Y., Pi N., Wong M.H. (2008): Constructed mangrove wetland as secondary treatment system for municipal wastewater. *Ecological Engineering*, 34, 137 – 146.
48. Wu H., Zhang J., Ngo H.H., Guo W., Hu Z., Liang S., Fan J., Liu H. (2015): A review on the sustainability of constructed wetlands for wastewater treatment: Design and operation. *Bioresource Technology*, 175, 594 – 601.
49. Yan Q., Feng G., Gao X., Sun Ch., Guo J.-S., Zhu Z. (2016): Removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) and toxicological response of *Cyperus alternifolius* exposed to PhACs in microcosm constructed wetlands. *Journal of Hazardous Materials*, 301, 566 – 575.
50. Yang Y., Owino A.A., Gao Y., Yan X., Xu Ch., Wang J. (2016): Occurrence, composition and risk assessment of antibiotics in soils from Kenya, Africa. *Ecotoxicology*, 25, 1194 – 1201.
51. Yang Y., Ok Y.S., Kim K.-H., Kwon E.E., Tsang Y.F. (2017): Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of the Total Environment*, 596 – 597, 303 – 320.
52. Załęska-Radziwiłł M., Łebkowska M., Affek K., Zarzeczna A. (2011): Environmental risk assessment of selected pharmaceuticals present in surface waters in relation to animals. *Archives of Environmental Protection*, 37(3), 31 – 42.
53. Zhang D.Q., Tan S.K., Gersberg R.M., Zhu J., Sadreddini S., Li Y. (2012): Nutrient removal in tropical subsurface flow constructed wetlands under batch and continuous flow conditions. *Journal of Environmental Management*, 96, 1 – 6.