

Streszczenie

Farmaceutyki oraz środki higieny osobistej (PPCPs) wykrywane są w środowisku naturalnym i stwarzają poważne zagrożenie dla żyjących w nim organizmów. Głównym źródłem zanieczyszczenia środowiska przez PPCPs są składowiska odpadów, szamba oraz oczyszczalnie, które nie eliminują wszystkich mikrozanieczyszczeń obecnych w ściekach. Z tych powodów poszukiwane są nowe, skuteczne i naturalne a zarazem ekonomiczne metody usuwania zanieczyszczeń. Jednym z takich rozwiązań są oczyszczalnie hydrofitowe, czyli specjalnie zaprojektowane układy podmokłe, które zostały zbudowane w celu naśladowania naturalnych procesów zachodzących w systemach bagiennych.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena procesu detoksykacji ścieków pochodzących z oczyszczalni hydrofitowej usuwającej modelowe substancje farmaceutyczne, takie jak diklofenak (DKF) oraz sulfametoksazol (SMX), jak również ocena właściwości ekotoksykologicznych tych związków oraz ich równowagowej mieszaniny.

Uzyskane wyniki wskazują, że w zaproponowanym laboratoryjnym modelu oczyszczalni hydrofitowej możliwa była tylko częściowa detoksykacja ścieków. Toksyczność odcieków była niższa niż ścieków surowych, jednak ryzyko związane z ich obecnością w środowisku naturalnym pozostawało wysokie. Na proces zmniejszenia toksyczności wpływ miała częstotliwość dozowania ścieków oraz obecność roślin *Miscanthus giganteus*, którymi obsadzona była część układu badawczego. Proces detoksykacji zachodził efektywniej podczas dozowania ścieków z częstotliwością 1L/dobę 5 razy w tygodniu co miało związek z lepszą dyfuzją tlenu do złoża i sprzyjało rozkładowi zanieczyszczeń. Zaobserwowano również, że obecność roślin w oczyszczalni hydrofitowej intensyfikowała proces detoksykacji.

Ścieki surowe charakteryzowały się wysoką toksycznością względem wybranych organizmów modelowych. W badaniach wykorzystano bakterie *Vibrio fischeri* (średnia wartość TU dla tych organizmów wynosi 1.1), skorupiaki *Daphnia magna* (TU= 4.0, po 48 h), rośliny *Lemna minor* (TU=11.4), dżdżownice *Eisenia fetida* (zahamowanie reprodukcji na poziomie 65.7%) oraz rośliny *Vicia faba* (zmniejszenie indeksu mitotycznego oraz wzrost liczby uszkodzeń materiału genetycznego). Ponadto zaobserwowano silne działanie toksyczne ścieków dopływających do oczyszczalni hydrofitowej zawierających DKF i SMX względem *E. fetida*. Śmiertelność dorosłych organizmów po 28 dniach inkubacji wynosiła 41.1%. W badaniach analizowano również aktywność enzymów antyoksydacyjnych (katalazy CAT i dysmutazy ponadtlenkowej SOD) w roślinach *L. minor*, liściach *V. faba* oraz komórkach dżdżownic *E. fetida*. Przeprowadzone analizy wykazały, że ścieki surowe wpływały na aktywność analizowanych enzymów i prowadziły do wywołania stresu oksydacyjnego w badanych komórkach.

Odcieki pochodzące z oczyszczalni hydrofitowej wykazywały negatywny wpływ względem *V. fischeri* (średnia wartość TU=0.9), *D. magna* (TU=2.5, po 48 h) czy *L. minor* (TU=5.5). Zaobserwowano ponadto zahamowanie reprodukcji *E. fetida* (na poziomie 39%) oraz genotoksyczność względem komórek *V. faba* (zmniejszenie indeksu mitotycznego oraz wzrost liczby aberracji chromosomowych). Badania wykazały zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych w analizowanych komórkach. Zaobserwowano ponadto wzrost

aktywności enzymów antyoksydacyjnych w liściach *M. giganteus* pobranych z oczyszczalni hydrofitowej. Wzrost aktywności enzymów wynikał z długiego czasu kontaktu roślin z zanieczyszczeniami (241 – 290 dni).

Przeprowadzone analizy korelacji pozwoliły na powiązanie ze sobą parametrów fizykochemicznych ścieków z ich toksycznością. Dla każdego wskaźnika ekotoksykologicznego wyznaczono zależność między stężeniem całkowitego węgla organicznego (TOC) i azotu amonowego (N-NH₄), dzięki czemu możliwe było szybkie oszacowanie wpływu odcieków na środowisko naturalne tylko na podstawie ich właściwości fizykochemicznych. Zaobserwowano również korelacje między toksycznością ścieków i aktywnością CAT w *L. minor*. Początkowy wzrost aktywności enzymu wraz ze wzrostem TU ścieków świadczył o mobilizacji systemu antyoksydacyjnego do zwalczania nadmiaru reaktywnych cząsteczek tlenu, natomiast późniejsze obniżenie aktywności wynikało z wysokiej toksyczności analizowanych ścieków. Podobną korelację zaobserwowano dla *E. fetida*. Spadek aktywności CAT obserwowany wraz ze wzrostem TU ścieków wynikał z wysokiej ich szkodliwości.

W analizowanym układzie uzyskano wysokie usunięcie farmaceutyków (średnie usunięcie DKF 61.5% oraz SMX 88.4%). Zaobserwowano spadek TOC (średni spadek 91.8%) oraz N-NH₄ (24.7%).

Na podstawie badań wstępnych przeprowadzonych dla DKF, SMX oraz ich równowagowej mieszaniny (MIX) określono, że DKF oraz MIX wykazywały działanie toksyczne, natomiast SMX szkodliwe względem biocenoz wodnych. Dodatkowo określono, że DKF wykazuje wysokie ryzyko związane z jego obecnością w środowisku naturalnym, natomiast SMX charakteryzuje się niskim ryzykiem. Analizowane farmaceutyki wpływały również na reprodukcję dżdżownic *E. fetida* (EC₅₀ dla DKF, SMX i mieszaniny wynosiły odpowiednio: 1.2, 0.4 oraz 0.3 mg/kg s.m.g.), powodowały zmiany genetyczne w komórkach *V. faba* (zmniejszenie indeksu mitotycznego oraz wzrost liczby mikrojąder i aberracji chromosomowych) oraz wpływały na aktywność CAT i SOD. DKF i SMX występujące w mieszaninie wykazywały działanie synergistyczne, co oznacza, że toksyczność wywoływana przez mieszaninę była wyższa niż przewidywana suma toksyczności pojedynczych substancji aktywnych.

Wykorzystane testy ostre, testy genotoksyczności oraz 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.

Summary

Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) are detected in the environment and can cause a serious risk to the living organisms. The main source of PPCPs are landfills, septic tanks and sewage treatment plants, which do not eliminate all micropollutants present in wastewater. For these reasons, a novel, effective, natural and economic methods of removing xenobiotics are developed. One of these solutions are constructed wetlands, which are specially designed systems to imitate natural processes occurring in the environment.

The aim of the study was to evaluate the detoxification process of wastewater from a constructed wetland system removing model pharmaceutical substances such as diclofenac (DKF) and sulphamethoxazole (SMX), as well as evaluation of the ecotoxicological properties of these compounds and their equilibrium mixture.

The results indicate that only a partial detoxification of wastewater was reached in the proposed laboratory model of the constructed wetland system. The influent toxicity was lower than for the effluent, but the risk of presence in the environment remained high. The process of toxicity reduction was influenced by the frequency of dispensing sewage and the presence of *Miscanthus giganteus* in part of the research system. The detoxification process was more effective when sewage was dispensed at a frequency of 1L/day 5 times a week, which was related to better diffusion of oxygen into the bed and promoted the decomposition of pollutants. It was also observed that the presence of plants in the constructed wetland system intensified the detoxification process.

The influent was characterized by high toxicity towards selected model organisms. In the research there were used the bacteria *Vibrio fischeri* (mean value TU = 1.1), crustaceans *Daphnia magna* (TU = 4.0, after 48 h), plants *Lemna minor* (TU = 11.4), earthworms *Eisenia fetida* (inhibition of reproduction at 65.7%) and *Vicia faba* plants (decrease in the mitotic index and increase in the number of genetic material damage). A strong toxic effect was observed in the influent containing DKF and SMX against *E. fetida*. The mortality of adult organisms after 28 days of incubation was 41.1%. Also the activity of antioxidant enzymes was analyzed (catalase CAT and superoxide dismutase SOD) in *L. minor* plants, *V. faba* leaves and *E. fetida* earthworm cells. The results indicate that the raw sewage affected the activity of the enzymes and induced oxidative stress in the examined cells.

Wastewater from constructed wetland system had a negative impact on *V. fischeri* (mean TU value=0.9), *D. magna* (TU=2.5, after 48 h) and *L. minor* (TU = 5.5). In addition, inhibition of reproduction of *E. fetida* (at the level of 39%) and impact on genetic material of *V. faba* cells was observed (decrease in the mitotic index and an increase in the number of chromosomal aberrations). The changes in the activity of antioxidant enzymes in the model organisms cells indicated that oxidative stress was caused by the presence of wastewater. The results showed an increase in the activity of CAT and SOD also in the *M. giganteus* leaves from the constructed wetland system. The increase in enzyme activity resulted from the long contact time between plants and pollutants (241 – 290 days).

Correlations between physicochemical parameters of wastewater and their toxicity were observed. For each ecotoxicological indicator, the relationship between total organic carbon (TOC) and ammonium nitrogen (N-NH₄) concentration was determined. This enabled the estimation the impact of a effluents on the environment on the basis of their

physicochemical properties. There were also observed correlations between wastewater toxicity and CAT activity in *L. minor*. The initial increase in enzyme activity along with the increase in sewage TU indicated the mobilization of the antioxidant system. High wastewater toxicity caused a decrease in activity of CAT. A similar correlation was observed for *E. fetida*. The decrease in CAT activity was observed along with the increase in wastewater toxicity.

In the analyzed system a high removal of pharmaceuticals was obtained (average removal of DKF 61.5%, SMX 88.4%). The results showed a decrease in the concentration of TOC (average decrease 91.8%) and the N-NH₄ (24.7%).

Based on preliminary tests conducted for DKF, SMX and their equilibrium mixture (MIX) it was determined that DKF and MIX were toxic, whereas SMX was harmful to aquatic organisms. Additionally, it was determined that DKF shows a high risk related to its presence in the natural environment, while SMX was characterized as low risk substance. Pharmaceuticals also showed an effect on the reproduction of *E. fetida* earthworms (EC₅₀ value for DKF, SMX and MIX were respectively 1.2, 0.4, and 0.3 mg/kg soil dry matter), caused genetic changes in *V. faba* cells (decrease in the mitotic index and increase in the number of micronuclei and chromosomal aberrations) and influenced the activity of CAT and SOD. DKF and SMX in the mixture showed a synergistic effect, meaning that the toxicity caused by the mixture was higher than the predicted toxicity of the individual active ingredients.

The used acute tests, genotoxicity and reproduction tests give a wide picture of the impact of analyzed substances on organisms from the natural environment and allow to conduct the analysis of the effectiveness of wastewater treatment. The activity of antioxidant enzymes is a parameter that can be useful for assessing changes occurring at the cellular level and may indicate abnormalities in the functioning of the organisms. Physicochemical analysis of wastewater are a standard used to assess the treatment process, but they do not clearly demonstrate the ecotoxicological properties of treated wastewater. The conducted research show that the sewage from the constructed wetlands should not be introduced into the natural environment. They require the use of an additional wastewater treatment system.