

**Monika Załęska-Radziwiłł*, Maria Łebkowska*, Katarzyna Affek*,
Nina Chrzanowska***

**OCENA RYZYKA WYWOŁANEGO OBECNOŚCIĄ WYBRANYCH
FARMACEUTYKÓW W WODACH POWIERZCHNIOWYCH
W STOSUNKU DO SINIC I ROŚLIN**

**ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF SELECTED
PHARMACEUTICALS PRESENT IN SURFACE WATERS IN RELATION
TO CYANOBACTERIA AND PLANTS**

Słowa kluczowe: ocena ryzyka, cyprofloksacyna, etynyloestradiol, fluorouracyl, sinice, rośliny wodne.

Key words: risk assessment, ciprofloxacin, ethinylestradiol, fluorouracil, cyanobacteria, aquatic plants.

*Ecotoxicity was examined of three medical products (ciprofloxacin, 17 α -ethinylestradiol and 5-fluorouracil) detected in sewage and surface waters towards cyanobacteria, chlorophyta and higher plants. We conducted growth tests, determined effect concentrations (EC50-t), no observed effect concentrations (NOEC), and predicted no effect concentrations (PNEC) towards water plants. All pharmaceuticals tested limited the growth of cyanobacteria, algae and higher plants. EC50-t values were in the ranges: for ciprofloxacin from 0.020 mg/l (*Microcystis aeruginosa*) to 6.83 mg/l (*Scenedesmus obliquus*), for 17 α -ethinylestradiol from 0.21 mg/l (*Raphidocelis subcapitata*) to 1.49 mg/l (*Lemna minor*) and for 5-fluorouracil from 0.91 mg/l (*Lemna minor*) to 30.49 mg/l (*Scenedesmus obliquus*). Calculated PNEC values were 0.00025 mg/l for ciprofloxacin and 17 α -ethinylestradiol and 0.0005 mg/l for 5-fluorouracil. Risk assessment based on PEC/PNEC ratios (PEC – predicted environmental concentration) indicated high risk associated with the presence of 17 α -ethinylestradiol – at concentrations detected in surface waters in the USA, and ciprofloxacin – when PEC was calculated according to EMEA (European Medicines Agency) guidelines.*

* **Dr hab. Monika Załęska-Radziwiłł, profesor nadzwyczajny, prof. dr hab. Maria Łebkowska, mgr Katarzyna Affek, mgr Nina Chrzanowska – Wydział Inżynierii Środowiska, Zakład Biologii; Politechnika Warszawska, ul. Nowowiejska 20, 00-653 Warszawa; tel.: 22 234 79 03; e-mail: monika.radziwill@is.pw.edu.pl**

1. WPROWADZENIE

W ostatnich latach zwrócono uwagę na wzrastające zanieczyszczenie środowiska środkami farmaceutycznymi. Związki te wykryto między innymi w ściekach oczyszczonych, wodach powierzchniowych, a nawet w wodzie przeznaczonej do spożycia [Kümmerer i in. 2000]. Stężenia farmaceutyków w wodach powierzchniowych wahają się od ng/l do µg/l [Nikolaou i in. 2007]. Ze względu na swoje właściwości leki nie są eliminowane z wód w procesie samooczyszczania, wiele z nich ma zdolność do kumulacji w tkankach organizmów, przez co stanowić mogą bezpośrednie zagrożenie dla ich zdrowia i życia. Stąd też problem oceny szkodliwego oddziaływania substancji leczniczych na organizmy ekosystemów wodnych jest niezwykle aktualny.

Do tej pory najwięcej badań ekotoksykologicznych różnych farmaceutyków przeprowadzono z użyciem zwierząt, nieliczne natomiast dotyczyły roślin. Rośliny wodne, reprezentowane przez wiele gatunków glonów i makrofitów, stanowią ważne ogniwo łańcucha pokarmowego w ekosystemie wodnym. Odgrywają istotną rolę w produkcji tlenu i krążeniu substancji odżywczych, wpływają też na jakość wody i stabilizację osadów dennych, a także stanowią nisze ekologiczne dla organizmów wodnych oraz zapewniają im schronienie. Fitoplankton, fitobentos i makrofity są ponadto ważnym składnikiem biomasy ekosystemów wodnych i pierwotnym źródłem energii/węgla. Zmiany w populacjach roślin wodnych mogą wpływać nie tylko na funkcjonowanie ekosystemu, ale także na jakość wody pitnej i użytkowej. Rośliny wodne od lat są stosowane jako biowskaźniki do oceny stanu jakości wód, jednak dopiero w ostatnich dziesięcioleciach są wykorzystywane w testach toksyczności do oceny potencjalnego zagrożenia środowiska [Mohan, Hosetti 1998; Brain i in. 2004].

Dane dotyczące fitotoksyczności są przydatne dla oceniających i zarządzających ryzykiem w ochronie zasobów wodnych, w ocenie toksyczności ścieków oraz przy atestacji nowych związków chemicznych. W zestawie badań toksykologicznych służących do oceny ryzyka wywołanego obecnością produktów leczniczych w wodach powierzchniowych proponowanym w wytycznych EMEA (*European Medicines Agency*) z 1998 roku i z 2006 roku rośliny reprezentowane są tylko przez jeden gatunek glonów [EMEA 1998, EMEA 2006]. Wydaje się to niewystarczające do opracowania pełnego profilu zagrożenia środowiska związanego z obecnością leków w ekosystemach wodnych. Farmaceutyki mogą przecież wywoływać niepożądane efekty także u innych gatunków producentów, różniących się fizjologią.

Celem niniejszej pracy jest ocena ryzyka wywołanego oddziaływaniem na sinice i rośliny wodne przedstawicieli trzech grup farmaceutyków:

- 1) leków antybakteryjnych (cyprofloksacyna),
 - 2) estrogenów (17 α -etynyloestradiol)
- oraz
- 3) cytostatyków (5-fluorouracyl).

Cyprofloksacyna należy do antybiotyków z grupy fluorochinolonów, których działanie polega na inhibicji topoizomerazy DNA (gyrazy), biorącej udział w biosyntezie DNA. Wywołuje efekt genotoksyczny w materiale genetycznym, w stężeniach subletalnych (5 – 10 µg/l) indukuje oporność bakterii na fluorochinolony, która może być przekazywana w procesie horyzontalnego transferu genów [Hartmann i in. 1998; Hartmann i in. 1999]. Uważa się, że leki antybakteryjne mogą powodować uszkodzenie plastydów ze względu na ich hipotetyczne bakteryjne pochodzenie [McFadden, Roos 1999].

Estrogeny (w tym 17α-etynyloestradiol) to grupa związków chemicznych o budowie steroidowej należąca do hormonów płciowych. Ze względu na znaczne użycie w tabletkach antykoncepcyjnych mogą stanowić zagrożenie dla środowiska. Większość badań ekotoksyczności estrogenów dotyczy ich wpływu na populacje ryb [Nash i in. 2004].

5-Fluorouracyl lekiem cytostatycznym stosowanym w terapii antynowotworowej jest. Jego działanie polega głównie na inhibicji biosyntezy monofosforanu tymidyny (TMP), co prowadzi do zakłócenia replikacji DNA i zahamowania proliferacji komórek nowotworowych. Chociaż w testach toksyczności ostrej nie zaobserwowano wpływu cytostatyków na organizmy wodne w stężeniach obecnych w środowisku, to jednak testy przeprowadzone przez Zaunkową i wsp. wykazały niskie wartości stężeń efektywnych dla glonu *Pseudokirchneriella subcapitata* [Zaunkova i in. 2007].

2. MATERIAŁY I METODY

Związki chemiczne. Cyprofloksacynę $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ (Fluka), 17α-etynyloestradiol $C_{20}H_{24}O_2$ (Sigma) i 5-fluorouracyl $C_4H_3FN_2O_2$ (Fluka) o czystości >98% uzyskano z firmy Sigma-Aldrich. Roztwory podstawowe cyprofloksacyny i 5-fluorouracylu sporządzono w wodzie dejonizowanej, a 17α-etynyloestradiolu w etanolu (1% v/v), po czym wykorzystywano je do wykonywania szeregu rozcieńczeń stosując medium odpowiednio do procedur testów.

Badania ekotoksykologiczne. Przeprowadzono testy wzrostowe na cyjanobakteriach, zielenicach i roślinach wyższych. Cyjanobakterie *Microcystis aeruginosa* (CCALA 796) oraz zielenice *Desmodesmus quadricauda* (CCALA 463) i *Raphidocelis subcapitata* (CCALA 433) uzyskano z Institute of Botany, Academy of Science w Czechach, a zielenice *Scenedesmus obliquus* i rośliny wyższe *Lemna minor* pochodziły z hodowli własnej Zakładu Biologii Wydziału Inżynierii Środowiska Politechniki Warszawskiej.

Testy wzrostowe z cyjanobakteriami i glonami wykonano według procedury PN-EN ISO 8692 [PN-EN ISO 8692 1993]. Organizmy w fazie wykładniczego wzrostu dodawano do podłoża mineralnego, zawierającego określone stężenia farmaceutyków. Początkowe zagęszczenie cyjanobakterii i glonów wynosiło 10^4 kom./ml. Hodowle testowe prowadzono przez okres 72 ± 2 godz., w aparacie Fitotron, przy oświetleniu ciągłym 8000 lx i w temperaturze 23°C. Pomiarzy zagęszczenia komórek wykonywano raz na dobę przy użyciu mikroskopu, stosując komory do liczenia o pojemności 1 ml.

Test wzrostowy z *Lemna minor* wykonano według procedury PN-EN ISO 20079 [PN-EN ISO 20079 2004]. Do wykonania określonych stężeń badanych leków zastosowano mineralną pożywkę wzrostową Steinberga (zmodyfikowaną przez Altenburgera). W każdym badanym stężeniu i kontroli umieszczano po trzy rośliny zawierające po 3 listki (frondy). Hodowle testowe prowadzono przez 7 dni w aparacie Fitotron przy oświetleniu ciągłym 3000 lx i w temperaturze 25°C.

Pomiarów powierzchni i liczby listków na początku i na końcu testu dokonano przy użyciu oprogramowania komputerowego do cyfrowej analizy obrazu UTHSCA ImageTool wersja 3.0.

3. PROCEDURY OBLICZENIOWE

Określenie inhibicji wzrostu cyjanobakterii, glonów i *Lemna minor*. Szybkość wzrostu cyjanobakterii i glonów określono na podstawie równania:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_o}{t_n},$$

gdzie:

N_o – liczba komórek glonów w 1 cm³ w czasie t_o ;

N_n – liczba komórek glonów w 1 cm³ w czasie t_n ;

t_n – czas ($t - t_o$).

Inhibicję wzrostu obliczano zgodnie z równaniem:

$$I\mu_i = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \cdot 100,$$

gdzie:

$I\mu_i$ – procent inhibicji;

μ_i – średnie tempo wzrostu glonów w badanym stężeniu;

μ_c – średnie tempo wzrostu glonów w próbie kontrolnej.

Analogicznie określono inhibicję wzrostu u *Lemna minor*, przyjmując odpowiednio jako N liczbę listków (lub ich powierzchnie) w badanym stężeniu.

Obliczenie stężeń. Stężenia letalne i efektywne EC_{50} -t obliczono metodą probitową, określając 95-procentowe przedziały ufności [Weber 1972].

Najwyższe stężenia niewywołujące efektów szkodliwych (NOEC) wyznaczono stosując jednoczynnikową analizę wariancji i test Tukey'a [Berthouex, Brown 1994].

4. OCENA TOKSYCZNOŚCI ZWIĄZKÓW I OCENA RYZYKA

Toksyczność związków oceniono na podstawie kryteriów zawartych w Dyrektywie 93/67 Unii Europejskiej [Commission of the European Communities 1996] i Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska [Technical Support Document... 1991].

Ocenę ryzyka wywołanego obecnością badanych substancji aktywnych w wodach powierzchniowych w stosunku do roślin przeprowadzono na podstawie współczynnika ryzyka RQ (*Risk Quotient*):

$$RQ = \frac{PEC}{PNEC},$$

gdzie:

PEC (ang. *Predicted Environmental Concentration*) – przewidywane stężenie w środowisku;

PNEC (ang. *Predicted No Effect Concentration*) – przewidywane stężenie niewywołujące negatywnych skutków w środowisku.

Wartości: $RQ \geq 1$ oznaczają duże ryzyko, wartości $RQ < 1$ – małe ryzyko.

Jako PEC przyjęto stężenia wykrywane w wodach powierzchniowych (MEC – ang. *Measured Environmental Concentration*) lub obliczone zgodnie z procedurą EMEA [EMEA 2006]. Wartości PEC (MEC) podano w tabeli 4.

Przewidywanie stężenie niewywołujące negatywnych skutków w środowisku (PNEC) obliczono z danych toksyczności chronicznej (NOEC), metodą obowiązkowych współczynników bezpieczeństwa, stosując współczynnik $AF=10$ wynikający z ilości i jakości danych toksykologicznych [Commission of the European Communities 1996].

5. WYNIKI BADAŃ I Dyskusja

Wyniki badań ekotoksykologicznych przedstawiono w postaci profili toksyczności w tabelach 1–3. Wartości EC_{50} -t uzyskane w badaniach uporządkowano w kolejności od najwyższych do najniższych. Do profili włączono ocenę toksyczności leków według kryteriów Unii Europejskiej – Dyrektywa 93/67/EEC [Commission of the European Communities 1996] i Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska US EPA [Technical Support Document...1991].

Wszystkie badane farmaceutyki wpływały niekorzystnie na wzrost cyanobakterii, glonów i roślin wyższych, a uzyskane stężenia efektywne wskazały na zróżnicowaną wrażliwość organizmów testowych na badane substancje aktywne.

Tabela 1. Profil toksyczności cyprofloksacyny**Table 1.** Toxicity profile for ciprofloxacin

Związek	Organizm testowy	Kryteria oceny toksyczności	Czas, godz.	EC ₅₀ -t (przedział ufności 95%), mg/l	NOEC, mg/l	Ocena toksyczności	
						wg UE – dyrektywa 93/67/EEC	wg US EPA
Cyprofloksacyna	<i>Scenedesmus obliquus</i>	wzrost	72	6,83 (5,23–8,3)	0,025	toksyczny	umiarkowanie toksyczny
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	wzrost	72	6,71 (5,21–7,98)	0,05	toksyczny	umiarkowanie toksyczny
	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	wzrost	72	5,22 (4,60–5,90)	0,05	toksyczny	umiarkowanie toksyczny
	<i>Lemna minor</i>	wzrost liczby liści	168	0,73 (0,61–0,85)	0,013	bardzo toksyczny	silnie toksyczny
	<i>Lemna minor</i>	wzrost powierzchni liści	168	0,58 (0,41–0,71)	0,0025	bardzo toksyczny	silnie toksyczny
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	wzrost	72	0,020 (0,012–0,028)	0,005	ekstremalnie toksyczny	silnie toksyczny

Tabela 2. Profil toksyczności 17 α -etynyloestradiolu**Table 2.** Toxicity profile for 17 α -ethinylestradiol

Związek	Organizm testowy	Kryteria oceny toksyczności	Czas, godz.	EC ₅₀ -t (przedział ufności 95%), mg/l	NOEC, mg/l	Ocena toksyczności	
						wg UE – dyrektywa 93/67/EEC	wg US EPA
17 α -Etynyloestradiol	<i>Lemna minor</i>	wzrost liczby liści	168	1,49 (1,20–1,69)	0,0025	toksyczny	umiarkowanie toksyczny
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	wzrost	72	1,48 (1,18–1,71)	0,04	toksyczny	umiarkowanie toksyczny
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	wzrost	72	0,82 (0,71–0,93)	0,005	bardzo toksyczny	silnie toksyczny
	<i>Lemna minor</i>	wzrost powierzchni liści	168	0,43 (0,31–0,53)	0,0025	bardzo toksyczny	silnie toksyczny
	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	wzrost	72	0,29 (0,17–0,39)	0,005	bardzo toksyczny	silnie toksyczny
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	wzrost	72	0,21 (0,11–0,31)	0,005	bardzo toksyczny	silnie toksyczny

W przypadku cyprofloksacyny (tab. 1) wartości EC₅₀-t zawierały się w przedziale od 0,020 mg/l dla *Microcystis aeruginosa* do 6,83 mg/l dla *Scenedesmus obliquus*. Związek ten silnie ograniczał wzrost *Lemna minor* zarówno w odniesieniu do liczby, jak i powierzchni listków – EC₅₀ po 7 dniach wynosiło odpowiednio 0,58 mg/l i 0,73 mg/l. Dane z piśmiennictwa wskazują również na dużą wrażliwość sinic i rzęsy na działanie tego antybiotyku. EC₅₀ dla sinic uzyskane przez Halling-Sørensen i wsp. [2000] wynosiło 0,005 mg/l, natomiast przez Robinson i wsp.[2005] 0,017 mg/l i było zbliżone do uzyskanego w niniejszej pracy.

Wartości EC_{50} po 7 dniach dla *Lemna minor* w badaniach innych autorów wynosiły 0,203 mg/l, 0,243 mg/l [Robinson i in. 2005; Bielińska, Nałęcz-Jawecki 2009] i były niższe od uzyskanych w prezentowanej pracy zarówno w odniesieniu do wzrostu liczby, jak i powierzchni listków. Wartości EC_{50} uzyskane dla *Lemna minor* w niniejszych badaniach były natomiast niemal identyczne z opublikowanymi przez Brain i wsp. dla *Lemna gibba* [Brain i in. 2004].

Tabela 3. Profil toksyczności 5-fluorouracylu

Table 3. Toxicity profile for 5-fluorouracil

Związek	Organizm testowy	Kryteria oceny toksyczności	Czas, godz.	EC_{50-t} [mg/l] (przedział ufności 95%), mg/l	NOEC, mg/l	Ocena toksyczności	
						wg UE Dyrektywa 93/67/EEC	wg US EPA
5-Fluorouracyl	<i>Scenedesmus obliquus</i>	wzrost	72	30,49 (28,29–32,69)	0,1	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny
	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	wzrost	72	20,46 (18,06–22,42)	0,1	szkodliwy	umiarkowanie toksyczny
	<i>Microcystis aeruginosa</i>	wzrost	72	6,10 (4,95–7,15)	0,04	toksyczny	umiarkowanie toksyczny
	<i>Lemna minor</i>	wzrost liczby liści	168	1,04 (0,84–1,24)	0,013	toksyczny	umiarkowanie toksyczny
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	wzrost	72	0,96 (0,71–1,14)	0,005	bardzo toksyczny	silnie toksyczny
	<i>Lemna minor</i>	wzrost powierzchni liści	168	0,91 (0,70–1,11)	0,025	bardzo toksyczny	silnie toksyczny

Pośród wszystkich organizmów testowych najmniej wrażliwe na działanie cyprofloksacyny okazały się zielenice. Potwierdzają to również dane z piśmiennictwa – EC_{50} -72h dla *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*) wynosiło: 2,97 mg/l, [Halling-Sørensen i in. 2000], 18,7 mg/l [Robinson i in. 2005] oraz 6,71 mg/l [Yang i in. 2008]. Ocena toksyczności dokonana na podstawie wartości EC_{50-t} w profilu toksyczności wykazała, że cyprofloksacyna była ekstremalnie toksyczna dla *Microcystis aeruginosa*, bardzo toksyczna dla *Lemna minor* i toksyczna dla wszystkich gatunków zielenic.

Uzyskane w badaniach wartości stężeń efektywnych 17α -etynyloestradiolu (tab. 2) były niskie i wynosiły od 0,21 mg/l do 1,49 mg/l odpowiednio dla *Raphidocelis subcapitata* i *Lemna minor*. Stężenia efektywne dla wszystkich gatunków zielenic były <1 mg/l, co kwalifikuje hormon jako bardzo toksyczny dla tych organizmów. Niewiele jest danych w piśmiennictwie dotyczących wpływu 17α -etynyloestradiolu na rośliny wodne. W badaniach Halling-Sørensen i wsp. [1998] EC_{50} dla glonów było również <1 mg/l (0,84 mg/l), natomiast EC_{10} uzyskane przez Köpf [1995 za Cranei in. 2006] wynosiło 0,054 mg/l.

Nieco mniejszą szkodliwość w stosunku do bioindykatorów wykazał 5-fluorouracyl (tab. 3). Najbardziej wrażliwym organizmem na działanie cytostatyka okazała się *Lemna minor* – EC_{50} po 7 dniach w odniesieniu do powierzchni i liczby listków wynosiło odpowied-

nio 0,91 mg/l i 1 mg/l. Spośród zielenic najbardziej wrażliwe były glony *Raphidocelis subcapitata* – EC₅₀-72 godz. wynosiło 0,96 mg/l. W badaniach Zaunkovej i wsp. [2007] EC₅₀-72 godz. dla tych glonów było niższe i wynosiło 0,11 mg/l. Cleuvers i wsp. [2002] przeprowadzili badania z glonami *Desmodesmus supspicatus* uzyskując EC₅₀ równe 21 mg/l. Podobną wartość (20,46 mg/l) uzyskano w niniejszej pracy dla *Desmodesmus quadricauda*. Według kryteriów Unii Europejskiej 5-fluorouracyl był bardzo toksyczny dla *Lemna minor* i *Raphidocelis subcapitata* oraz toksyczny i szkodliwy dla pozostałych organizmów.

Wyznaczone w testach wartości najwyższych stężeń niewywołujących efektów szkodliwych NOEC wynosiły odpowiednio dla: cyprofloksacyny od 0,0025 mg/l (*Lemna minor* – wzrost powierzchni listków) do 0,05 mg/l (zielenice *Raphidocelis subcapitata*), dla 17 α -etynyloestradolu od 0,0025 mg/l (*Lemna minor*) do 0,04 mg/l (*Microcystis aeruginosa*), dla 5-fluorouracylu od 0,005 mg/l (*Raphidocelis subcapitata*) do 0,1 mg/l (pozostałe zielenice). Yang i wsp. [2008] określili NOEC <0,5 mg/l w odniesieniu do cyprofloksacyny dla glonów *Raphidocelis subcapitata*, Zaunkova i wsp. [2007] natomiast w odniesieniu do 5-fluorouracylu – 0,001 mg/l i jest to wartość niższa niż uzyskana w prezentowanej pracy.

Wyznaczone wartości NOEC posłużyły do obliczenia stężeń niewywołujących negatywnych skutków w środowisku (PNEC) badanych farmaceutyków w odniesieniu do producentów w ekosystemach wodnych. Zastosowano metodę obligatoryjnych współczynników bezpieczeństwa przyjmując współczynnik AF=10 wynikający z ilości i jakości danych toksykologicznych. Najniższe stężenia uzyskano dla cyprofloksacyny i 17 α -etynyloestradolu i wynosiły one 0,00025 mg/l, natomiast dla 5-fluorouracylu – 0,0005 mg/l (tab. 4).

Tabela 4. Ocena ryzyka dla cyprofloksacyny, 17 α -etynyloestradolu i 5-fluorouracylu

Table 4. Risk assessment for ciprofloxacin, 17 α -ethinylestradiol and 5-fluorouracil

Związek	PNEC, mg/l	PEC (MEC) w wodach powierzchniowych, mg/l	RQ (PEC/PNEC)	Ocena ryzyka
Cyprofloksacyna	0,00025	0,00003 (MEC USA) [Sanderson i in. 2003]	0,012	małe ryzyko
		0,00006 (MEC Niemcy) [Kümmerer i in. 2000]	0,24	małe ryzyko
		0,00067 (PEC*) [Halling-Sørensen i in. 2000]	2,68	duże ryzyko
17 α -etynyloestradol	0,00025	0,000043 (MEC UE) [Sanderson i in. 2003]	0,17	małe ryzyko
		0,000831 (MEC USA) [Sanderson i in. 2003]	3,32	duże ryzyko
5-fluorouracyl	0,0005	0,000005 (PEC*) [Straub 2009]	0,01	małe ryzyko
		0,00000064 (PEC**) [Straub 2009]	0,001	małe ryzyko

Objaśnienia:

* PEC obliczony według wytycznych EMEA – z uwzględnieniem jedynie dziennego użycia, bez uwzględnienia biodegradacji i metabolizmu.

**PEC obliczony według wytycznych EMEA – z uwzględnieniem wskaźnika penetracji rynku *Fpen.*, bez biodegradacji i metabolizmu.

Przeprowadzona ocena ryzyka wywołanego obecnością badanych farmaceutyków w stosunku do cyanobakterii i roślin wodnych na podstawie współczynników PEC/PNEC

(tab. 4) wskazała na duże ryzyko związane z obecnością 17 α -etynyloestradiolu w stężeniach wykrywanych w wodach powierzchniowych w USA oraz cyprofloksacyny, kiedy PEC zostało obliczone na podstawie wytycznych EMEA z roku 2006 (uwzględniając jedynie codzienne użycie, bez uwzględnienia biodegradacji i metabolizmu). W pozostałych przypadkach ryzyko określono jako niewielkie. Ocena zagrożenia dokonana przez Robinson i in. [2005], przeprowadzona dla *Microcystis aeruginosa*, *Raphidocelis subcapitata* i *Lemna minor* na podstawie współczynnika zagrożenia HQ (ang. *Hazard Quotient*), wskazała na małe zagrożenie tych organizmów ze strony cyprofloksacyny w stężeniu w środowisku 1 $\mu\text{g/l}$ [Robinson i in. 2005].

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Niniejsze badania oraz dane z piśmiennictwa wykazały, że obecność środków leczniczych w ekosystemach wodnych może negatywnie wpływać na ogniwo producentów w ekosystemach wodnych i w konsekwencji prowadzić do zmian bioróżnorodności. Istnieje więc konieczność stałego monitoringu tych zanieczyszczeń, a także rozwoju metod analitycznych i modelowania w celu dokładnego określania narażenia oraz badań chronicznych efektów działania tych związków, również na poziomie molekularnym.

Przeprowadzone badania ekotoksyczności cyprofloksacyny, 17 α -etynyloestradiolu i 5-fluorouracylu pozwoliły na sformułowanie następujących wniosków:

- 1) wszystkie farmaceutyki ograniczały wzrost cyjanobakterii, zielenic i roślin wyższych;
- 2) według kryteriów Unii Europejskiej cyprofloksacyna była ekstremalnie toksyczna dla *Microcystis aeruginosa*, bardzo toksyczna dla *Lemna minor* i toksyczna dla trzech gatunków zielenic; 17 α -etynyloestradiol był bardzo toksyczny dla wszystkich gatunków zielenic i toksyczny dla pozostałych organizmów; 5-fluorouracyl był bardzo toksyczny dla *Lemna minor* i *Raphidocelis subcapitata*, toksyczny dla *Microcystis aeruginosa* i szkodliwy dla *Desmodesmus quadricauda* i *Scenedesmus obliquus*;
- 3) obliczone stężenia niewywołujące negatywnych skutków w środowisku (PNEC) badanych farmaceutyków w odniesieniu do producentów w ekosystemach wodnych wynosiły dla cyprofloksacyny i 17 α -etynyloestradiolu – 0,00025 mg/l, natomiast dla 5-fluorouracylu – 0,0005 mg/l;
- 4) ocena ryzyka wywołanego obecnością badanych farmaceutyków w stosunku do sinic i roślin wodnych na podstawie współczynników PEC/PNEC wskazała na duże ryzyko związane z obecnością 17 α -etynyloestradiolu w stężeniach wykrywanych w wodach powierzchniowych w USA oraz cyprofloksacyny, kiedy PEC zostało obliczone na podstawie wytycznych EMEA.

Praca naukowa finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2009–2012, jako projekt badawczy nr N N523 422537.

PIŚMIENNICTWO I AKTY PRAWNE

- BERTHOUEX P.M., BROWN L.C. 1994. *Statistic for environmental engineers*. Lewis Publishers, C.R.C. Press Inc.
- BIELIŃSKA M., NAŁĘCZ-JAWECKI G. 2009. Zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego lekami. I: Ocena toksyczności trzech fluorochinolonów dla rzęsy drobnej *Lemna minor*. Biuletyn Wydziału Farmacji WUM 4: 24–30.
- BRAIN R.A., JOHNSON D.J., RICHARDS S.M., SANDERSON H., SIBLEY P.K., SOLUMON K.R. 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 371–382.
- CLEUVERS M. 2002. Aquatische ökotoxikologie von Arzneimitteln; Algentest und akuter Daphnientest. *UWSF Z Umweltchem Okotox* 14: 85–89.
- 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.**
- CRANE M., WATTS C., BOUCARD T. 2006. Chronic aquatic environmental risks for exposure to human pharmaceuticals. *Science of the Total Environment* 367: 23–41.
- European Medicines Agency (EMA). 1998. Note for Guidance: Environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products, EMA, London.**
- European Medicines Agency (EMA). 2006. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use, EMA, London.**
- HALLING-SØRENSEN B., HOLTEN LÜTZHØFT H.C., ANDERSEN H.R., INGERSLEV F. 2000. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 53–58.
- HALLING-SØRENSEN B., NORS NIELSEN S., LANZKY P.F., INGERSLEV F., HOLTEN LÜTZHØFT H.C., JØRGENSEN S.E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* 36: 357–393.
- HARTMANN A., ALDER A.C., KOLLER T., WIDMER R.M. 1998. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17: 377–382.
- HARTMANN A., GOLET E.M., GARTISER S., ALDER A.C., KOLLER T., WIDMER R.M. 1999. Primary DNA damage but not mutagenicity correlates with ciprofloxacin concentrations in German hospital wastewaters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36: 115–119.
- KÜMMERER K., AL-AHMAD A., BETRAM B., WIESSLER M. 2000. Biodegradability of anti-neoplastic compounds in screening tests: Influence of glucosidation and of stereochemistry. *Chemosphere* 40: 767–773.

- KÜMMERER K., AL-AHMAD A., MERSCH-SUNDERMANN V. 2000. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test, *Chemosphere* 40: 701–710.
- MCFADDEN G.I., ROOS D.S. 1999. Apicomplexan plastids as drug targets. *Trends in Microbiology* 7: 328–333.
- MOHAN B.S., HOSETTI B.B. 1999. Aquatic plants for toxicity assessment. *Environmental Research Section A* 81: 259–274.
- NASH J.P., KIME D.E., VAN DER VEN L.T., WESTER P.W., BRION F., MAACK G., STAHL-SCHMIDT-ALLNER P., TYLER C.R. 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives* 112: 1725–1733.
- NIKOLAOU A., MERIC S., FATTA D. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 1225–1234.
- PN-EN ISO 20079. 2004. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test. International Organisation for Standardisation.**
- PN-EN ISO 8692. 1993. Water Quality – Algal Growth Inhibition Test. International Organisation for Standardisation.**
- ROBINSON A.A., BELDEN J.B., LYDY M.J. 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 423–430.
- SANDERSON H., JOHNSON D.J., WILSON C.J., BRAIN R.A., SOLOMON K.R. 2003. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and alga by ECOSAR screening. *Toxicology Letters* 144: 383–395.
- STRAUB J.O. 2009. Combined environmental risk assessment for 5-fluorouracil and capecitabine in Europe, *Integrated Environmental Assessment and Management* 6: 540–566.
- Technical Support Document for Water Quality – based Toxics Control. 1991. US Environmental Protection Agency – Office of Water (EN-336) EPA/505/2-90-001 PB 91-127415.**
- WEBER E. 1972. *Grundriss der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler, Landwirte und Mediziner*. Veb Fischer Verlag, Jena.
- YANG L., YING G., SU H., STRAUBER J.L., ADAMS M.S., BINET M.T. 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1201–1208.
- ZAUNKOVÁ R., ODRASKA P., DOLEZALOVA L., HILSCHEROVA K., MARSALEK B., BLAHA L. 2007. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 2208–2214.