

# 1. Streszczenie

Współcześnie ekosystemy wodne narażone są na czynniki stresowe związane z postępującą zmianą klimatu, takie jak wzrost temperatury oraz zakwaszenie środowiska wodnego. Istotnym zagrożeniem dla środowiska naturalnego są także substancje pochodzenia antropogenicznego, w tym nowo pojawiające się zanieczyszczenia, do których należą farmaceutyki. Związki te trafiają do wód środowiskowych głównie na skutek niepełnego usuwania w konwencjonalnych oczyszczalniach ścieków. Ze względu na aktywność biologiczną mogą one, nawet przy niskich stężeniach, oddziaływać na organizmy niecelowe. Ich toksyczność może ulegać zmianie pod wpływem temperatury i pH środowiska wodnego, co podsumowano w przeglądzie literaturowym stanowiącym część niniejszej rozprawy doktorskiej. W przypadku farmaceutyków jonizowalnych pH wpływa na ich formę jonową i biodostępność, zwłaszcza gdy wartość  $pK_a$  związku jest zbliżona do pH wód naturalnych. Przykładem są niektóre sulfonamidy - antybiotyki, które są jednymi z najczęściej wykrywanych farmaceutyków w próbkach wód środowiskowych. Inną grupą farmaceutyków, których obecność odnotowuje się w środowisku na poziomie ng/l- $\mu$ g/l, są niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ).

Dlatego też celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena znaczenia pH, składu medium testowego oraz źródła i sposobu przygotowania organizmów testowych w kształtowaniu wyników ostrej i przewlekłej toksyczności sulfametoksazolu (SMX) i diklofenaku (DCF) wobec organizmów referencyjnych, a także w interpretacji testów opartych na wytycznych Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD).

Realizację postawionych celów rozpoczęto od badań przeprowadzonych w warunkach rzeczywistych, które wykazały możliwość bioakumulacji DCF w organizmach *Daphnia* sp. bytujących w oczyszczalni ścieków. Analiza celowana farmaceutyków z grupy NLPZ, z wykorzystaniem ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS), wykazała obecność DCF w organizmach rozwielitek oraz wskazała na możliwość funkcjonowania ich populacji w środowisku przewlekłe narażonym na mieszaninę zanieczyszczeń. Badania te stanowiły punkt wyjścia do dalszych badań laboratoryjnych.

W celu oceny wpływu obniżenia pH na toksyczność farmaceutyków oraz weryfikacji przydatności testów opartych na wytycznych OECD przeprowadzono szereg testów ekotoksykologicznych o krótkim i długim czasie ekspozycji, zgodnie z OECD 202, OECD 211 oraz OECD 221. Wykorzystano organizmy referencyjne, takie jak *Daphnia magna* oraz *Lemna minor*. Realizacja celu rozprawy doktorskiej obejmowała również analizę wpływu warunków prowadzenia testów, takich jak skład medium hodowlanego, stabilność parametrów fizykochemicznych, a także źródło i sposób przygotowania organizmów testowych na uzyskane wyniki ekotoksykologiczne.

Badania ostrej toksyczności SMX wobec *L. minor*, ocenianej na podstawie zahamowania wzrostu, wykazały zwiększenie toksyczności leku wraz ze spadkiem pH. Zakwaszenie spowodowało wzrost udziału neutralnej formy leku, bardziej dostępnej biologicznie dla rośliny. W przypadku DCF zakwaszenie zwiększało jego toksyczność przewlekłą, wpływając na parametry reprodukcyjne, m.in. na czas do pojawienia się pierwszego miotu. Co ważne, wyniki wskazały, że obniżenie pH może również modyfikować odpowiedź biologiczną organizmu, a w konsekwencji jego wrażliwość na zanieczyszczenie. Nie bez znaczenia w ocenie toksyczności DCF wobec *D. magna* (OECD 202) okazały się rodzaj medium oraz źródło i sposób przygotowania organizmów testowych. Różnice między zastosowanymi mediami, w tym ich skład jonowy, a także różnice w źródle i sposobie przygotowania organizmów testowych wiązały się z istotnym statystycznie zróżnicowaniem wartości  $EC_{50}$ .

Uzyskane wyniki wskazują, że testy OECD stanowią podstawowe narzędzie oceny ekotoksyczności, jednak interpretacja ich wyników w przypadku farmaceutyków jonizowalnych powinna uwzględniać wpływ zmiennych warunków środowiskowych zarówno na właściwości badanych związków, jak i na odpowiedź organizmów wodnych. Szczególne znaczenie ma monitorowanie i raportowanie pH, które wpływa nie tylko na formę jonową farmaceutyków, ale również na odpowiedź biologiczną i wrażliwość badanych organizmów. Ponadto wiarygodna ocena wyników wymaga szczegółowego raportowania historii hodowli organizmów testowych, a także pełnej charakterystyki medium, obejmującej również jego skład jonowy. Podsumowując, przedstawione w niniejszej pracy doktorskiej wyniki wskazują na potrzebę uwzględnienia zmienności warunków środowiskowych i metodycznych oraz szerszej charakterystyki organizmów testowych podczas interpretacji i raportowania wyników testów opartych na wytycznych OECD, co może pozwolić na bardziej rzetelną ocenę ryzyka środowiskowego związanego z obecnością farmaceutyków w warunkach zmieniającego się klimatu.