POLITECHNIKA POZNAŃSKA
Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska
INSTYTUT INŻYNIERII ŚRODOWISKA
Zakład Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska

mgr inż. Anna ZAJĄC

Skuteczność usuwania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych ze ścieków metodą osadu czynnego

Rozprawa doktorska

PROMOTOR: dr hab. inż. Zbysław Dymaczewski

PROMOTOR POMOCNICZY: dr inż. Izabela Kruszelnicka

Poznań, 2017r.

Serdecznie dziękuję Panu Promotorowi
dr hab.inż. Zbysławowi Dymaczewskiemu
za życzliwość i opiekę nad przebiegiem pracy doktorskiej.

Wielkie podziękowania i wyrazy wdzięczności
kieruję do Pani dr inż. Izabeli Kruszelnickiej,
za pełnienie nie tylko roli Promotora Pomocniczego,
ale przede wszystkim za ogromne wsparcie podczas
całego okresu doktoratu i pomoc w trudnych chwilach.

Wyrazy wdzięczności, za pomoc w realizacji badań
chromatograficznych, życzliwość, dobre słowo oraz
wsparcie merytoryczne składam
Pani dr inż. Joannie Zembrzuskiej.

Za wsparcie merytoryczne i pomoc w wykonaniu
analizy mikrobiologicznej serdecznie dziękuję
Panu dr Michałowi Michałkiewiczowi.

Seredeczne podziękowania składam
Panu dr inż. Wojciechowi Górze
za pomoc w realizacji układu badawczego oraz wsparcie
merytoryczne podczas realizacji prac badawczych.

Ogromne podziękowania kieruję do moich Rodziców,
Siostry i Roberta za wiarę w pokonanie wszelkich
trudności, motywację do działania oraz wyrozumiałość
i wsparcie w każdym momencie. Dziękuję, że jesteście.

Pragnę również podziękować wszystkim osobom,
które były dla mnie wsparciem w trakcie powstawania
pracy doktorskiej.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE 5
ABSTRACT 7
Spis oznaczeń 9
1. Wstęp 11
2. Przegląd literatury 13
2.1. Wprowadzenie 13
2.2. Rynek farmaceutyczny w Polsce i na świecie 14
2.2.1. Farmaceutyki 14
2.2.2. Obszary zastosowania i dystrybucji farmaceutyków 14
2.2.3. Grupy i rodzaje leków 16
2.2.4. Wielkość produkcji i konsumpcji leków 17
2.3. Farmaceutyki w środowisku wodnym 20
2.3.1. Sposoby przedostawania się do środowiska 20
2.3.2. Występowanie w środowisku i wpływ na żywe organizmy 21
2.4. Obecność farmaceutyków w oczyszczalniach ścieków 28
2.4.1. Droga farmaceutyków do oczyszczalni ścieków 28
2.4.2. Stopień redukcji 29
2.5. Diklofenak i ibuprofen 33
2.5.1. Znaczenie leków 33
2.5.2. Zastosowanie, budowa, właściwości, szlaki metaboliczne diklofenaku 33
2.5.3. Zastosowanie, budowa, właściwości, szlaki metaboliczne ibuprofenu 37
2.6. Biologiczne metody usuwania zanieczyszczeń farmaceutycznych ze ścieków pochodzących z zakładów przemysłowych 39
2.6.1. Charakterystyka zakładów farmaceutycznych 39
2.6.2. Sposoby i skuteczność usuwania zanieczyszczeń farmaceutycznych ze ścieków 42
2.6.3. Wpływ farmaceutyków na skład i strukturę osadu czynnego 49
2.7. Regulacje prawne w zakresie substancji farmaceutycznych w środowisku 51
2.7.1. Regulacje prawne w Polsce 51
2.7.2. Regulacje prawne w Europie 56
2.7.3. Regulacje prawne na świecie 60
2.8. Metody analityczne oznaczenia substancji farmaceutycznych w próbkach środowiskowych 63
2.9. Podsumowanie - wnioski wynikające z przeglądu literatury 66
3. Tezy i zadania badawcze pracy 68
3.1. Problem badawczy 68
3.2. Tezy pracy 69
3.3. Zadania badawcze 70

4. Opis i metodyka przeprowadzonych badań ... 73
4.1. Opis ogólny wykonanych badań ... 73
4.2. Badania terenowe ... 76
4.2.1. Określenie obecności wybranych NLPZ w rzece Warcie w odcinku miasta Poznania i Lubonia w latach 2012-2014 ... 76
4.2.2. Określenie zawartości wybranych leków z grupy NLPZ na poszczególnych odcinkach Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach ... 78
4.2.3. Określenie źródeł zanieczyszczeń farmaceutycznych pochodzących z wybranych zakładów farmaceutycznych w obszarze powiatu poznańskiego ... 80
4.3. Określenie zawartości ibuprofenu w teście statycznym ... 81
4.3.1. Określenie szybkości degradacji ibuprofenu w funkcji czasu ... 81
4.3.2. Określenie szybkości rozkładu ibuprofenu w zależności od wartości temperatury ... 83
4.4. Określenie zawartości diklofenaku w układzie dynamicznym ... 86
5. Wyniki badań i ich omówienie ... 98
5.1. Określenie stężeń wybranych leków z grupy NLPZ ... 98
5.1.1. Obecność wybranych niesteroidowych leków przeciwbólowych w rzece Warcie w odcinku miasta Poznania i Lubonia w latach 2012 – 2014 ... 98
5.1.2. Przebieg degradacji wybranych leków przeciwbólowych w Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach ... 111
5.1.3. Źródła zanieczyszczeń farmaceutycznych pochodzących z wybranych zakładów farmaceutycznych w obszarze powiatu poznańskiego ... 115
5.2. Degradacja ibuprofenu w teście statycznym ... 119
5.2.1. Analiza rozkładu ibuprofenu w czasie przy założonym stężeniu leku ... 119
5.2.2. Analiza rozkładu ibuprofenu w czasie dla zmiennych wartości temperatury otoczenia ... 121
5.3. Degradacja diklofenaku w układzie dynamicznym ... 124
5.3.1. Degradacja w warunkach tlenowych (badania wstępne) ... 124
5.3.2. Degradacja w warunkach tlenowych przy zmiennych parametrach fizyko-chemicznych (pH, stężeniu leku, stopniu natlenienia) ... 129
5.3.3. Adsorpcja diklofenaku na kłaczkach osadu czynnego ... 165
6. Podsumowanie i wnioski ... 167
BIBLIOGRAFIA ... 173
SPIS TABEL ... 186
SPIS RYSUNKÓW ... 187

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono wyniki badań terenowych potwierdzających obecność wybranych związków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) w środowisku wodnym w wybranych punktach ciągu technologicznego Centralnej Oczyszczalni Ścieków (COŚ) w Koziegłowach oraz w ściekach poprodukcyjnych z zakładów farmaceutycznych zlokalizowanych w obszarze powiatu poznańskiego. Uzyskane wyniki pozwoliły na zaplanowanie i wykonanie dalszych badań w skali laboratoryjnej dla dwóch wybranych leków z grupy NLPZ – testów statycznych dla ibuprofenu i testu dynamicznego diklofenaku.

Pierwszy etap badań terenowych zakładał sprawdzenie występowania oraz zmian rozkładu stężeń wybranych leków (fenoprofenu, ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu, paracetamolu i tolmetinu) w rzece Warcie, w obszarze miasta Poznania. Pobór próbek do analiz odbywał się na trzech wyznaczonych odcinkach rzeki Warty: w mieście Luboń, w punkcie wodowskazowym przy Moście Św. Rocha oraz na wysokości COŚ w Koziegłowach. Drugi etap badań pozwolił oszacować rodzaje i stężenia wskazanych powyżej leków na czterech odcinkach COŚ w Koziegłowach. Punkty poboru obejmowały przepompownię ścieków, komorę denitryfikacji, komorę nitryfikacji oraz odcinek odprowadzenia ścieków oczyszczonych do rzeki Warty. Ostatni etap badań terenowych dotyczył analizy zawartości wybranych leków występujących w ściekach poprodukcyjnych z sześciu zakładów farmaceutycznych znajdujących się w powiecie poznańskim, odprowadzanych do miejskiej sieci kanalizacyjnej aglomeracji poznańskiej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w okresie badawczym, przypadającym w czasie wzmożonej zapadalności na grypę stężenia analizowanych leków osiągały wyższe wartości w punktach oddalonych o 9 i 16 km od miejsca zrzutu ścieków oczyszczonych do odbiornika – do rzeki Warty.

Analizy występowania leków w rzece Warcie oraz ich zdolności do rozkładu w COŚ w Koziegłowach, przeprowadzone w warunkach rzeczywistych, pozwoliły na zaprojektowanie stanowiska badawczego w skali laboratoryjnej. Zakres wykonanych badań obejmował przeprowadzenie testów statycznych dla ibuprofenu oraz testu dynamicznego dla diklofenaku, których celem było sprawdzenie zdolności do rozkładu przez mikroorganizmy osadu czynnego obu związków, przy zmiennych parametrach pracy układu.

Na podstawie przeprowadzonego przeglądu literatury oraz uzyskanych wyników badań, wyselekcjonowano ibuprofen, jako najbardziej popularny oraz najczęściej występujący w preparatach farmaceutycznych związek z grupy leków NLPZ, dostępnych bez recepty. Ze względu na dużą popularność i częstość występowania w środowisku wodnym oraz w ściekach dopływających do oczyszczalni ścieków na całym świecie, substancja ta została wytypowana do początkowych badań poglądowych. W ich ramach wykonano dwa testy statyczne przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych. Pierwszy test obejmował określenie szybkości ibuprofenu za pomocą mikroorganizmów osadu czynnego. Badanie było realizowane w dwóch seriach badawczych, w marcu 2011r. (I seria) oraz w kwietniu 2011r. (II seria). Wyniki badań z kwietnia wskazały na ponad 99% degradację tego związku w 3 dobie trwania testu. W 2016r. natomiast, przeprowadzono testy statyczne,

określające skuteczność rozkładu ibuprofenu, dla trzech wartości temperatury tj. 8, 18 i 28^{o}C. Testy te potwierdziły, że dla najwyższej temperatury 28^{o}C usuwanie leku w zadanym czasie 1 doby osiągnęło najwyższą skuteczność na poziomie ok 65%. W teście przyjęto także, że jedynym źródłem węgla dla osadu czynnego jest ibuprofen, który został zadozowany jednorazowo, w stężeniu 10 mg/L. Spadek wartości ChZT w miarę upływu czasu trwania testu, potwierdził, że mikroorganizmy są zdolne do wykorzystania źródła węgla zawartego w ibuprofenie do podtrzymania swoich funkcji życiowych i rozmnażania. Stąd można sądzić, że redukcja ibuprofenu nastąpiła głównie na skutek biodegradacji.

W bazach publikacji naukowych, istnieje wiele prac opisujących właściwości oraz podatność na rozkład biologiczny ibuprofenu, natomiast stosunkowo mało prac dotyczy trudno rozkładalnego leku z grupy NLPZ – diklofenaku. Dlatego też do badań w układzie dynamicznym wybrano ten związek. Celem badań było sprawdzenie, czy zmiana parametrów fizykochemicznych (tj. pH, stężenia tlenu czy zawartości węgla w pożywce syntetycznej) w układzie badawczym z osadem czynnym może wpłynąć na poprawę skuteczności usuwania diklofenaku. Badania przeprowadzono w układzie dynamicznym, składającym się z dwóch reaktorów typu SBR o pojemności czynnej 50 L każdy, pracujących przez okres 150 dni. Eksperyment poprowadzono w dwóch etapach. Pierwszy z nich, trwający 61 dni obejmował wpracowanie osadu czynnego, polegające na ustabilizowaniu pracy w obu reaktorach oznaczonych jako R1 i R2. Od 62 do ostatniego, 150 dnia prowadzono badania właściwe, obejmujące dozowanie diklofenaku do reaktora R2, w trzech ustalonych stężeniach 1,5 i 10 mg/L. Okres dozowania leku podzielono na 6 cykli badawczych po 12 dni. Po zakończeniu każdego cyklu następowała czterodniowa przerwa, mająca przygotować układ do kolejnej serii badań. Badania wykonane w cyklach od I do IV były przeprowadzone dla różnych wartości odczynu pH. Pierwszy cykl przebiegał na poziomie pH w granicach 7,0-7,5, ustabilizowanym przez mikroorganizmy osadu czynnego na etapie wpracowania. W cyklach II, III oraz IV, odczyn pH został poddany korekcie do wartości kolejno 7,5, 6,5 oraz 6,0. W cyklu V, pH pozostało na poziomie ustalonym w wyniku przemian zachodzących w układzie (około 7,0), natomiast zmniejszono ilość węgla w pożywce syntetycznej, aby udowodnić tezę, że w przypadku braku odpowieniej ilości związków biogennych pochodzących ze ścieków, mikroorganizmy są w stanie wykorzystać węgiel i inne pierwiastki biogenne znajdujące się w strukturze diklofenaku. W ostatnim, VI cyklu badań, sprawdzono skuteczność usuwania diklofenaku za pomocą osadu czynnego przy obniżonym do 1 mg/L stężeniu tlenu w obu reatorach. Uzyskane wyniki wskazały, że stopień redukcji diklofenaku zależy od odczynu pH. Najwyższą redukcję leku, około 95%, osiągnięto w cylku I, podczas dozowania do układu diklofenaku w stężeniu 1,0 mg/L, a najniższy w cyklu II, przy odczynie pH=7,5 oraz cyklu V (w warunkach naturalnego pH oraz obniżonej zawartości węgla w pożywce syntetycznej). Mimo zmian parametrów fizykochemicznych w układzie z osadem czynnym, nie uzyskano całkowitej redukcji diklofenaku. Ponadto długotrwała obecność substancji toksycznej w układzie badawczym spowodowała, że fosfor ogólny oraz azot nie były usuwane w sposób właściwy a ich zawartość w ściekach oczyszczonych osiągała stężenia znacznie przekraczające dopuszczalne wartości tych pierwiastów w ściekach oczyszczonych.

ABSTRACT

The paper presents the results of field studies confirming the presence of selected compounds from the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the aquatic environment in selected points of the technological process of the Central Wastewater Treatment Plant in Kozieglowy and in post-production wastewater from pharmaceutical plants located in the area of the Poznan district. The obtained results allowed tp plan and implementation of further laboratory-scale studies for two selected NSAIDs in static tests for ibuprofen and in dynamic test for diclofenac.

First stage of field research examined the occurrence and distribution of concentrations of selected drugs (fenoprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, paracetamol and tolmetin) in the Warta river, in the area of the city Poznan. Sampling for analysis was carried out on three designated sections of the Warta river: in the Lubon city, at the watermark point at St. Roch Bridge. and at the height of WWTP in Kozieglowy. The second stage of the study allowed to estimate the types and concentrations of the above mentioned drugs on four sections of WWTP in Kozieglowy. The collection points included: the sewage pumping stations, denitrification chamber, nitrification chamber and drainage section of the sewage purified to the Warta river. The last stage of field research was the analysis of the content of selected medical products present in the post-production wastewater from six pharmaceutical plants located in the Poznan district, transported to the urban sewage network of the Poznan agglomeration. Based on the results obtained, noted during the research period, the concentration of the analyzed drugs increased by 9 and 16 km from the point of discharge of purified waste water to the receiver – Warta river.

Analysis of drug occurrence in the Warta river and their ability to decompose in WWTP in Kozieglowy, carried out under real conditions. They allowed to design a test stand on a laboratory scale. The scope of performed tests included stastic testing for ibuprofen and dynamic test for diclofenac. The aim of the study was to examine the ability of microorganisms to decompose by activated sludge of both compounds with variable operating parameters of the system.

Based on a review of the literature, ibuprofen was selected as the most popular and most commonly used non-prescription NSAIDs in pharmaceutical preparations. Due to the high popularity and frequency in the aquatic environment and in sewage entering the sewage sewage treatment plants worldwide, this substance was selected for initial screening tests. Within them, two static tests were carried out in laboratory conditions. The first test included the determination of the rate of ibuprofen decomposition with activated sludge microorganisms as a function of time. The study was conducted in two research series, in March in 2011 (1st series) and in April in 2011 (2nd series). The April study found more than 99% degradation of this compound in the 3 rd time of the test. In 2016, static tests were performed to determine the efficacy of ibuprofen degradation, depending on three variable temperature values: 8, 18 and 28°C. These tests confirmed that for the highest temperature of 28°C, removal of the drug at a preset time of 1 day achieved the highest efficacy of approximately 65%. The test also assumes that the only source of carbon for activated sludge was ibuprofen, which has been dosed once

at a concentration of 10 mg/L. Decrease of COD values over the duration of the test confirmed that microorganisms are capable of using the carbon source contained in ibuprofen to maintenance of their vital functions and reproduction. Thus, ibuprofen reduction is mainly due to biodegradation.

There are a number of papers describing the properties and susceptibility to ibuprofen biodegradation, however relatively little work is related to the difficult to decompose NSAIDs - diclofenac. Therefore, in the dynamic system, this relationship was chosen. The aim of the study was to investigate the change in physicochemical parameters (i.e., pH, oxygen concentration or carbon content in synthetic medium) in the activated sludge system could improve the removal efficiency of diclofenac. The tests were carried out in a dynamic system composed of two 50 L reactors each operating for a period of 150 days. The experiment was conducted in two stages. The first, lasting 61 days, involved the operation of activated sludge, which consisted of stabilizing the work in both reactors designated R1 and R2. From the 62 to the last 150 days, appropriate studies were conducted including the dosage of diclofenac to the R2 reactor at three fixed concentrations of 1.5 and 10 mg/L. The dosing interval was divided into 6 test cycles of 12 days. At the end of each cycle there was a four-day break to prepare the system for the next series of tests. Studies in cycles I to IV were carried out for different pH values. The first cycle was at the pH level of 7.0-7.5, stabilized by active microorganisms at the working stage. In cycles II, III and IV, the pH value was adjusted to 7.5, 6.5 and 6.0 respectively. In cycle V, the pH remained at a level determined by the changes taking place in the system (about 7.0), while the amount of carbon in the synthetic medium was reduced to prove that in the absence of a sufficient amount of biogenic compounds from the wastewater, the microorganisms were able use carbon and other biogenic elements in the structure of diclofenac. In the last, sixth cycle of study, the effectiveness of diclofenac removal with activated sludge was checked at a reduced oxygen concentration of 1 mg/L in both rectors. The results showed that the degree of reduction of diclofenac depends on the pH. The highest drug reduction, approximately 95% was achieved in cycle I during dosing to the system 1.0 mg/L. The lowest concentration obtained in cycle II at pH 7.5 and in cycle V (under natural pH and reduced carbon content in synthetic medium). Despite the changes in physico-chemical parameters in the activated sludge system, total reduction of diclofenac was not achieved. Moreover, the long-term presence of toxic substances in the test system caused that general phosphorus and nitrogen were not properly disposed and their content in purified effluents reached concentrations significantly above the permissible values of these elements in purified effluents.

Spis oznaczeń

AMBERLITE XAD4 – rodzaj żywicy jonowymiennej

AOB – (z ang. *Ammonium Oxidizing Bacteria)* –bakterie utleniające amoniak

BZT – biochemiczne zapotrzebowanie tlenu

ChZT – chemiczne zapotrzebowanie tlenu

COŚ – Centralna Oczyszczalnia Ścieków

DLC/DCF – diklofenak

DEET – *Diethyltoluamidum* – substancja przeciwko komarom

EC$_x$ – (z ang. *Effect Concentration*) – stężenie efektywne powodujące powstanie określonych zmian fizjologicznych w organizmach testowych, wyrażone w %,

EE2 – Etynyloestradiol – estrogen syntetyczny

EGMA – (z ang. *European Generic Medicines Association*) - Europejskie Stowarzyszenie Producentów Leków Generycznych

EPS – (z ang. *extracellular polymecic substances*) – pozakomórkowe substancje polimeryczne

FDA – (z ang. *Food and Drug Administration*) – Agencja Leków i Żywności

SRT – (z ang. *solid retention time*) – czas retencji osadu, wiek osadu

GAC – (z ang. *Granular Activated Carbon*) – granulowany węgiel aktywny

GUS – Główny Urząd Statystyczny

HO* – rodniki hydroksylowe

HPLC – (z ang. *high-performance liquid chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HRT – (z ang. *solid retention time)* – czas przepływu ścieków

IBU – ibuprofen

LC$_x$ (z ang. *Lethal Concentration*) – stężenie analizowanej substancji, której odpowiada x% liczby organizmów

LOAEL (z *ang. Lowest Observed Adverse Effect Level*) – najniższa dawka lub stężenie substancji, przy której w trakcie przeprowadzonych badań zauważa się szkodliwą zmianę

MBBR – (z ang. *Moving Bed Biofilm Reactor*) – reactor ze złożem zawieszonym (ruchomym)

MBR – (z ang. *Membrane Bioreaktor*) – bioreaktor membranowy

MCM-41 – mezoporowate krzemiany z dodatkiem niklu

NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

N-NH$_4$ – azot amonowy

N-NO$_2$ – azot azotynowy (III)

N-NO$_3$ – azot azotanowy (V)

NOEL lub **NOEC** (z ang. *No Observed Effect Level/Concentretion*)– stężenie substancji toksycznej, przy którym nie obserwuje się niekorzystnego efektu jej działania

NPX – naproksen

NSAIDs – (z ang. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*) – niesteroidowe leki przeciwzapalne

OWO – ogólny węgiel organiczny

PAC – (z ang. *Powdered Activated Carbon*) – sproszkowany węgiel aktywowany

PEC – (z ang. *Predicted Environmantal Concentration*) – prognozowane wystąpienie stężenia substancji w środowisku

PhACs – (z ang. *Pharmaceutically Active Compounds*) –związki farmakologicznie aktywne

pKa – stała dysocjacji

PNEC – (z ang. *Predicted No Effect Concentration*) – przewidywane stężenie nie wywołujące zmian w środowisku

Pog – fosfor ogólny

PPCPs – (z ang. *Pharmaceutical and Personal Care Products*) – farmaceutyki i środki ochrony osobistej

P-PO4 – ortofosforany

RNA – (z ang. *ribonucleic acid*) – kwasy rybonukleinowe

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

IMS – (z ang. Intercontinental Marketing Services)

SBR – (z ang. *Sequencing Batch Reaktor*) - Biologiczny Reaktor Sekwencyjny

SnO2 – di tlenek cyny

TM 7 –bakretia *Candidatus Saccharibacteria*

TN / Nog – (z ang. Total Nitrogen) / azot ogólny

Norg – azot organiczny

TU (z ang. *Toxic Unit*) – jednostka toksyczności

WPC – kompozyty polimerowo-drzewne

1. Wstęp

W obecnych czasach poważnym zagrożeniem dla ekosystemów wodnych są związki, które mimo bardzo niskiego progu stężenia, niekiedy na granicy czułości urządzeń analitycznych, wykazują duże właściwości toksyczne. W literaturze anglojęzycznej związki te zostały określone zwrotem *emerging contaminants* (skrót *EC*) – definiowane, jako nowo powstające zanieczyszczenia lub *contaminants of emerging concern* – zanieczyszczenia budzące niepokój w odniesieniu do zmian środowiskowych. Analiza obecności tego rodzaju mikrozanieczyszczeń w ekosystemach wodnych i lądowych rozpoczęła się w latach 90-tych [Luo Y. i in. 2014]. Uzyskane niepokojące wyniki badań, wskazujące na ich niekontrolowane rozprzestrzenianie się w środowisku, stały się ogólnoświatowym wezwaniem do podjęcia walki z tym problemem. Do związków EC należą substancje pochodzenia przede wszystkim antropogenicznego, m.in. środki i preparaty higieniczne, kosmetyki, hormony sterydowe, związki chemiczne pochodzące z przemysłu, jak i pestycydy. Wśród tej grupy zanieczyszczeń, w sposób istotny z punku widzenia zmian środowiskowych wywołanych działaniem toksycznym, wyłoniła się grupa substancji farmaceutycznych. Największy ładunek tego typu zanieczyszczeń pochodzi ze szpitali, gospodarstw domowych, ośrodków weterynaryjnych czy też gospodarstw hodowlanych, gdzie do pasz dodawane są głównie antybiotyki. Przyjmowane leki wydalane są, jako metabolity, a tylko niewielki procent stanowią substancje czynne w niezmienionej postaci. Część leków przeterminowanych jest wyrzucana do toalet lub umywalek, skąd wraz ze ściekami komunalnymi kierowane są do oczyszczalni ścieków. Badania przeprowadzone przez ośrodki naukowe z różnych części świata wskazują, że konwencjonalne metody oczyszczania za pomocą osadu czynnego, przeznaczone głównie do usuwania ścieków bytowo-gospodarczych nie redukują całkowicie substancji farmaceutycznych. Dlatego też ścieki oczyszczone, transportowane do odbiorników zawierają w sobie pozostałości produktów lekowych i ich metabolitów. Odbiornikami ścieków są najczęściej wody powierzchniowe, które w większości stanowią źródło wody pitnej.

Znaczącym źródłem zanieczyszczeń aktywnych terapeutycznie postaci leków są koncerny i zakłady wytwarzające produkty farmaceutyczne. Ścieki poprodukcyjne często są odprowadzane bezpośrednio do odbiornika lub wprowadzane do miejskiej sieci kanalizacyjnej, bez wcześniejszego sprawdzenia zawartych w nich pozostałości wytwarzanych leków. Ze względu na fakt, że wzmożone badania w zakresie obecności farmaceutyków i ich wpływu na środowisko prowadzone są od około 10 lat, nie są aktualnie znane i możliwe do przewidzenia długoterminowe konsekwencje związane z kumulacją farmaceutyków w środowisku wodnym (odprowadzanie ścieków) i glebowym (wykorzystanie przyrodnicze

osadów ściekowych). Literatura naukowa [Fent K. i in., 2006, Martín J. i in., 2012, Ashfaq M. i in., 2017] dostarcza jednak wielu argumentów potwierdzających ich szkodliwy wpływ na organizmy żywe.

Na polskim rynku w 2011r. ścieki farmaceutyczne, generowało 274 producentów, których znaczna większość to małe i bardzo małe zakłady wytwórcze i przetwórcze. Stwierdzono także obecność 10 zakładów wytwarzających leki syntetyczne oraz 10 zakładów produkujących leki w oparciu o substancje naturalne [Kot-Wasik i in., 2003]. W 2011r. natomiast zanotowano około 450 firm farmaceutycznych oraz prawie 13 tys. aptek i punktów aptecznych [Stefańczyk M., 2011]. Obecnie obowiązujące przepisy prawne nie uwzględniają dopuszczalnych, bezpiecznych limitów dawek, jakim powinny odpowiadać ścieki poprodukcyjne z zakładów farmaceutycznych, zawierające w swoim składzie różne rodzaje i postaci leków. Podobnie sytuacja przedstawia się w odniesieniu do ścieków oczyszczonych, odprowadzcanych do odbiorników wodnych. Pomimo udowodnionego, negatywnego oddziaływania na środowisko tych substancji, nie ma konieczności stosowania technologii zwiększających ich redukcję. Problem ten stał się inspiracją do wyboru tematyki badawczej niniejszej rozprawy doktorskiej.

2. Przegląd literatury

2.1. Wprowadzenie

Praca doktorska została poświęcona tematyce poruszającej problem usuwania wybranych leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) transportowanych do miejskich oczyszczalni ścieków, pochodzących z zakładów farmaceutycznych oraz ich wpływu na jakość ścieków oczyszczonych, odprowadzanych do odbiornika wody. Przeprowadzone badania pozwoliły określić, czy odprowadzone do kanalizacji miejskiej ścieki, pochodzące z zakładów zawierających wysoki ładunek zanieczyszczeń oraz czy długotrwała obecność leków zaburza zdolność mikroorganizmów osadu czynnego do rozkładu zawartych w nich związków. Brak danych dotyczących dobowego zrzutu ścieków przez zakłady farmaceutyczne nie pozwala w sposób jednoznaczny oszacować wielkości oraz przypuszczalnych stężeń leków odprowadzanych do kanalizacji miejskiej lub bezpośrednio do odbiornika. Obecne prawo nie nakłada również obowiązku monitorowania ilości związków farmaceutycznych w odprowadzanych ściekach poprodukcyjnych. W konsekwencji, są one transportowane do kanalizacji miejskiej lub odprowadzane bezpośrednio do odbiorników wodnych, z zachowaniem dopuszczalnych dla tego rodzaju ścieków wartości odczynu pH oraz stężenia tłuszczów. Rosnąca w szybkim tempie konsumpcja leków napędza masową produkcję tych substancji. Mechanizm ten eskaluje niepokój związany z przedostawaniem się do środowiska wodnego leków zarówno w postaci wyjściowej substancji czynnej, jak i ich przetworzonych form – metabolitów. Luka prawna, związana z brakiem określenia bezpiecznych dla środowiska naturalnego wartości substancji farmaceutycznych, wprowadzanych do kanalizacji miejskiej lub odprowadzanych do odbiorników wodnych, powoduje, że temat tego rodzaju mikrozanieczyszczeń jest generalnie marginalizowany przez decydentów. Brak przepisów nakładających obowiązek redukcji produktów farmaceutycznych odprowadzanych z zakładów produkujących różne rodzaje leków, powoduje niekontrolowany wzrost ładunku tych zanieczyszczeń w środowisku.

2.2. Rynek farmaceutyczny w Polsce i na świecie

2.2.1. Farmaceutyki

Farmaceutyki to produkty lecznicze o szerokim zakresie zastosowań. Głównym ich przeznaczeniem jest działanie terapeutyczne, prowadzące do zniwelowania zarówno drobnych uciążliwości jak również bardzo skomplikowanych rodzajów chorób i towarzyszących im objawów. Współcześnie, rozwój rynku farmaceutycznego wyspecjalizował się w projektowaniu i produkcji leków będących antidotum znacznej większości rodzajów chorób czy dolegliwości, z jakimi obecnie zmaga się medycyna. Pośpiech, długotrwały stres, napięcie towarzyszące nam w różnych sytuacjach dnia codziennego osłabia naszą odporność i naturalną ochronę przed czynnikami chorobowymi. Często aktywny tryb życia, do jakiego zmusza nas ukształtowany profil współczesnego świata, nie pozwala na odpoczynek i powolny proces prowadzący do regeneracji sił. Coraz więcej ludzi szuka substytutów działających niemalże natychmiastowo, przynosząc w krótkim okresie czasu pożądane efekty terapeutyczne. Apteki oraz obiekty poza apteczne oferują szeroką gamę substancji farmaceutycznych, pośród których każdy jest w stanie znaleźć odpowiedni rodzaj leku, na dany rodzaj odczuwanego dyskomfortu. Ciągły rozwój cywilizacji i aktywny tryb życia sprawia, że społeczeństwo zmaga się z wieloma dolegliwościami wywołanymi stresem i pośpiechem w sprostaniu stawianym obowiązkom. Wzrost zachorowań sprawia, że rośnie zapotrzebowanie na nowe substancje farmaceutyczne. Obecnie, koncerny farmaceutyczne konkurują w zakresie opracowywania nowych formuł leków skutecznie przeciwdziałających rozwojowi nowych chorób i różnych symptomów chorobowych dotykających współcześnie żyjące społeczeństwo. Łatwa dostępność i często nadmierna konsumpcja leków spowodowały, że przemysł farmaceutyczny stanowi jedną z najprężniej rozwijających się gałęzi gospodarczych na świecie.

2.2.2. Obszary zastosowania i dystrybucji farmaceutyków

Największymi nośnikami leków są szpitale, zakłady farmaceutyczne, a także, dzięki ofercie szerokiej gamy leków dostępnych bez recepty, tzw. OTC (z ang. *over the counter*), wzrasta grupa pojedynczych konsumentów w gospodarstwach domowych. Istotną grupę nabywców substancji farmaceutycznych stanowią również gospodarstwa rolne, hodowlane (np. rybne), gdzie wykorzystywane są w dużych ilościach antybiotyki i środki przeciwpasożytnicze [Sosnowska K. i in., 2003]. Ładunek zanieczyszczeń lekowych, pochodzący od pojedynczych konsumentów, dostarczany jest do oczyszczalni ścieków wraz ze ściekami komunalnymi. Tradycyjne oczyszczalnie ścieków nie radzą sobie ze skutecznym usuwaniem substancji

lekowych. Wiele grup leków i ich metabolitów wbudowuje się w osady ściekowe, które stanowią niebezpieczeństwo ekologiczne ze względu na fakt, że są one często wykorzystywane do rekultywacji terenów lub jako nawóz w gospodarstwach rolnych. Niewielki procent tych ścieków gromadzony jest w przydomowych zbiornikach bezodpływowych, które niewłaściwie eksploatowane mogą powodować przenikanie zanieczyszczeń do gleby i wód podziemnych. Nieobojętną rolę w powiększaniu stężeń pozostałości farmaceutyków w postaci wyjściowej leków, jak i ich metabolitów w środowisku stanową szpitale, zakłady dentystyczne oraz ośrodki weterynaryjne. Odpady medyczne i niewykorzystane farmaceutyki są transportowane na składowiska odpadów niebezpiecznych. Niewłaściwie zabezpieczone obiekty mogą powodować przedostawanie się tych substancji do gleby i wód gruntowych [Sosnowska K. i in., 2003]. Leki wykorzystywane przez rolników bądź w gospodarce hodowlanej podawane są zwierzętom prewencyjnie, w celu zabezpieczenia ich przed ewentualnymi chorobami. Mogą one przedostawać się do środowiska wodnego wraz ze spływem powierzchniowym z pól uprawnych lub poprzez bezpośrednią aplikację antybiotyków do wody (jak np. w przypadku stawów rybnych). Pewien niewielki, ale jednak znaczący z punktu widzenia środowiskowego procent dodatkowej porcji leków może pochodzić z infiltracji wód z okolic cmentarzy oraz obszarów nielegalnej produkcji i wywozu leków [Sosnowska K. i in., 2003].

Zarówno formy przetworzone leków jak ich struktury pierwotne nie ulegają całkowitej redukcji w procesach biologicznych [Felis E. i in., 2005, Yu Chang-Ping i in., 2009,]. W konsekwencji do odbiorników wodnych odprowadzane są ścieki oczyszczone zawierające niezidentyfikowane rodzaje leków z nieoszacowaną wartością ich stężeń. Mikroorganizmy kumulują farmaceutyki w swoich komórkach, przez co dochodzi do nieodwracalnych zmian w ich funkcjonowaniu bądź nawet do śmierci osobników. Leki hormonalne (m.in. estrogeny) wpływają na układ rozrodczy samców doprowadzając do ich bezpłodności bądź do skrajnie przeciwnego zjawiska – wytwarzania ikry. Obecność tych substancji wpływa także na zahamowanie rozwoju zarodków, co oznacza jednocześnie zmniejszenie populacji danego gatunku. Odbiornikami ścieków są często wody powierzchniowe, służące jako źródło wody pitnej dla ludzi. Obecność w wodzie resztek niebiodegradowalnych leków powoduje ponowne ich spożycie, co może działać na organizm jak mikroszczepionka. Oznacza to, że regularne dostarczanie danego typu leków może prowadzić do odporności na daną substancję [Felis E. i in., 2005, Yu Chang-Ping i in, 2007, Roh Hyungkeun i in., 2009].

2.2.3. Grupy i rodzaje leków

Liczba środków farmaceutycznych rozumianych, jako substancje mające na celu działanie terapeutyczne, zapobiegawcze i diagnostyczne stale rośnie. Z danych uzyskanych z 2001r. oszacowano, że w skali globalnej wynosi ona około 200 000. Średnio jednak, na rynku poszczególnych krajów można było uzyskać od 5 000 do 10 000 różnych preparatów [Kot-Wasik A., 2003]. Mały Rocznik Statystyczny Polski z 2017r. ujawnia, że zyski ze sprzedaży leków w 2016r. w Polsce wyniosły 13,79 mld zł. Krajowy rynek farmaceutyków charakteryzuje się wysokim udziałem leków generycznych. Stanowi jedną z głównych branż dostarczających innowacje w polskiej gospodarce [http://www.producencilekow.pl, odczyt 10.2017].

Ilość farmaceutyków przedostających się do środowiska naturalnego stanowi coraz poważniejszy problem. W wodach powierzchniowych oraz oczyszczalniach ścieków zidentyfikowano ponad 3500 substancji farmaceutycznych, z wykluczeniem metabolitów oraz innych produktów transformacji. Wśród oznaczonych związków, największą grupę stanowiły niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) [Aissaoui S. i in., 2017].

Najczęściej występujące grupy lekowe to:

Leki przeciwbólowe, przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, przeciwwymiotne – jedna z najpopularniejszych grup leków dostępnych w większości bez recepty. Do najczęściej kupowanych należą ibuprofen, paracetamol, naproksen, diklofenak karbamazepina oraz kwas salicylowy [Felis E. i in., 2005, Khetan S. i in., 2007]. Ibuprofen znajduje się w pierwszej dziesiątce najpopularniejszych leków w rankingu światowym [Murdoch R.W., Hay A. G., 2015]. Farmaceutyki te wraz z metabolitami zostały wykryte w wodach powierzchniowych, wodach do picia oraz w ściekach [Adamek E. i in., 2011, Felis E. i in., 2005, Kosjek T., 2007, Nosek K. i in., Subramanya N. T. i in., 2007, Yu Ch-P. i in., 2009].

Leki przeciwnowotworowe – są to głównie chemoterapeutyki, posiadające właściwości toksyczne, czego skutkiem jest występowanie niepożądanych objawów. Obecnie na rynku znanych jest ok. 90 gatunków leków tego typu. Zapotrzebowanie na te leki niestety ciągle wzrasta, jest to najbardziej zauważalne w krajach uprzemysłowionych. Do najczęściej spotykanych leków z tej grupy należą m.in. epirubicin, exemestane, 5-Fluorouracil, flutamide, letrozol, mitotan [Zounkova R. i in., 2010].

Leki z grupy beta-blokerów – to grupa leków hamująca układ współczulny. Mają za zadanie obniżanie ciśnienia tętniczego krwi, zmniejszenie zapotrzebowania serca na tlen oraz poprawę wydolności wieńcowej poprzez zwolnienie częstości serca. Beta-blokery znalazły zastosowanie także w leczeniu migreny, nerwic lękowych, schizofrenii, choroby Parkinsona oraz

w okulistyce przy zwalczaniu jaskry [Zounkova R. i in., 2010, http://www.damian.pl, odczyt 04.2017]. Do najbardziej rozpowszechnionych farmaceutyków z tej grupy należą: propranolol, metoprolol, atenolol. Ich obecność stwierdzono w wodach powierzchniowych, wodach gruntowych, na dopływie i odpływie z oczyszczalni ścieków [Zounkova R. i in., 2010].

Leki działające na mikroorganizmy chorobotwórcze – do tej grupy zalicza się środki dezynfekujące i odkażające, sulfonamidy, antybiotyki, leki przeciwgruźlicze i przeciwprątkowe, leki przeciwwirusowe, leki przeciwgrzybiczne, leki przeciwpierwotniakowe i przeciwrobacze. Wiele z nich znajduje zastosowanie podczas wykonywania zabiegów chirurgicznych w celu odkażenia skóry, dezynfekcji rąk a także narzędzi. Wykorzystywane są również w celu dezynfekcji wody przeznaczonej do różnych celów zarówno konsumpcyjnych jak i przemysłowych. Leki te są skuteczne w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych oraz grzybiczych w medycynie i weterynarii. Leki te można zakupić tylko za okazaniem recepty. Ta grupa leków jest słabo usuwana w oczyszczalniach ścieków, co oznacza, że w większości docierają one do wód powierzchniowych w ilości nawet kilku μg/l. [Marciocha D. i in., 2009]. Popularnymi substancjami z tej grupy leków są m.in. sulfamethoxazole, trimethoprim, tetracykliny, erytromycyna, linkomycyna [Marciocha D. i in., 2009, Stuart M.,2012].

Leki hormonalne – substancje te mają na celu regulację czynności narządów wewnętrznych przez pobudzanie bądź hamowanie odpowiednich procesów biochemicznych. Najpopularniejsze hormony to estrogeny (np. 17β- estradiol, 17α-estradiol, estriol) i gestageny (np. etynodiol), które są podstawowymi składnikami środków antykoncepcyjnych. Zapotrzebowanie na te substancje nieustannie wzrasta. W Polsce leki te są dostępne jedynie na receptę [Hernando M.D. i in., 2007, Jiang L. i in., 2010, Yu Ch.-P. i in., 2007].

Substancje farmaceutyczne stosowane w weterynarii można podzielić na:

- składniki pasz zwierząt hodowlanych stymulujące ich wzrost, bądź hamujące rozwój niektórych mikroorganizmów np. ziarniaków w hodowli drobiu,
- leki stosowane doraźnie w przypadku chorób,
- substancje medyczne stosowane jako dodatek do karmy w hodowli ryb [Makuch A., 2009].

2.2.4. Wielkość produkcji i konsumpcji leków

Przemysł farmaceutyczny jest obecnie największą gałęzią gospodarczą na świecie i przeważa nad innymi branżami cieszącymi się dobrą koniunkturą na rynku. W 2011 roku wartość światowego rynku farmaceutycznego wynosiła około 880 mld USD. Mimo pojawiających się w ostatniej dekadzie załamań rynku w skali globalnej, ten sektor gospodarczy konsekwentnie utrzymuje dodatnie wyniki sprzedaży. Według wstępnych szacunków w 2012 r. sprzedaż farmaceutyków wzrosła o 4%, co daje wartość około 1 biliona USD. Stany Zjednoczone

utrzymują znaczącą większość udziału w tych zyskach, wynoszących 46% [Baranowska-Skimina A., http://www.egospodarka.pl, odczyt 04.2017]. Prognozy ekonomistów zakładają popyt na produkty farmaceutyczne [http://biznes.pl/magazyny/medycyna]. W najbliższych latach najczęściej kupowaną grupą leków będą leki generyczne. Zakłada się, że popyt na nie będzie trzykrotnie wyższy od obecnego popytu na wszystkie farmaceutyki, głównie na rynkach wschodzących. Duże znaczenie w prognozowanym popycie leków generycznych będą miały koszty produkcji, które są nawet o 80% niższe niż leków innowacyjnych [http://biznes.pl/magazyny/medycyna, Zając A. i in., 2013].

Sytuacja przemysłu farmaceutycznego w Polsce

Polska, w 2011 r. spośród wszystkich Państw Unii Europejskiej zajmowała pierwsze miejsce w rankingu kosztów poniesionych z tytułu sprzedaży leków w skali roku. Pozycja ta wynika z faktu, że nasz kraj posiada bardzo duży udział w rynku leków generycznych, a niewielką dostępność do leków innowacyjnych, w porównaniu z innymi krajami europejskimi. Z danych zaprezentowanych przez European Generic Medicines Association (EGMA) z października 2010r. wynika, że w Polsce 80% wszystkich sprzedanych opakowań leków stanowiły generyki [http://www.gornicki.pl, odczyt 04.2017]. W tym samym roku polski rynek medykamentów zajmował szóste miejsce w Europie pod względem ilości sprzedanych leków [IMS Intelligence, 2011]. Obecnie na terenie całej Polski znajduje się około 541 hurtowni farmaceutycznych, 225 wytwórców i importerów produktów leczniczych oraz prawie 15 tys. aptek i punktów aptecznych [http://www.rynekaptek.pl, odczyt 10.2017]. Wartość rynku farmaceutycznego od 2007 roku odnotowuje ciągły wzrost, jednak dynamika rozwoju gwałtownie spadała w latach 2008-2010 (z 11% do 2%). Od 2011 r. sytuacja jednak zaczęła się poprawiać - odnotowano 4% wzrost sprzedaży [Stefańczyk M., 2011]. Wprowadzenie w 2012 r. w życie nowej ustawy refundacyjnej przyniosło kolejny spadek sprzedaży już w pierwszym miesiącu jej obowiązywania. Nowe przepisy spowodowały wzrost opłat za leki refundowane po stronie pacjentów o 1,9 punktów procentowych w stosunku do 2011 r. [Pilkiewicz M., 2012]. W 2013r. jednak nastąpiło zwiększenie sprzedaży leków w stosunku do 2011 r., mimo wahań na rynku gospodarczym spowodowanych światowym kryzysem [Zając A. i in., 2013]. We wrześniu 2017r. całkowita wartość rynku farmaceutycznego w Polsce została oszacowana na 28,2 mld zł, co stanowi wzrost o 5,1% w stosunku do roku poprzedniego [http://www.rynekaptek.pl, odczyt 10.2017r.].

Na terenie Wielkopolski znajduje się 46 hurtowni farmaceutycznych, co lokuje województwo na 4 miejscu największych dystrybutorów leków w Polsce [Urzędowy Rejestr Hurtowni Farmaceutycznych, 2017]. W Wielkopolsce znajdują się filie jednych z największych

zagranicznych przedsiębiorstw farmaceutycznych, np. Glaxosmithkline czy krajowych, jak Biofarm. W samym Poznaniu działa 20 firm farmaceutycznych. Procentowy udział podmiotów prowadzących działalność związaną z produkcją leków i wyrobów farmaceutycznych oraz badaniami w dziedzinie biotechnologii, ulokowało województwo Wielkopolskie na 5 miejscu [Sektor farmaceutyczny i biotechnologiczny w Polsce, 2011, Zając A. i in., 2013].

Na podstawie raportu opracowanego przez firmę QuintilesIMS Intitute szacuje się, że wartość globalnego rynku leków w 2021 roku osiągnie 1,5 bln USD netto, co wskazuje na 33% wzrost wartości tego sektora, w stosunku do roku 2016 o kwotę 367 mld USD. Prognozy określają średnioroczny wzrost wartościowy globalnego rynku leków w latach 2017 – 2021 na poziomie od 4 do 7%, czyli spadek wzrostu w stosunku do roku 2014 i 2015, gdzie wskaźnik ten osiągnął 9%. Było to spowodowane wprowadzeniem na rynek innowacyjnych terapii w leczeniu WZW C oraz w chorobach nowotworowych. Inna analizowana przyczyna spadku tempa wzrostu w tym sektorze związana jest z presją obniżania cen a także z wyhamowaniem dynamiki wzrostu produkcji oraz upływu terminu ochrony patentowej. Analitycy firmy QuintilesIMS informują, że obecnie trwają prace nad wdrożeniem około 2 200 nowych substancji aktywnych, będących w końcowej fazie rozwoju, z których corocznie, od 2017 roku, do obrotu planuje się wprowadzić około 45 nowych substancji lekowych. Liderem, pod względem największych udziałów w rynku farmaceutycznym, w ciągu najbliższych 5 lat nadal pozostaną Stany Zjednoczone, generując około 53% prognozowanego wzrostu globalnego. W 2021r. szacuje się spadek tempa wzrostu o połowę w stosunku do roku 2015, gdzie parametr ten wynosił 12% [http://www.rynekzdrowia.pl/, odczyt 04.2017].

Polski sektor farmaceutyczny po załamaniu sektora w 2014r, odnotowuje od 2015r. wzrost sprzedaży aptecznej, gdzie po raz pierwszy od kilku lat dobrze sprzedawały się również leki na receptę (tzw. leki Rx). Wzrost sprzedaży dla leków refundowanych wyniósł 7%, a dla produktów OTC 2%. Analitycy firmy PMR nie przewidują długoterminowej perspektywy wysokiej dynamiki sprzedaży leków refundowanych. Przyczyny załamania mogą wynikać z przewidzianych na jesień 2017r. zmian w ustawodawstwie, wprowadzające zmniejszenie cen leków wśród producentów. Według perspektyw, w latach 2016-2018 nastąpi wzrost gospodarczy, który ustabilizuje się na poziomie 3,4 – 3,6%. Będzie on wynikiem wysokiej konsumpcji z gospodarstw domowych oraz stabilnie rosnących inwestycji. W okresie od 2019 do 2021 natomiast, przewiduje się spowolnienie gospodarcze. Prawdopodobnymi przyczynami będą: malejąca liczba osób aktywnych zawodowo oraz stopniowe domykanie się unijnej perspektywy budżetowej na lata 2014–2020 (ujemne oddziaływanie na inwestycje). Szacuje się, że spowolnienie dynamiki rynku wyniesie około 4,4–4,7% [http://www.marketing-news.pl/, odczyt 04.2017].

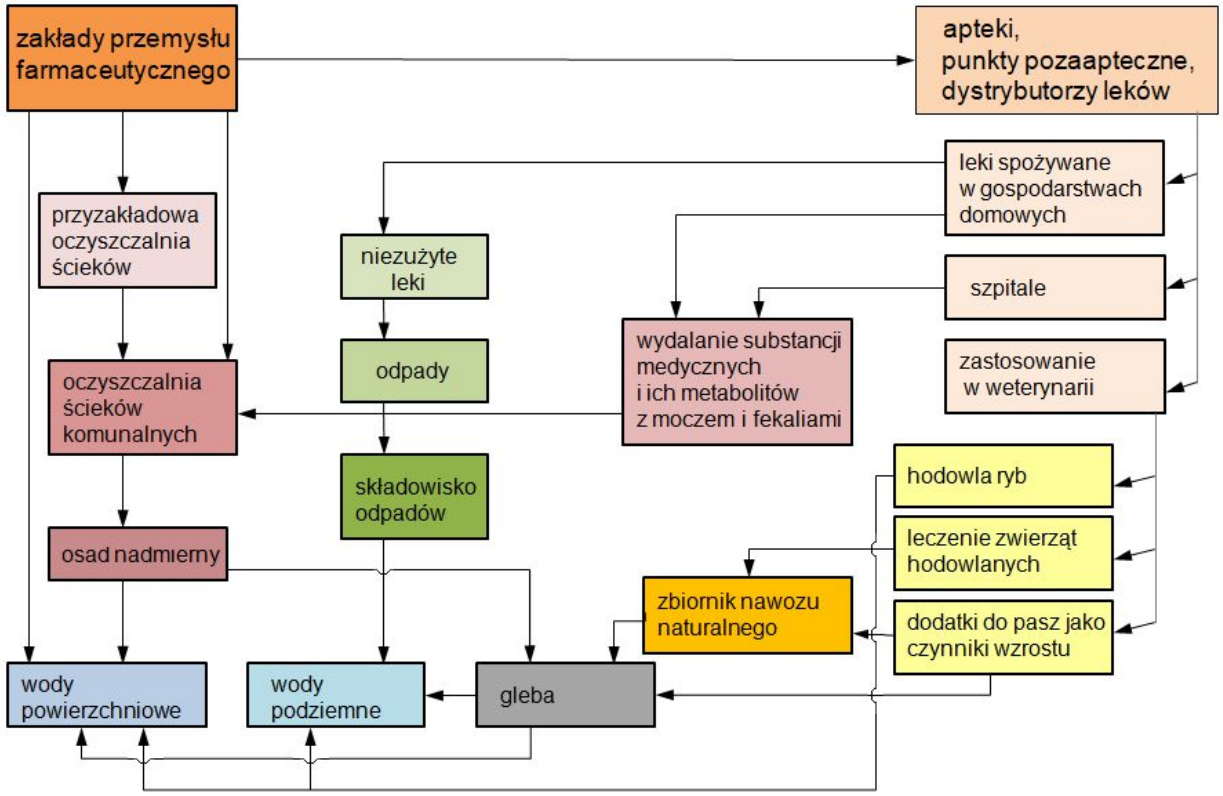
2.3. Farmaceutyki w środowisku wodnym

2.3.1. Sposoby przedostawania się do środowiska

Cykl życia leku rozpoczyna się od planowania i opracowania formuły leku a następnie wielu lat badań i obserwacji. Po uzyskaniu patentu analizowanej substancji, rozpoczyna się proces jego wytwarzania. Z zakładów produkcyjnych leki są transportowane do dystrybutorów: aptek, punktów pozaaptecznych, jak sklepy czy supermarkety lub innych dostawców. Odbiorcą leków (w przewadze leków OTC) mogą być konsumenci indywidualni. Pewne ilości ścieków bytowo-gospodarczych zawierające pozostałości farmaceutyków mogą być gromadzone lokalnie w zbiornikach bezodpływowych. Zasadnicza ich część odprowadzana jest jednak do oczyszczalni ścieków. Niezużyte lub przeterminowane leki są wyrzucane do śmieci, jako zwykły odpad, skąd transportowane są na składowiska odpadów. Przez niewłaściwe zabezpieczenie podłoża, podczas opadów deszczu, może nastąpić przenikanie odcieku z wysypiska do gleb, a następnie wód podziemnych. Niekiedy też niewykorzystane leki usuwane są w toaletach i umywalkach, skąd systemami kanalizacyjnymi odprowadzane są do oczyszczalni ścieków. Do zwiększania ładunku zanieczyszczeń farmaceutycznych przyczyniają się także szpitale, zakłady produkujące leki a także ścieki pochodzące z punktów nielegalnej produkcji leków (rysunek 1).

Leki weterynaryjne, wykorzystywane w gospodarstwach rolnych i stawach hodowlanych również są źródłem skażenia środowiska naturalnego. W gospodarstwach hodowlanych do pasz dodawane są leki wstrzymujące rozwój pasożytów i innych drobnoustrojów, które mogłyby doprowadzić do epidemii. Spożyte przez zwierzęta substancje wydalane są na powierzchnię gleb, skąd poprzez spływ powierzchniowy oraz infiltrację przedostają się do wód powierzchniowych oraz podziemnych. Inną drogą transportu leków do wód są spływy powierzchniowe z pól uprawnych, nawożonych nawozem zwierzęcym lub bezpośrednia aplikacja środków leczniczych do wód, jak np. stawów hodowlanych ryb.

Dopływające do oczyszczalni ścieki zawierające domieszki substancji farmaceutycznych zostają poddane oczyszczaniu z zastosowaniem konwencjonalnych rozwiązań technologicznych. Dlatego też skuteczność usuwania leków w oczyszczalniach jest różna i zależy od rodzaju farmaceutyku, od jego stężenia na wejściu oraz od parametrów technologicznych układu. Spośród analizowanych związków farmaceutycznych, żaden nie został usunięty całkowicie, o czym donosi literatura [Quintana J.B. i in., 2005,Nakada N. i in., 2006, Samaras V.G. i in., 2013, Pereira A.M. i in., 2015]. W konsekwencji, odbiorniki wodne, stanowiące źródło wody pitnej, do których wprowadza się oczyszczone ścieki, nie zostają wolne od pozostałości lekowych [Zając A. i in., 2013].



Rysunek 1. Drogi farmaceutyków w środowisku [opracowanie własne]

2.3.2. Występowanie w środowisku i wpływ na żywe organizmy

Mimo, że farmaceutyki występują w środowisku w stężeniach rzędu ng/L (tabela 1), ich negatywne oddziaływanie dotyka żywe organizmy, które są narażone na bezpośredni kontakt z nimi. Bardzo niski poziom ich stężenia, graniczący niekiedy z poziomem detekcji urządzenia pomiarowego, ogranicza ich oznaczenie za pomocą analizy chemicznej lub ich oznaczenie wiąże się z wysokimi kosztami [Mielżyńska-Svach D., 2011]. Dlatego też, w celu określenia stopnia toksyczności danej substancji i oceny środowiska, alternatywnie do metod analitycznych, wykorzystywane są metody biologiczne. Jedną z nich jest bioindykacja, której celem jest analiza wpływu zanieczyszczeń na materiał biologiczny. Mogą je stanowić tzw. bioczujniki w postaci bakterii, wirusów, czy przeciwciał. Innym sposobem jest biomonitoring w środowisku, mający na celu obserwacje zmian flory i fauny w badanym obszarze. Niekiedy stanowią go organizmy pełniące rolę wskaźników wrażliwości (jak np. ryby, małże) lub wskaźników kumulacji (np. glony, skorupiaki, rośliny wyższe, ryby), tzw. organizmy monitorowe. Mikroorganizmy wykorzystywane do biotestów muszą charakteryzować się: wysoką wrażliwością na szerokie spektrum toksyn, dostępnością w każdym czasie, łatwością do przetrwania w warunkach laboratoryjnych, niezmiennością genetyczną, a także muszą być wyselekcjonowane pod kątem wyeliminowania chorób czy pasożytów.

Tabela 1. Obecność diklofenaku i ibuprofenu w środowisku wodnym i ściekach

Diklofenak (stężenie)	Ibuprofen (stężenie)	Lokalizacja	Literatura
0,3 - 0,5 µg/L	0,05-0,1 µg/L	wody powierzchniowe, Polska	Guzik U. i in., 2013
0,001 - 0,033 µg/L	< 0,0045 µg/L	wody powierzchniowe, Francja	
0,15 µg/L	< 0,0006 µg/L	wody powierzchniowe, Niemcy	
< 0,0025 µg/L	0,003 µg/L	woda pitna, Francja	
25-170 ng/L	13-87 ng/L	wody powierzchniowe, Szwecja	Szymonik A. i in. 2012
9-49 ng/L		wody powierzchniowe, Słowenia	
17-486 ng/L	12-76 ng/L	wody powierzchniowe, Polska	
313-3363 ng/L	2234-16886 ng/L	wody powierzchniowe, Hiszpania	
3 µg/L	35 µg/L	surowe ścieki komunalne	Łebkowska M. i in., 2012
0,27 - 2,51 µg/L	0,002 - 85 µg/L	odpływ ścieków komunalnych	
110 ng/L	1900 ng/L	odpływ ścieków komunalnych	Yu J.T. i in., 2006
6-496 ng/L	65-491 ng/L	odpływ ścieków komunalnych	Kasprzyk-Hordern B. i in., 2009
211-486 ng/L	18-219 ng/L	odpływ ścieków komunalnych	Rabiet M. i in., 2006
120 ng/L	150 ng/L	odpływ ścieków komunalnych	Bendz D. i in., 2005
80-290 ng/L	< 10-161 ng/L	odpływ ścieków komunalnych	Reungoat J. i in., 2011
599 ng/L	4201 ng/L	odpływ ścieków komunalnych	Ashton D. i in., 2004
187-855 ng/L	-	odpływ ścieków komunalnych	Teijon G. i in., 2010
432 ng/L	-	Grecja, rzeka Aisohas	Stasinakis A.S. i in., 2012
22,8 -136 ng/L	-	Chiny/Rzeka Żółta	Wang L. i in., 2010
24-931 ng/L	-	Węgry/ rzeka Dunaj	Helenkar A. i in, 2010
6-35 ng/L	-	woda pitna/ Niemcy/Berlin	Valcárcel Y. i in.,
3000 ng/g	-	osady denne/ Ukraina/Łopań	Vystavna Y. i in., 2012
300-900 ng/g	-	osady denne/ Francja/Jalle	Vystavna Y. i in., 2012
9-40 ng/L	-	Walia/ rzeka Taff	Kasprzyk-Hordern B. i in., 2009
282 ng/L	-	Słowenia/ rzeka Krka	Kosjek T. i in., 2005
54,9 ng/L	-	USA/ rzeka Anacostia	Shala L. i in, 2010
25-170 ng/L	-	Szwecja/rzeka Fyris	Daneshvar A i in., 2010
470 ng/L	-	Polska/ rzeka Odra	Baranowska I. i in., 2012
4 ng/L	-	woda pitna Polska	Zgoła-Grześkowiak A., 2010

Badania z wykorzystaniem biotestów mogą służyć do analiz próbek w warunkach laboratoryjnych, do których sztucznie wprowadza się substancje szkodliwe lub rzeczywiste, gdzie materiał pobiera się bezpośrednio ze środowiska, np. z wody, z gleby czy z osadu. Testy natomiast prowadzone *in situ* wykorzystują populacje organizmów żyjących w warunkach naturalnych. [Mielżyńska-Svach D., 2005].

W ocenie toksyczności definiuje się:

- **toksyczność ostrą**, gdzie szkodliwe zmiany w organizmach testowych (powodujące najczęściej śmierć) obserwowane są po krótkim czasie ekspozycji, głównie od 24h do 96h,
- **toksyczność chroniczną**, gdzie szkodliwe zmiany zachodzące w organizmach testowych (np. w postaci zaburzenia funkcjonowania układu pokarmowego, rozrodczego lub innych narządów) obserwowane są po dłuższym czasie ekspozycji.

Parametrami odnoszącymi się do interpretacji miary toksyczności są:

- **LCx** (*ang. Lethal Concentration*) – stężenie analizowanego związku, któremu odpowiada śmierć określonej w % liczby organizmów przy założonych warunkach, w literaturze najczęściej spotyka się wartość odnoszącą się do 50% populacji, tj. LC50,
- **ECx** – (*ang. Effect Concentration*) – stężenie efektywne powodujące powstanie określonych zmian fizjologicznych w organizmach testowych, np. unieruchomienie, wyrażone w %,
- **TU** (*ang. Toxic Unit*) – jednostka toksyczności,
- **NOEL** lub **NOEC** (*ang. No Observed Effect Level/Concentretion*)– stężenie substancji toksycznej, przy którym nie obserwuje się niekorzystnego efektu jej działania, otrzymane w wyniku zastosowania badanego testu,
- **LOEL** lub **LOEC** (*ang. Lowest Observed Effect Level/Concentration*) – najniższa dawka lub stężenie, przy którym obserwowano pierwsze niekorzystne zmiany,
- **LOAEL** (*ang. Lowest Observed Adverse Effect Level*) – najniższa dawka lub stężenie substancji, przy której w trakcie przeprowadzonych badań zauważa się szkodliwą zmianę [Mielżyńska-Svach D., 2005, Kuczyńska A. i in., 2016].

Biotesty wykorzystywane są do oceny toksyczności wód powierzchniowych i podziemnych, wody oczyszczonej, ścieków, osadów ściekowych czy odcieków. Najpopularniejszymi organizmami wykorzystywanymi w tego rodzaju testach są m.in.:

- bakteria: *Vibrio fischeri* - naturalnie występująca w morzach i oceanach, charakteryzuje się zdolnością do emitowania światła, czyli bioluminescencji. W teście z jej udziałem dokonuje się pomiaru luminescencji przed i po inkubacji zawiesiny bakteryjnej z badaną próbką po 15 i 30 min. Miarą toksyczności jest EC50 określające stężenie efektywne powodujące redukcję 50% emisji światła przez bakterie,

- mikroalga (składnik fitoplanktonu) *Pseudokirchnerirlla subcapitata (Selenastrum capricornutum, Raphidocelis subcapitata)*. W teście oceniane jest tempo wzrostu mikroalg przez pomiar gęstości optycznej po 24h, 48h oraz 72h. Miarą toksyczności jest EC50, stężenie efektywne powodujące 50% obniżenie przyrostu biomasy lub liczby komórek,

- skorupiak *Daphnia magna* żyje w wodach słodkich, stanowi istotny składnik planktonu słodkowodnego, stanowiący pokarm ryb i innych zwierząt wodnych. W teście oceniana jest immobilizacja (unieruchomienie) lub śmiertelność rozwielitek po 24h lub 48h. Miarą toksyczności są EC50- stężenie efektywne powodujące unieruchomienie 50% badanych organizmów oraz LC50- stężenie śmiertelne wskazujące na śmierć 50% badanych organizmów,

- *Danio reiro* - słodkowodna ryba z rodziny karpiowatych. Test jest prowadzony na wczesnych stadiach rozwojowych: stadium zarodka (embrion) oraz stadium larwalne (larwa). Miarą toksyczności jest ocena przeżywalności organizmów w danych stadiach. Postaci embrionów i larw wykazują większą wrażliwość w porównaniu z osobnikami dorosłymi.

- *Lemna minor* – jedna z najmniejszych na świecie roślin naczyniowych. Test analizuje zahamowanie wzrostu liczby roślin, liczby i powierzchni frondy, liczby i długości korzeni, suchej i świeżej biomasy oraz zawartości chlorofilu rzęsy drobnej w okresie od 5 do 7 dni. Miarą toksyczności jest EC50 – stężenie efektywne powodujące 50% zahamowanie powyżej wymienionych parametrów,

- *Salmo trutta m. lacustris* – ryba z rodziny łososiowatych występująca w czystych, dobrze natlenionych i zimnych jeziorach oraz zbiornikach zaporowych. W teście analizowana jest obecność estrogenów w próbkach wody lub ścieków poprzez pomiar ilości produkowanej witelogeniny (białka prekursorowego biorącego udział w produkcji żółtka w oocytach ryb, jego produkcja zachodzi pod wpływem estrogenów). Test prowadzony jest na komórkach wątrobowych (hepatocytach) pochodzących od męskich osobników.

Sposób oceny ryzyka środowiskowego

Potencjalne ryzyko związane z występowaniem w środowisku substancji toksycznych jest charakteryzowane na podstawie porównania dwóch parametrów: prognozowanego stężenia substancji w środowisku (*ang. PEC – Predicted Environmantal Concentration*) oraz przewidywanego stężenia nie wywołującego zmian w środowisku (ang. PNEC – *Predicted No Effect Concentration*) [Fent K. i in, 2006]. Wartość parametru PNEC jest obliczana za pomocą odpowiedniego współczynnika szacowania (*ang. UF – Uncertainty Factor*) wprowadzanego do wyników badań (przeprowadzonych na organizmach żywych), takich jak LC50, EC50, NOEC, LOEC lub inne odpowiednie wyniki badań [Kuczyńska A. i in., 2016, Fent K. i in, 2006].

W Polsce regulacje prawne dotyczące weryfikacji stopnia toksyczności poszczególnych substancji szkodliwych dla środowiska określa Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 12 stycznia 2005r. w sprawie sposobu dokonywania oceny ryzyka dla zdrowia człowieka i dla

środowiska stwarzanego przez substancje nowe [Dz. U. 2005 Nr 16 poz. 138, załącznik nr 3]. W Europie natomiast wymóg badań ekotoksyczności stał się warunkiem uzyskania rejestracji leków, na podstawie Dyrektywy 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 6 listopada 2001r. w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi [Dz.U. L 311 z 28.11.2001, str. 67], jak i substancji weterynaryjnych, na podstawie Rozporządzenia Komisji z dnia 27 marca 1992r., zmieniające załącznik V do rozporządzenia Rady EWG nr 2377/90 ustanawiającego wspólnotową procedurę określania maksymalnych limitów pozostałości weterynaryjnych produktów leczniczych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego.

W Stanach Zjednoczonych Agencja Leków i Żywności (*ang. Food and Drug Administration FDA*) opublikowała wytyczne (*Guidance for Industry Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler (DPI) Drug Products 11.1998*), wg których wprowadzenie leku do sprzedaży wiąże się z przedstawieniem raportu oceny wpływu na środowisko, podczas gdy spodziewane stężenie substancji przekracza 1 μg/L [Santos Lucia H.M.L.M., i in., 2010].

Niepokój związany z pojawieniem się substancji lekowych w wodach powierzchniowych i podziemnych zapoczątkował nowy obszar badań, określony jako „PIE" (*Pharmaceuticals In the Environment* – leki w środowisku). W związku z narastającym zainteresowaniem i popytem na produkty farmakologiczne, przemysł lekowy stara się sprostać oczekiwaniom konsumentów, tworząc coraz nowsze i bardziej skuteczne aktywne substancje farmaceutyczne API (*Active Pharmaceutical Ingredients*), które są odporne lub wysoce odporne na biodegradację [Khetan Sushil K. i in., 2007]. Dane literaturowe wskazują, że pojedyncze farmaceutyki z grupy NLPZ poddane badaniu toksyczności w stężeniach obserwowanych w środowisku nie wywołują skutków, lub ich obecność powoduje śladowe efekty. Naukowcy wskazują jednak, że te same rodzaje leków występujące w postaci mieszaniny mogą wywoływać poważne skutki lub intensyfikować działanie innych zanieczyszczeń. Potwierdzają to badania m.in. Rizzo i wsp. [Rizzo L. i in., 2015], gdzie mieszanina ibuprofenu, diklofenaku, karbamazepiny i kofeiny spowodowała wzrost toksyczności w granicach 87-100%, w stosunku do aplikowanych pojedynczo. Wyniki analiz prowadzonych przez naukowców z Idaho State University (Pocatello, USA) dowiodły, że mieszanina trzech leków: prozak (fluoksetyna), wenlafaksyna oraz karbamazepina występująca w dawkach bezpiecznych dla środowiska, może negatywnie oddziaływać na rozwijający się płód [Thomas Michael A. i in., 2012].

Związki farmaceutyczne spożywane przez ludzi i zwierzęta ulegają licznym procesom przemiany, w wyniku których uzyskuje się metabolity. Niektóre z nich mogą być bardziej toksyczne niż postać wyjściowa leku. Ze względu na dużą polarność, ich właściwości

zmieniają się w zależności od warunków środowiskowych, w jakich się znajdują. Formy sprzężone na przykład, ulegając hydrolizie, mogą powrócić do postaci macierzystej leku [Sosnowska K. i in., 2009, Khetan Sushil K. i in., 2007]. Występujące w wodzie leki i ich metabolity mają nieustanny kontakt z żywymi organizmami. Ich długotrwała obecność wpływa na zmianę procesów życiowych zwierząt wodnych i mikroorganizmów, a także pośrednio stwarza zagrożenie dla ludzi.

Jednym z pierwszych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych jest kwas acetylosalicylowy. Jego obecność w wodach w stężeniach rzędu mg/L powoduje zmiany w układzie rozrodczym rozwielitek. Współcześnie zaś, za najbardziej popularny lek z grupy NLPZ (niesteroidowych leków przeciwzapalnych) uważa się diklofenak. Badania dowiodły, że powoduje on zmiany komórkowe w oskrzelach i nerkach u pstrąga tęczowego w stężeniach tysiąckrotnie mniejszych niż w przypadku kwasu acetylosalicylowego [Khetan Sushil K. i in., 2007]. Inny przedstawiciel z grupy leków przeciwbólowych – propranolol wpływa negatywnie na układ sercowo-naczyniowy i rozrodczość ryb. Serotonina natomiast, należąca do grupy leków psychotropowych może wywoływać zmiany układzie nerwowym i hormonalnym [Sosnowska K. i in., 2009; Fent K. i in., 2006]. Poważne zagrożenie stanowią również antybiotyki. Są one wykorzystywane do walki z infekcjami bakteryjnymi i drobnoustrojami zarówno wśród ludzi, jak i zwierząt. Różnorodność i wszechobecność tej grupy leków spowodowała, że niektóre szczepy bakteryjne wykazują zwiększoną odporność na czynniki chorobotwórcze, w wyniku czego skuteczność leku obniża się [Sosnowska K., 2009, Heberer T. i in., 2002, http://www.bbc.co.uk/news/health-20354536, odczyt 03.2017; http://kopalniawiedzy.pl odczyt 03.2017 r.].

Do najczęściej analizowanych pod kątem występowania i możliwych w związku z ich obecnością skutków środowiskowych rodzajów leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) należą ibuprofen, diklofenak, naproksen, kwas acetylosalicylowy. Ibuprofen aplikowany w stężeniach 1-1000 μg/L stymulował wzrost sinic, *Synechocystis* ponad 5 dni. Najwyższy wzrost został odnotowany przy stężeniu 10 μg/L. Ibuprofen zahamował wzrost rzęsy wodnej *Lemna minor* po 7 dniach ekspozycji, w każdym z analizowanych stężeń. Najsilniejszy efekt nastąpił przy 1000 μg/L, gdzie wzrost rzęsy wyniósł 25%. Obecnie, za najbardziej niebezpieczne, co wykazują testy ekotosyczności ostrej, uznaje się leki hormonalne [Fent K. i in., 2006, Khetan S.K. i in., 2007, Carlsson C. i in., 2006]. Ryby poddane ekspozycji hormonów steroidowych syntetyzują witellogeninę i tym samym obserwuje się feminizację osobników męskich (LOEC 17β-estrediolu i estronu dla ryb wynoszą od 0,0004 μg/L do 0,75 μg/L, natomiast 17α-etynyloestradiolu – 0,0003 μg/L) [Carlsson C. i in., 2006].

Wg badań Carlsson i wsp. (2006) najbardziej niebezpieczne dla środowiska wodnego są diklofenak, etynyloestradiol, ibuprofen, metoprolol, parmacetamol i oksytetracykliny. Spośród grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych diklofenak wykazuje największą toksyczność ostrą przy stężeniu poniżej 100 mg/L [Fent K. i in., 2006]. Krótki czas reakcji był obserwowany w teście ostrej toksyczności z użyciem alg i bezkręgowców. Fitoplankton wykazał wrażliwość EC50 po 96h przy stężeniu 14,5 mg/L, natomiast zooplankton dla EC50 – przy 22,43 mg/L [Fent K. i in., 2006]. Schwaiger i in. sprawdzili wpływ diklofenaku na pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*). Osobniki tej ryby hodowano przez 28 dni w akwariach, w któym każdy zawierał inne stężenie leku tj.: 1, 5, 20, 100 i 500 1µg diklofenaku/l wody. Po upływie wyznaczonego czasu wykonano analizę tkanek wątroby, żołądka, jelit, nerek i skrzeli, pod kątem zmien histopatologicznych oraz wyznaczono współczynnik biokoncentracji (BFC) dla analizowanych tkanek narządów. Uzyskane wyniki wskazały brak zmian w obrębie wątroby, jelita, śledziony. W próbkach nerek i skrzeli zmiany zaobserwowano już przy stężeniu 5 µg/l. i wyższych. W nerkach zdiagnozowano zwyrodnienie kropelkowo-szkliste, nagromadzenie materiału białkowego w świetle kanalików oraz wakuolizację i martwicę pojedynczych komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. Zaobserwowano zwiększenie ilości tkanki śródmiąższowej nerek. W skrzelach natomiast dostrzeżono zmiany zwyrodnieniowe i nekrotyczne w obrębie komórek podporowych i dylatację ścian naczyń włosowatych [Guzik U. i in., 2013].

Badanie toksyczności ścieków z odpływu oczyszczalni, w których wykryto diklofenak, ibuprofen, karbamazepinę oraz kofeinę eksponowano na *Daphnia magna*. Po 24 godzinach nie zaobserwowano zahamowania funkcji życiowych u tego skorupiaka [Rizzo L. i in., 2015].

Obecność substancji farmaceutycznych jest analizowana w środowisku wodnym od ponad dwóch dekad. Jak wskazują liczne publikacje, nawet niewielkie stężenia różnych grup związków lekowych, wywołują pewne skutki środowiskowe i oddziałują negatywnie na eksponowane, żywe organizmy. Ze względu na stosunkowo krótki czas analizy, niektóre leki z grupy NLPZ w testach ekotoksyczności nie wskazują negatywnego oddziaływania na środowisko. Nie można jednak wykluczyć, że utrzymująca się w dłuższej perspektywie czasowej tendencja ich transportu do środowiska, pozostanie obojętna dla ekosystemów.

2.4. Obecność farmaceutyków w oczyszczalniach ścieków

2.4.1. Droga farmaceutyków do oczyszczalni ścieków

Jak wspomniano w rozdziale 2.3.1., głównym źródłem ładunku zanieczyszczeń farmaceutycznych są konsumenci indywidualni. W przypadku drobnych dolegliwości niewymagających konsultacji lekarskich, w niekontrolowany sposób nabywają oni łatwo dostępne produkty lekowe z grupy NLPZ. Część leków dostępnych bez recepty, po przekroczweniu terminu ważności usuwana jest w toalecie lub umywalce skąd systemem kanalizacyjnym przdostaje się do oczyszczalni ścieków. Szpitale, mimo dużego ładunku zanieczyszczeń farmaceutycznych, przed odprowadzaniem ścieków do oczyszczalni zobligowane są jedynie do neutralizowana patogenów chorobotwórczych, np. poprzez chlorowanie. Metody stosowane do usuwania drobnoustrojów nie wpływają jednak na rozkład substancji lekowych. Dodatkowe obciążenie związkami farmaceutycznymi dostarczają zakłady produkujące różnego rodzaju produkty lekowe. Nieuregulowana kwestia prawna w zakresie obowiązku zachowania odpowiednich poziomów stężeń leków wprowadzanych do kanalizacji miejskiej, powoduje często, że zakłady wytwórcze kierują ścieki poprodukcyjne bezpośrednio do przewodów kanalizacyjnych i oczyszczalni ścieków. Niekiedy nawet ścieki są odprowadzane bezpośrednio do wód powierzchniowych. Rosnąca świadomość i dostęp do powszechnej informacji na temat toksycznego działania na żywe organizmy substancji lekowych, spowodowały, że zakłady farmaceutyczne wyznaczają wewnątrzzakładowe normy w zakresie jakości i wielkości parametrów ścieków wprowadzanych do kanalizacji miejskiej.

Skonsumowane leki, przed dotarciem do oczyszczalni ścieków przechodzą wiele procesów. Określa się je akronimem LADME, które kolejno oznaczają: uwolnienie (z ang. *Liberation*), wchłanianie (*Absorption*), dystrybucję (*Distribution*), metabolizm (*Metabolism*) oraz wydalenie (*Excretion*). Przemiany leku dokonujące się tuż po spożyciu w organizmie człowieka, w obrębie właściwości chemicznych i strukturalnych określa się mianem metabolizmu lub biotransformacji. Największy rozkład leku zachodzi w wątrobie (około 2/3 dawki), gdzie następuje zmiana formy z liofilowej na hydrofilową, która pozwala na jego wydalenie z organizmu. W procesie metabolizmu dominują dwie fazy. Faza pierwsza obejmuje procesy utleniania, redukcji oraz hydrolizy. W drugiej natomiast produkty fazy pierwszej są sprzęgane z kwasem glukuronowym i wydalane wraz z moczem lub żółcią. Leki nie ulegają całkowitej biotransformacji w organizmie, stąd leki wydalane są w formie metabolizowanej, jak i w postaci wolnej, wyjściowej [Szymonik A. i in., 2012].

Mimo, że stężenia związków farmaceutycznych zawartych w ściekach bytowo-gospodarczych są śladowe, konwencjonalne oczyszczalnie ścieków nie umożliwiają

ich całkowitego usunięcia. Niektóre substancje farmaceutyczne rozkładane są za pomocą metod biologicznych do prostych związków nieorganicznych, w postaci ditlenku węgla oraz wody. Niekiedy też usuwanie tych substancji możliwe jest za pomocą adsorpcji w osadach dennych. Skuteczność tej metody jest jednak zależna od oddziaływań elektrostatycznych leków z cząsteczkami stałymi oraz właściwości fizykochemicznych danego leku. Leki o charakterze liofilowym (np. estrogeny) znacznie lepiej adsorbują się na osadach dennych, w porównaniu z lekami hydrofilowymi. Innym parametrem decydującym o zajściu adsorpcji jest odczyn pH. Leki o charakterze kwasowym, do których zalicza się większość NLPZ, jak np. kwas acetylosalicylowy, diklofenak, ketoprofen czy naproksen są słabo adsorbowane i krążą w fazie wodnej. Farmaceutyki z grupy antybiotyków, np. tetracykliny, makrolity czy sulfonamidy są dobrze adsorbowane na osadach dennych. Proces usuwania leków za pomocą adsorpcji na osadach dennych niesie ze sobą ryzyko zanieczyszczenia wód powierzchniowych i podziemnych. Wykorzystanie osadów do użyźnienia gruntów może spowodować przedostawanie się zaadsorbowanych farmaceutyków do gleb i stąd, w procesie infiltracji, przenikanie do wód gruntowych [Szymonik i in., 2012].

Stan i stopień toksyczności analizowanej substancji może być zależny od czynników fizycznych jak np. pH, temperatura czy promieniowanie. Szwajcarscy naukowcy Tauxe-Wuersch A. i in. w 2005r. przeprowadzili badania usuwania farmaceutyków poddanych procesom występującym w konwencjonalnych oczyszczalniach ścieków takich jak: mineralizacja, transformacja oraz adsorpcja związków na powierzchni materiału osadu. Uzyskane wyniki wskazały, że zmiana temperatury przy zachowaniu stałych pozostałych parametrów otoczenia znacznie wpływa na redukcję ibuprofenu. W okresie zimowym stopień redukcji wynosił około 10%, w porze letniej natomiast skuteczność usuwania wzrosła do ponad 80%. Tendencja ta jest podobna zarówno w odniesieniu do leków występujących w ściekach jak i w wodzie [Tauxe-Wuersch A. i in., 2005]

2.4.2. *Stopień redukcji*

W skład struktury leku wchodzą aktywne składniki farmaceutyczne, substancje pomocnicze oraz dodatkowe związki takie jak cukry, sole, pigmenty czy substancje zapachowe [Kummerer K., 2010].

Aktywne postaci leków, po przedostaniu się do środowiska naturalnego ulegają transformacjom do prostszych form. Szybkość rozkładu zależy od środowiska występowania, budowy oraz właściwości substancji farmaceutycznych. Związki farmaceutyczne zawarte w mieszaninie metabolitów oraz substancji macierzystych mogą zostać poddane procesom:

- biotycznym (np. biotransformacja, biodegradacja)
- abiotycznym (np. fotodegradacja, fototransformacja - zachodzące przy dostępie promieni słonecznych, głównie w górnych warstwach zbiorników wodnych).

Do najczęściej obserwowanych procesów umożliwiających rozkład związków farmaceutycznych, zachodzących w środowisku wodnym należą:

- biodegradacja (tlenowa i beztlenowa), metaboliczny rozkład oraz transformacja, na które w sposób bezpośredni lub pośredni wpływa konsumpcja substancji farmaceutycznych przez organizmy wodne,
- adsorpcja na strukturze cząstek zawieszonych w wodzie,
- sedymentacja farmaceutyków na dnie zbiornika wodnego
- fotodegradacja oraz fototransformacja w strefie fototropowej zbiornika wodnego [Rosenberg E., 2009]

Farmaceutyki transportowane do miejskich oczyszczalni ścieków mogą ulegać biodegradacji podczas tlenowego i beztlenowego oczyszczania ścieków. Zarówno diklofenak jak i ibuprofen są podatne na oczyszczanie metodami wykorzystującymi osad czynny a skuteczność usuwania jest zależna od zmiennych warunków otoczenia. Można zaobserwować, że przy dłuższym czasie zatrzymania ścieków, niektóre związki, jak np. diklofenak usuwają się nawet w 70% (tabela 2). Ibuprofen natomiast ulega rozkładowi do hydroksy- i karboksypochodnych. Badania dowodzą, że pod względem stężenia tlenu najwyższy stopień redukcji ibuprofen uzyskuje w warunkach tlenowych (> 95 % w ciągu dwóch dni następuje biodegradacja ibuprofenu do stężenia o wartości poniżej detekcji urządzenia) [Kujawa-Roeleveld K. i in., 2008]. W warunkach beztlenowych natomiast, skuteczność usuwania ibuprofenu, niezależnie od temperatury wynosiła maksymalnie ok. 40% [Suarez S. i in., 2010]. Metabolity mogą wskazywać większą lub mniejszą odporność na rozkład w stosunku do postaci wyjściowych leków. W większości przypadków jednak (tabela 3) skuteczność usuwania ibuprofenu za pomocą tradycyjnych metod oczyszczania ścieków utrzymuje się na poziomie > 90%.

Efektywność usuwania zanieczyszczeń za pomocą biologicznych metod oczyszczania jest zależna od wielu zmiennych, m.in. temperatury otoczenia, odczynu pH, wieku osadu (SRT) bądź czasu przetrzymania ścieków.

Wyższa temperatura przyspiesza proces rozkładu zarówno diklofenaku jak i ibuprofenu (w temperaturze 10^{o}C rozkład następował znacznie wolniej niż przy temp. 20^{o}C). Istotnymi parametrami wpływającymi na poprawę i ilość usuwanych zanieczyszczeń są SRT (*solid retention time*) - czas retencji osadu oraz HRT (*hydraulic retention time*) czas przepływu

Tabela 2. Skuteczność usuwania diklofenaku za pomocą wybranch metod biologicznych wykorzystujących osad czynny wg danych literaturowych

Diklofenak stopień redukcji [%]	Metoda oczyszczania	Literatura
75%	osad czynny, warunku mezofilowe, SRT: 10d	Zhou H. i in., 2013
72%	osad czynny, warunki termofilowe, SRT 6d	
17%	odpływ z komunalnej oczyszczalni ścieków	Heberer T., 2002
23-30%	odpływ z komunalnej oczyszczalni ścieków	Quintana J.B. i in., 2005
71%	odpływ z komunalnej oczyszczalni ścieków	Roberts P.H., ThomasK.V., 2006
75%	konwencjonalny osad czynny, HRT: 3h	Kimura K. i in., 2005
65%	konwencjonalne biologiczne oczyszczanie ścieków	Gomez M.J. i in, 2007
25%	procesy osadu czynnego	Martín J. i in., 2012
<50%	MBR, SRT: 10-55d, HRT: 0,5-4,0d	Clara M. i in., 2005
75%	konwencjonalne biologiczne oczyszczanie ścieków: SRT: 8d, HRT: 9h	Samaras V.G. i in., 2013
39%	konwencjonalne biologiczne oczyszczanie ścieków: SRT: 18d, HRT: 23h	
0-87,4%	bioreaktory membranowe	Tadkaew N. i in., 2011
22%	konwencjonalne biologiczne oczyszczanie ścieków z chemicznym usuwaniem fosforu	Bendz D. i in., 2005
9-21% / 92-98%	oczyszczanie wstępne / konwencjonalne biologiczne oczyszczanie	Larsson E. i in., 2014
45,6%	osad czynny	Pereira A.M. i in., 2015
ok. 70 %	konwencjonalne oczyszczalnie ścieków SRT: 10 d, HRT 6h,	Anumol T. i in., 2016
	konwencjonalne oczyszczalnie ścieków SRT: 6 d, HRT 6h,	
> 50%	MBBR	Tang K., i in., 2017

Tabela 3. Skuteczność usuwania ibuprofenu za pomocą wybranch metod biologicznych wykorzystujących osad czynny

Ibuprofen stopień redukcji [%]	Metoda oczyszczania	Literatura
25-53% / 99%	oczyszczanie wstępne / konwencjonalne biologiczne oczyszczanie	Larsson E. i in., 2014
99%	odpływ z komunalnej oczyszczalni ścieków	Thomas P.M., Foster G.D., 2004
53-79%	odpływ z komunalnej oczyszczalni ścieków	Tauxe-Wuersch A. i in., 2005
97%	odpływ z komunalnej oczyszczalni ścieków	Quintana J.B. i in., 2005
98%	odpływ z komunalnej oczyszczalni ścieków	Roberts P.H. i in., 2006
37%	ściek oczyszczony Hajdów, Lublin	Czerwiński J. i in., 2015
59%	ściek oczyszczony Gdańsk, Wschód	Czerwiński J. i in., 2015
42%	ściek oczyszczony, Szczecin, Pomorzany	Czerwiński J. i in., 2015
> 90	bioreaktory membranowe	Tadkaew N. i in., 2011

ścieków przez układ. Wydłużenie wieku osadu może przyczynić się do zwiększenia ilości usuwanych zanieczyszczeń Warunki te są szczególnie korzystne dla bakterii nitryfikacyjnych, bowiem ich namnażanie następuje powoli. Badania dowodzą, że bakterie nitryfikacyjne skutecznie usuwają m.in. niektóre rodzaje leków, jak np. ibuprofen, naproksen, trimetoprim, erytromycynę, a także bisfenol A i nonylofenol [Luo Y. i in., 2012]. Badania prowadzone przez Clara i in., 2005 wykazały, że usuwanie azotu przy SRT > 10 dni może poprawić skuteczność usuwania biodegradowalnych związków farmaceutycznych, takich jak np. ibuprofen, bezafibrat, bisfenol A lub naturalne estrogeny. Wartość hydraulicznnego czasu retencji natomiast, zakładana dla skutecznego efektu oczyszczania leków ze ścieków komunalnych waha się w przedziale od 0,5 do 3,0 d [Jenicek P. i in. 1996, Falas P. i in., 2012]. W badaniach przeprowadzonych przez Prasertkulsak S. i in., 2016 dotyczących usuwania pozostałości farmaceutyków w ściekach pochodzących ze szpitala metodą MBR, uznano, że przy HRT wynoszącym 3,0h większość pozostałości farmaceutyków może być efektywnie usunięta. W przypadku usuwania kwaśnych faramaceutyków, do których zaliczane są również ibuprofen i diklofenak, kluczowym parametrem decydującym o obniżeniu stężenia leku w ściekach jest odczyn pH. Kimura K. i in., 2010 przedstawiają, że obniżenie pH z 7,0 do 6,0 pozwala zredukować prawie dwukronie stężenie tych związków [Kimura K. i in., 2010].

W wyniku badań przeprowadzonych przez Falas P. i in., 2012 wykazano, że proces nitryfikacji przebiegł w pełnym wymiarze, niezależnie od analizowanego rodzaju prowadzonej metodyki badawczej dla usuwania wybranych rodzajów leków ze ścieków komunalnych. Uzyskując jednocześnie zmienne wartości usuwania farmaceutyków można wysnuć wniosek, że bakterie utleniajace amoniak lub azotyny nie odpowiadają w całości za rozkład związków farmaceutycznych, a mogą to być inne grupy mikroorganizmów autotroficznych.

2.5. Diklofenak i ibuprofen

2.5.1. Znaczenie leków

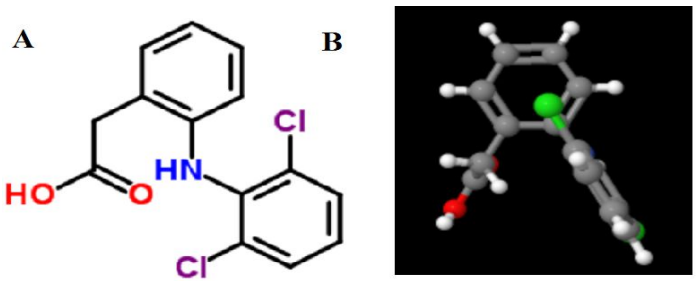
Współcześnie, dostępnych jest wiele medykamentów o działaniu łagodzącym ból, towarzyszący przy stanach zapalnych stawów, zapaleniu kaletki, dnie moczanowej, skurczach menstruacyjnych, zapaleniu ścięgien czy zwichnięciach. Wśród tego rodzaju leków, wyróżnia się dwie kategorie związków farmaceutycznych: kortykosteroidy (hormony steroidowe o działaniu przeciwzapalnym oraz niesteroidowe leki przeciwzapalne (w skrócie NLPZ) [Magill's Medical Guide, 2010]. Znaczna część tych leków jest dostępna bez recepty. Do najczęściej sprzedawanych leków NLPZ należą m.in. ibuprofen, diklofenak, naproksen, etodolak, oksaprozyna, paracetamol kwas salicylowy czy kwas mefenamowy [Magill's Medical Guide, 2010, Guzik i in., 2013]. Najczęściej wybieranymi przez konsumentów, zarówno w Polsce, Europie jak i na świecie są preparaty, których główną substancją czynną, terapeutyczną jest ibuprofen lub diklofenak [Vieno N i in., 2014, Zwiener C i in., 2002].

2.5.2. Zastosowanie, budowa, właściwości, szlaki metaboliczne diklofenaku

Diklofenak o nazwie chemicznej: kwas (2-{2-[(2,6- dichlorofenylo)amino]fenylo} octowy) (rysunek 2) jest pochodną kwasu aminofenylooctowego o silnym działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym, wynalezionym i wyprodukowanym przez szwajcarską firmę farmaceutyczną Ciba-Geigy AG (obecnie Novartis) w 1973 roku [Vieno N. i in. 2014, Lonappan L. i in., 2016]. Występuje najczęściej w postaci soli sodowej lub potasowej. Posiada szerokie spektrum działania, jako lek przeciwbólowy i przeciwzapalny w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RZS) i innych chorobach układu tkanki łącznej, zesztywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa, w ataku dny stawowej, chorobie zwyrodnieniowej stawów obwodowych i kręgosłupa. Ponadto, znajduje zastosowanie w leczeniu zmian urazowych, przeciążeniowych i zapalnych tkanek okołostawowych: ścięgien, więzadeł, mięśni, torebek stawowych, kaletek maziowych i pochewek ścięgnistych. Pomocny w nerwobólach, zespołach korzeniowych, bólach miesiączkowych, zapaleniu przydatków. W okulistyce stosowany zewnętrznie: w zapaleniu przedniego odcinka gałki ocznej i po operacji usunięcia zaćmy. Wykorzystywany przy leczeniu rogowacenia słonecznego I i II stopnia nasilenia występującego przede wszystkim na skórze twarzy i głowy [https://bazalekow.mp.pl, odczyt 04.2017].

Diklofenak, jako produkt handlowy jest dostępny w postaci tabletek lub żelu. Najbardziej znane, komercyjne nazwy leków zawierające diklofenak, jako główną substancję czynną to: *Acoflam, Algosenac, Almiral, Ana-Flex, Anthraxiton, Antiflam, Arcanafenac,*

Arthrex, Arthrifen, Arthtotec, Diclabeta, Diclac, Dicloabac, Diclodoc, Diclofenac–Ratiopharm, Diclofenbeta, Diclomex, Diclowal, Dicuno, Difen, Diklotab, Dolgit–Diclo, Eese, Effekton, Jutafenac, Monoflam, Motifene Dual, Rewodina, Sigafenac czy *Voltaren* [Vieno N. i in., 2014]. Bardzo trudno określić globalną wartość spożywanego leku. Przyczyną jest obszerna lista nazw handlowych produktów farmaceutycznych wykorzystywanych w celach medycznych i weterynaryjnych, w których diklofenak występuje jako postać terapeutyczna oraz ze względu na fakt, że większość z nich jest dostępna bez recepty [Lonappan i in. 2016]. W literaturze pojawiają się szacunkowe, przybliżone ilości sprzedanych leków w poszczególnych krajach, jak i w ujęciu globalnym [Stuer-Lauridsen F. i in., 2000, Jones O.A. i in., 2002, Calamari, D., 2003, Ferrari, B. i in., 2003, Khan, S.J., 2004, Huschek, G. i in, 2004, Strenn, B. I in, 2004, Miao, X.-S. i in., 2005, Thacker, P.D i in, 2005, Fent i in., 2006, Vieno, N. i in., 2007, Zhang i in., 2008]. Według danych przestawionych przez Zhang i in. (2008), światowa roczna konsumpcja diklofenaku wynosi około 940 ton, w oparciu o statystyki Intercontinental Marketing Services (IMS). Z ogólnej wartości, około 877 ton zostało sprzedanych w 76 największych państwach globu, co stanowi około 96% dochodu rynku farmaceutycznego [Zhang i in.,2008, Lonappan i in., 2016]. W poszczególnych państwach roczne spożycie diklofenaku wynosi: Australia – 4 tony [Khan i in., 2004], Niemcy – 86 ton [Huschek i in., 2004], Anglia – około 26 ton [Jones i in., 2002], Austria – około 6 ton [Strenn i in., 2004], Francja – około 16 ton [Ferrari i in., 2003]. Średnia roczna konsumpcja diklofenaku przypadająca na wszystkie kraje Europy szacowana jest średnio na około 180 ton [Ferrari i in., 2003]. Na kontynencie Ameryki Północnej, szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych 5-6% całkowitego rynku leków NLPZ stanowi sprzedaż dilkofenaku, w Kanadzie natomiast – 17% [Henry D., 2013]. Według prognoz analityków, konsumpcja diklofenaku będzie utrzymywała tendencję wyżową, z powodu rosnącej liczby osób cierpiących na choroby serca i zapalenie stawów, których dolegliwości mogą być minimalizowane środkami przeciwbólowymi bez recepty.



Diklofenak:
Wzór sumaryczny: $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$
Masa molowa: **296,15 g/mol**

Rysunek 2. Budowa diklofenaku, wzór strukturalny A – wzór strukturalny, B – model 3D [http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2925.html, odczyt 04.2017]

Według raportu „Fierce Pharma" z 2012 r. diklofenak znalazł się na 12 pozycji najlepiej sprzedających się leków generycznych w skali światowej. Całkowita sprzedaż substancji czynnej leku w 2011 roku wyniosła 1,61 miliarda dolarów z opłatą za sprzedaż w wysokości 15,5% w skali roku [Palmer E., 2012].

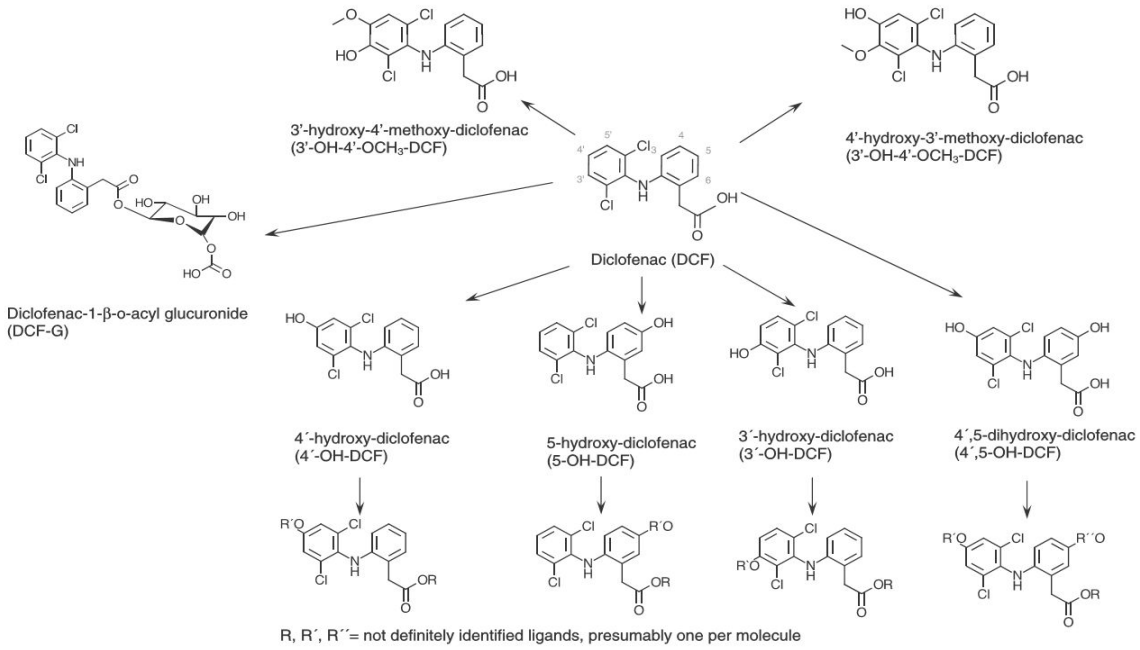
Najmniej danych dotyczących sytuacji sprzedaży i konsumpcji leków obrazują kontynenty Azji i Afryki. Rejony te charakteryzuje masowa hodowla bydła, gdzie zwierzętom do pasz podawane są leki, w celu zapobieżenia rozprzestrzenianiu się epidemii. W związku z licznymi doniesieniami, informującymi o wysokiej śmiertelności sępów żywiących się padliną zwierząt leczonych i karmionych substancjami farmaceutycznymi, istnieje przypuszczenie, że ilość związków farmaceutycznych w skali globalnej nie jest bez znaczenia [Acuña, V., 2015].

Bieżące doniesienia IMS analizujące 82% światowej populacji z 86 państw prognozują, że obecnie konsumpcja diklofenaku wynosi ponad 1400 ton w skali rocznej. Udział sprzedaży leku na kontynencie azjatyckim wynosi 39,5%, w Europie natomiast 28,7%. Przedstawione dane nie obejmują jednak produktów weterynaryjnych, w których substancją terapeutyczną jest diklofenak, stąd niemożliwe jest określenie rzeczywistej, całkowitej ilości sprzedaży i konsumpcji tego farmaceutyku [Acuña, V., 2015].

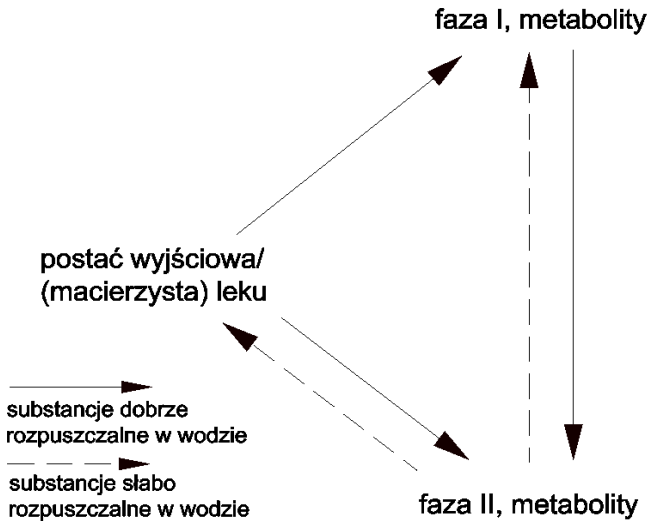
Przemiana metaboliczna diklofenaku w organizmie człowieka

Sposób przyjmowania postaci terapeutycznej diklofenaku przez konsumenta może odbywać się miejscowo, na zewnętrzną powierzchnię ciała, w formie żelu, lub doustnie, poprzez przyjęcie tabletki. Niezależnie od wybranej formy aplikacji leku, ulega on prawie całkowitej biotransformacji w ludzkim organizmie. Postać żelu adsorbuje w 6-7%. Część preparatu może zostać usunięta podczas mycia lub w wchłonięta przez ubranie. Postać leku przyjęta doustnie, w postaci tabletki jest usuwana w 65 – 70% z moczem, natomiast 20-30% z kałem, w formie macierzystej lub jako metabolity, głownie w postaci glukironianów (rysunek 3). Po podaniu do worka spojówkowego szybko przenika do tkanek przedniego odcinka oka, maksymalny czas w rogówce i spojówce wynosi ok. 30 min; nie przenika do krwi [Davies N. M. i in., 1997, Stierlin H. I in., 1979, https://bazalekow.mp.pl/, odczyt 04.2017]. Diklofenak przyjmowany doustnie jest prawie w całości metabolizowany w organizmie człowieka. Postać macierzysta leku jest wydalana w ilości poniżej 1%. Maksymalne stężenie w osoczu osiąga w ciągu 20 – 60 minut po podaniu w postaci tabletek o natychmiastowym uwalnianiu, 2 – 4 h w postaci czopków lub tabletek o przedłużonym uwalnianiu, w płynie stawowym 3 – 6 h. Po podaniu leku w postaci o przedłużonym uwalnianiu stężenie maksymalne jest mniejsze. W 99,7% wiąże się z białkami osocza, głównie albuminami [https://bazalekow.mp.pl, odczyt

04.2017]. Faza I rozkładu leku obejmuje 6 metabolitów, które zostały zidentyfikowane w osoczu, moczu oraz kale. W wyniku metabolizmu fazy II z udziałem kwasu glukuronowego, tauryny i siarczanów tworząc się koniugaty z diklofenakiem (rysunek 4). Stanowią one do 11% podanej dawki [Vieno N., i in., 2014, Davies N. M. i in., 1997, Stierlin H. I in., 1979]. Według Światowej Organizacji Zdrowia, dzienna dawka diklofenaku wynosi 100 mg, co pozwala oszacować, że mniej niż 1mg przyjętego związku zostanie usunięty w postaci macierzystej, natomiast około 11% stanowią koniugaty. Obie fazy rozkładu diklofenaku przebiegają według tego samego mechanizmu, niezależnie od formy aplikacji tego leku.



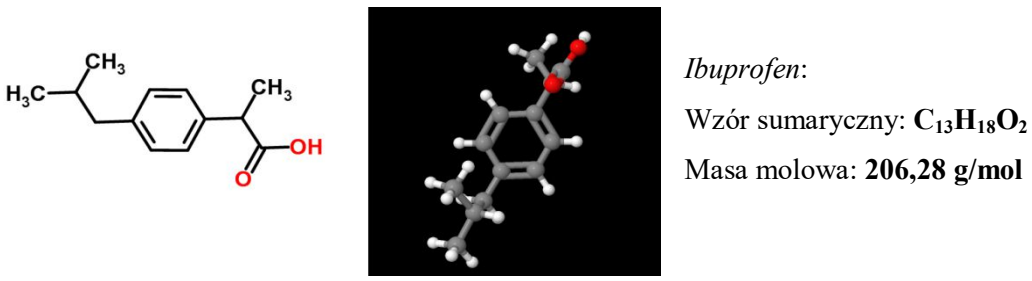
Rysunek 3. Ścieżka metaboliczna diklofenaku w ludzkim ciele [Blum W. i in., 1996, Davies N.M. i in., 1997, Faigle J. i in., 1988, Stierlin H., 1979, Vieno N., 2016]



Rysunek 4. Schemat przebiegu procesu metabolizmu postaci wyjściowej (macierzystej leku) [Halling-Sorenson, B. i in., 1998]

2.5.3. Zastosowanie, budowa, właściwości, szlaki metaboliczne ibuprofenu

Ibuprofen (rysunek 5) o nazwie chemicznej (kwas 2-[4-(2-metylo-propylo)fenylo] propanowy] jest pochodną kwasu propionowego i należy do kategorii niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym. Jest dostępny bez recepty [https://bazalekow.mp.pl, odczyt, 04.2017, Murdoch R.W. i in., 2015]. Został wynaleziony w Nottingham w Anglii przez dr Stuarta Adamsa, Johna Nicholsona i Collina Burrowsa [Rainsford K.D., 2015]. Jego właściwości pozwalają na usuwanie lub minimalizowanie dolegliwości bólowych o różnej etiologii, o małym i średnim nasileniu, w tym bóle migrenowe i napięciowe głowy, zębów, mięśniowe, kostne i stawowe, bóle okolicy lędźwiowo-krzyżowej. Koi dolegliwości związane z bólem miesiączkowym oraz pomocny w zwalczaniu gorączki. Ibuprofen, jako lek przeciwbólowyi przeciwzapalny znajduje zastosowanie w chorobie zwyrodnieniowej stawów obwodowych i kręgosłupa oraz innych chorobach reumatycznych. Dodatkowo także w leczeniu zmian pourazowych, przeciążeniowych i zapalnych tkanek okołostawowych: ścięgien, więzadeł, mięśni, torebek stawowych, kaletek maziowych i pochewek ścięgnistych. Jako produkt medyczny jest on stosowany w postaci mieszaniny racemicznej lub deksibuprofenu, co pozwala na zmniejszenie przyjęcia dawki. Wchłanianie z przewodu pokarmowego następuje bardzo szybko, częściowo w żołądku, a w znacznej części w jelicie cienkim, maksymalnie w czasie 1-2 h po podaniu tabletki, oraz maksymalnie w ciągu 1 h po podaniu zawiesiny. Metabolizm ibuprofenu zachodzi w wątrobie, wiążąc się w 99% w białkami osocza. Jest on wydalany z moczem w postaci nieczynnych metabolitów. Całkowita elimnacja z krwi następuje po 24 h [https://bazalekow.mp.pl, odczyt 04.2017].



Ibuprofen:
Wzór sumaryczny: **$C_{13}H_{18}O_2$**
Masa molowa: **206,28 g/mol**

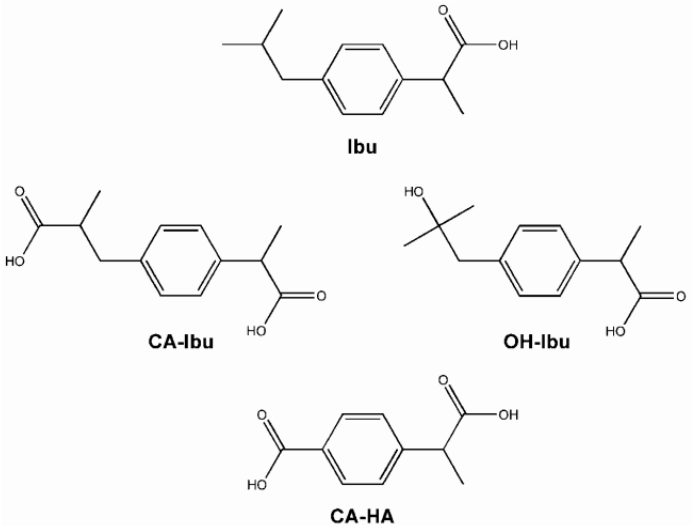
Rysunek 5. Budowa ibuprofenu, wzór strukturalny A – wzór strukturalny, B – model 3D [http://www.chemspider.com, odczyt 04.2017]

Ibuprofen, jako produkt handlowy jest dostępny w postaci tabletek, żeli, kremów, kapsułek, zawiesiny, czopków lub syropów. Na rynku polskim, ibuprofen znajduje się w preparatach o nazwach handlowych: *Brufen, Bufenik, Dolgit, Ibalgin, Ibufen, Ibum, Ibumax, Ibupar, Ibuprofen AFL, Ibuprofen forte, Ibuprofen Aflofarm, Ibuprofen Hsaco, Ibuprofen Teva*

MAX, Ibuprom, Iburapid, Ifenin, Kidofen, Metafen żel Forte, MIG, Nurofen, Nurofen Express Forte, Pedea, Pediprofen.

Ibuprofen, jest jedną z bezpieczniejszych substancji czynnych, która w porównaniu z innymi lekami z tej grupy charakteryzuje się niskim ryzykiem wystąpienia skutków ubocznych. W Wielkiej Brytanii i Stanach Zjednoczonych oszacowano bezpieczeństwo stosowania leku, przy założeniu, że dzienna dawka nie przekracza 1200 mg/L a czas dawkowania trwa od 7 do 10 dni [Rainsford K.D., 2015]. Fakt ten może przyczyniać się do nadmiernej konsumpcji tego leku, co czyni go najczęściej stosowanym lekiem z grupy NLPZ. Ibuprofen zajmuje 3 miejsce w rankingu najlepiej sprzedających się leków na świecie [Murdoch R.W. i in., 2015]. Największymi producentami leków są kraje rozwinięte. Wśród nich, pięć państw: Stany Zjednoczone, Japonia, Niemcy, Wielka Brytania i Francja obejmują 2/3 globalnej produkcji związków farmaceutycznych. Chiny i Indie natomiast odgrywają dominującą rolę w produkcji tanich leków [Chander V. i in., 2016]. W odniesieniu do konsumpcji leków, roczne spożycie ibuprofenu w 2000 r. w Niemczech wyniosło 300 ton, w Wielkiej Brytanii 120 ton, w Polsce - 58 ton. W danych przedstawionych przez Lindqvist N. i in. (2005), w 2002r. ibuprofen był najczęściej kupowanym lekiem przeciwbólowym, a jego spożycie w przeliczeniu na jednego mieszkańca w skali roku wynosiło ok 13,5 g.

Szacuje się, że od 8,9 do 14% przyjmowanego doustnie leku jest wydalana z organizmu w niezmienionej postaci lub w postaci łatwo zhydrolizowanego koniugatu glukuronidu [D'Ascenzo i in., 2003, Rudy i in., 1991, Lee i in., 1985]. Całkowita biodegradacja zachodzi, gdy dana forma związku ulega rozkładowi do dwutlenku węgla (CO_2) i wody (H_2O). Proces ten nazywa się mineralizacją. Niekompletna lub częściowa biodegradacja obejmuje koniugację farmaceutyczną i degradację związku do metabolitu (występuje również w ludzkim organizmie). Koniugacje farmaceutyczne występują zwykle przed wydalaniem z organizmu człowieka. Z tego powodu związek staje się bardziej polarny i może wydalać się łatwiej z organizmu. Metabolizm ibuprofenu prowadzi do powstawania hydroksylo-ibuprofenu (OH-Ibuprofenu), karboksybubufebu (CA-Ibuprofenu) i kwasu karboksyhydratropowego (CA-HA) (rysunek 6).



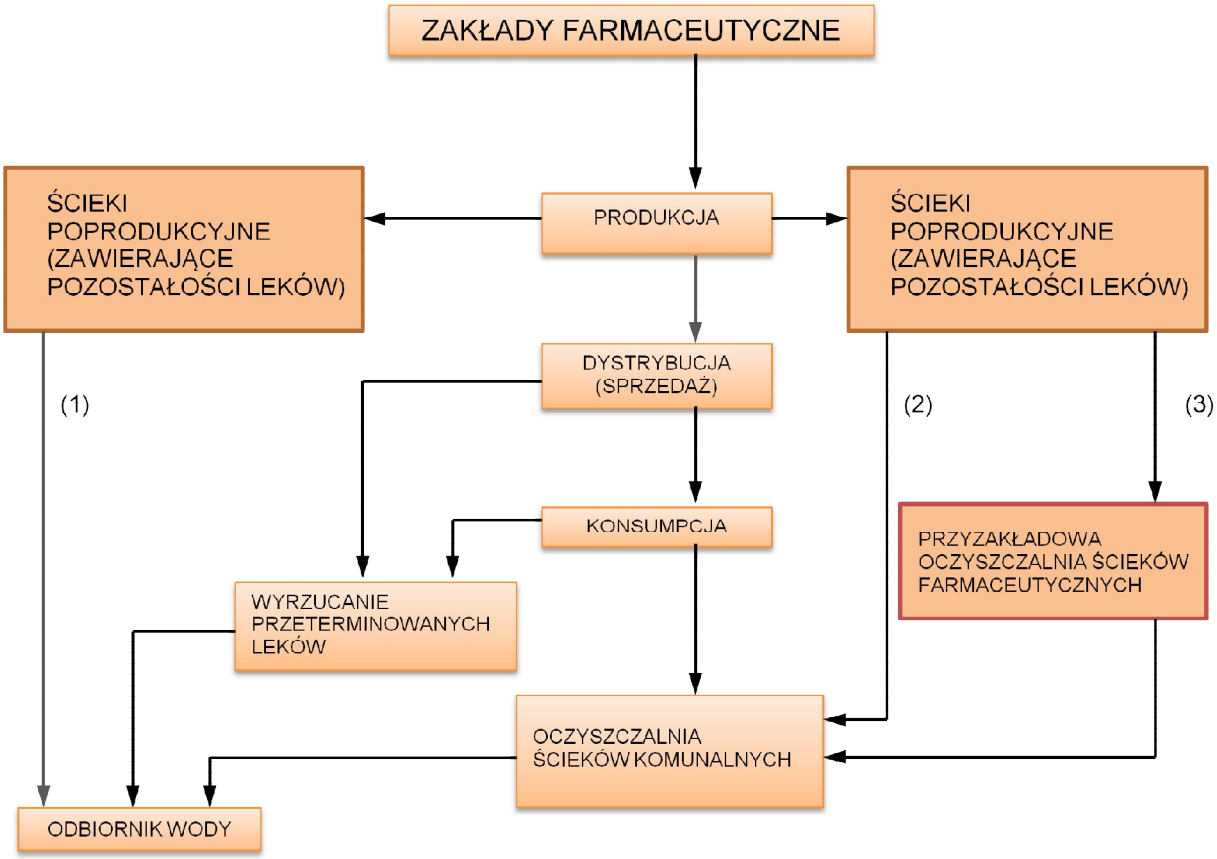
Rysunek 6. Wzory strukturalne ibuprofenu i jego metabolitów [Zwiener C., i in., 2002, Marco-Urrea E. i in., 2009, Chen Y. i in., 1994]

2.6. Biologiczne metody usuwania zanieczyszczeń farmaceutycznych ze ścieków pochodzących z zakładów przemysłowych

2.6.1. Charakterystyka zakładów farmaceutycznych

Ze względu na dużą ilość produkowanych leków, wyzwaniem staje się zagospodarowanie i unieszkodliwienie ścieków poprodukcyjnych z zakładów farmaceutycznych. Skład tych ścieków jest trudny do scharakteryzowania ze względu na specyfikę i rodzaj produkowanych leków przez dany zakład. W ściekach tych dominującą rolę odgrywają związki organiczne (surowce i półprodukty np. benzen, anilina, nitrozwiązki benzenowe oraz pozostałości gotowych produktów – leków), związków azotu i fosforu, chlorków, siarczanów, fenolu, związków arsenu, chromu, oraz niekiedy także cyjanków. Struktura leków, ze względu na ich przeznaczenie i działanie terapeutyczne charakteryzuje się dużą stałością metaboliczną. Ich skład wykazuje wysoką toksyczność oraz obniża zdolność do biodegradacji [Halling-Sørensen B. i in., 1998, Makuch A., 2009]. Ze względu na ich dużą uciążliwość, ścieki pochodzące z zakładów farmaceutycznych nie mogą być odprowadzane bezpośrednio do środowiska, jak również wprowadzane do systemu kanalizacji bez wcześniejszego podczyszczania. Ścieki poprodukcyjne zazwyczaj po odzyskaniu części rozpuszczalników, usunięciu zawiesin, emulsji, korekcie pH oraz rozcieńczeniu wodami pochłodniczymi kierowane są do oczyszczalni biologicznej (rysunek 7). Tu następuje rozkład związków organicznych oraz usunięcie substancji biogennych (azotu i fosforu). Obecność czynników bakteriostatycznych oraz bakteriobójczych takich jak fenole, krezole, azydki, sulfonamidy, cyjanki ograniczają efektywność rozkładu farmaceutyków za pomocą

biologicznych procesów [Makuch A., 2009]. Skład i ilości ścieków pochodzących z zakładów farmaceutycznych, przedstawiono w tabeli 4.



Rysunek 7. Sposoby odprowadzania ścieków poprodukcyjnych z zakładów farmaceutycznych [opracowanie własne]
(1) **bezpośrednio do odbiornika wody,** (2) **do oczyszczalni ścieków komunalnych,**
(3) **do przyzakładowej oczyszczalni ścieków a następnie do kanalizacji miejskiej**

Ilość substancji farmaceutycznych obecna w ściekach poprodukcyjnych koncernów przemysłowych (tabela 4) jest zależna od wielkości danego zakładu a także od rodzaju produkowanych leków. Niekiedy również na wynik zwiększonego stężenia danego rodzaju leku w ściekach przemysłowych może mieć wpływ spożywanie leków przez pracowników danego przedsiębiorstwa. W wyniku połączenia sieci technologicznej z sanitarną w odcinku przed zrzutem do miejskiej sieci komunalnej. Zakłady, w których stwierdzono największe ilości paracetamolu i ibuprofenu produkują leki zarówno na receptę jak i bez recepty oraz suplementy diety. Ponadto wytwarzane są w nich produkty stomatologiczne oraz kosmetyki w przeróżnych formach: tabletek, maści, kremów, płynów, aerozoli. Mimo wyższych stężeń wybranych medykamentów w latach 2012/2013 w stosunku do lat 2014/2015 można zauważyć wzrastającą tendencję konsumpcji leków. Wpływ na kształtujący się wzrost popytu na leki może być podyktowany porą roku sprzyjającą przeziębieniom i różnego rodzaju chorobom, jak również wielkością produkcyjną danego zakładu farmaceutycznego [Zając A. i in., 2016].

Tabela 4. Charakterystyka ścieków z wybranych zakładów farmaceutycznych

		Zakład farmaceutyczny					
Parametr	**Jednostka**	**A[a]**	**B[b]**	**C[c]**	**D[d]**	**E[e]**	**F[f]**
ChZT	[mg/L]	2000 - 10000	2000 - 10000	1000 - 10000	1901	2800	375 - 32500
BZT	[mg/L]	1000-2500	500-2500	500-2500	381	1600	200-6000
BZT_5/ChZT	-	0,5-0,25	0,25	0,25	0,2	0,57	0,1-0,6
OWO	[mg/L]				860		860-4940
temperatura	[°C]	25-80	25-80	25-80			
pH	-		1,0 - 6,0	1,0 - 6,0	5,6		3,9-9,2
związki cykliczne				śladowe			
związki heterocykliczne				śladowe			
organochloryny				śladowe			
zawiesina	[mg/L]	200-500	200-500	200-500	40,6	880	675-9320
N_{og}	[mg/L]	500 - 1 000	500 - 1 000	500 -1500			
N_{org}	[mg/L]						
$N\text{-}NH_4$	[mg/L]				4,8		
$N\text{-}NO_3$	[mg/L]				500		
P_{og}	[mg/L]	50 - 250		50 - 250			
$P\text{-}PO_4$	[mg/L]						
SO_4^{2-}	[mg/L]		5000 - 25000				890-1500
CO_3^{2-}	[mg/L]		0		0		
HCO_3^-					112		
Cl^-	[mg/L]				3380		760-4200
Zn^{2+}	[mg/L]		1 000- 5 000				
$CaCO_3$	[mg/L]					145	
sole	[mg/L]		10000 - 25000				
chlorobenzen			500 - 3000				
anilina	[mg/L]		500 - 1000				
fenol				śladowe		100	
nienasycone kwasy tłuszczowe	[mg/L]			śladowe			
antybiotyki	[µg/L]		1 - 100	1-100			

[a] - ogólne parametry ścieków pochodzących z zakładów farmaceutycznych produkujących biofarmaceutyki [Li Xin i in., 2015]
[b] – ogólne parametry ścieków pochodzących z zakładów farmaceutycznych produkujących farmaceutyki [Li Xin i in., 2015]
[c] – ogólne parametry ścieków pochodzących z chińskich zakładów farmaceutycznych [Li Xin i in., 2015]
[d] - charakterystyka ścieków z zakładu farmaceutycznego [Melero J.A. i in., 2009]
[e] – średnie miesięczne wartości parametrów przykładowej charakterystyki ścieków farmaceutycznych [Saleem M., 2007]
[f] – przykładowe wartości parametrów ścieków pochodzących z zakładów farmaceutycznych [Gadipelly Ch. i in., 2014]

Na podstawie opublikowanego w Dzienniku Urzędowym Ministra Zdrowia Obwieszczenia Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych z dnia 30 marca 2017 r. w sprawie ogłoszenia Urzędowego Wykazu Produktów Leczniczych Dopuszczonych do Obrotu, na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej,

stan na dzień 1 stycznia 2017 r. w tabeli 5 zaprezentowano produkty lecznicze dopuszczone do obrotu w zależności od rodzaju organu i procedur wydających decyzję [Dz.U. Min. Zd. z 2017r. poz. 45].

Tabela 5. Produkty lecznicze dopuszczone do obrotu na terenie Polski

Produkty lecznicze dopuszczone do obrotu w ramach procedury narodowej oraz procedur europejskich (załącznik nr 1 ww. Obwieszczenia)	**10 220** produktów
Produkty lecznicze dopuszczone do obrotu przez Komisję Europejską (załącznik nr 2 ww. Obwieszczenia)	**2 339** produktów
Produkty lecznicze posiadające pozwolenie na import równoległy (załącznik nr 3 ww. Obwieszczenia)	**3 640** produktów
Produkty lecznicze weterynaryjne dopuszczone do obrotu w ramach procedury narodowej oraz procedur europejskich (załącznik nr 4 ww. Obwieszczenia)	**1 406** produktów
Produkty lecznicze weterynaryjne dopuszczone do obrotu przez Komisję Europejską, a także produkty lecznicze weterynaryjne posiadające pozwolenie na import równoległy (załącznik nr 5 i 6 ww. Obwieszczenia)	**343** produkty

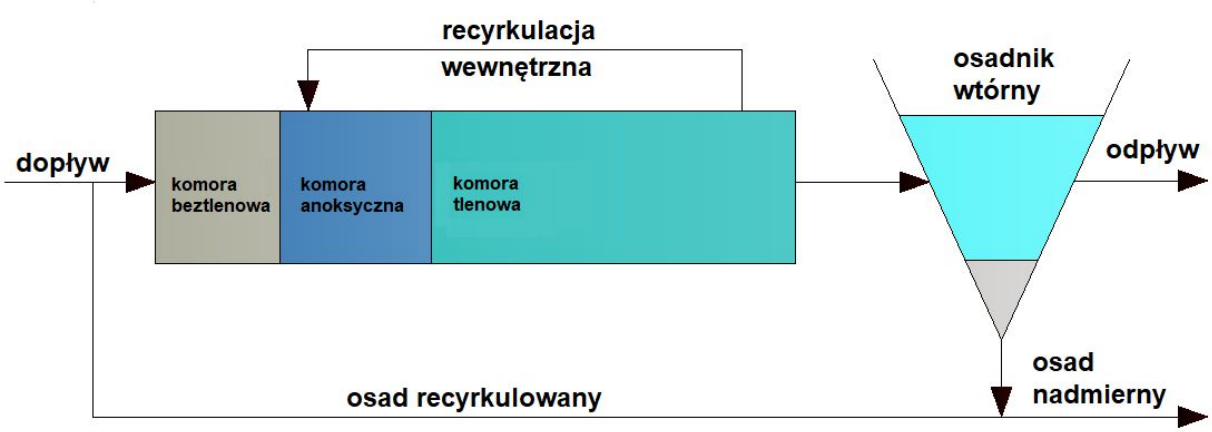
2.6.2. Sposoby i skuteczność usuwania zanieczyszczeń farmaceutycznych ze ścieków

Sposób działania substancji farmaceutycznych polega na stymulowaniu bądź hamowaniu fizjologicznych reakcji organizmu. Jednak farmaceutyki posiadają również negatywny wpływ na świat organizmów żywych, w momencie przedostawania się do środowiska przyrodniczego [Khetan S.K. i in., 2007, Webb S. i in., 2003]. Niektóre źródła podają informacje, że analizowane poziomy stężeń medykamentów i ich metabolitów w wodach nie stanowią zagrożenia dla zdrowia ludzi [Webb S. i in., 2003, Schwab B.W. i in., 2005]. Z drugiej jednak strony wielu naukowców z całego świata [Felis E. i in., 2005, Khetan S.K. i in., 2007, Stackelberg P.E. i in., 2004] wskazuje, że pewne grupy leków, już w małych dawkach przyczyniają się do niebezpiecznych deformacji i zaburzeń w funkcjonowaniu żywych organizmów. Wśród nich znajdują się m.in. antybiotyki, leki hormonalne a także leki psychotropowe oraz większość leków, których kupno jest możliwe jedynie na receptę. Badania potwierdzają, że mogą one być przyczyną zmiany płci, genotypu, a także wywoływać zmiany alergiczne. Ponadto posiadają zdolność do bioakumulacji (np. estrogen 17α−etinylestradiol (EE2) oraz diklofenak) [Lai K. i in., 2002, Zając A. i in., 2015].

Usuwanie leków transportowanych wraz ze ściekami bytowo-gospodarczymi do miejskich oczyszczalni odbywa się najczęściej na drodze biologicznej, wykorzystującej redukcję zanieczyszczeń za pomocą mikroorganizmów osadu czynnego. Aktywne formy leków jak i ich metabolity wraz ze ściekami oczyszczonymi są odprowadzane do wód powierzchniowych. Dlatego też poszukuje się alternatywnych metod, mających na celu ocenę

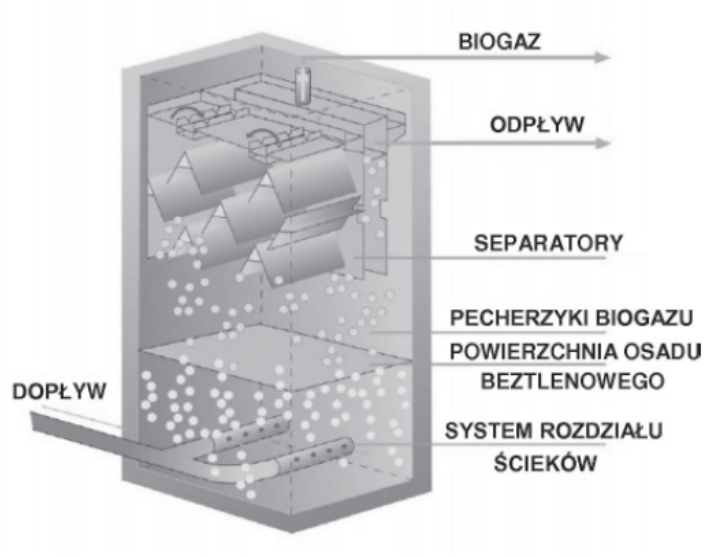
stopnia redukcji różnych grup zanieczyszczeń w różnych technologiach prowadzenia procesu biologicznego usuwania substancji aktywnych [Marciocha D. i in., 2009, Kujawa-Roeleveld K. i in., 2008, Yu J.T. i in., 2006].

Odkrycie i poznanie właściwości mikroorganizmów osadu czynnego przyczyniło się do projektowania układów i procesów umożliwiających rozkład substancji biogennych. W zależności zawartości poszczególnych pierwiastków w ściekach, w biologicznych procesach oczyszczania ścieków można uzyskać nitryfikację, nitryfikację i denitryfikację, usuwanie fosforu, usuwanie fosforu, nitryfikację i denitryfikację. Na rysunku 8 zaprezentowano przykładowy 3-stopniowy system Bardenpho, najpopularniejszy system oczyszczania w Polsce, umożliwiający jednoczesne usuwanie związków azotu i fosforu przy zapewnieniu odpowiedniej ilości związków organicznych.



Rysunek 8. Przykładowy schemat 3-stopniowego systemu Bardenpho [opracowanie własne]

Szyprowska i in. wykonali analizę stopnia redukcji zanieczyszczeń lekowych pochodzących z zakładów farmaceutycznych w reaktorach typu UASB [Szyprowska M. i in., 2011] (rysunek 9). Proces rozkładu związków organicznych zachodził w momencie kontaktu ścieków surowych ze złożem - beztlenowym osadem czynnym w warunkach fermentacji mezofilowej przy jednoczesnej redukcji ChZT i wydzielaniu się biogazu. Po ponad 2,5 miesiącach badań zaobserwowano redukcję związków organicznych, stabilne stężenie osadu w bioreaktorze, niewielki przyrost osadu beztlenowego. Stwierdzono, że odczyn pH ścieków odpływających trzykrotnie przekraczał dopuszczalny poziom. Pięćdziesięcioprocentowy próg redukcji $ChZT_{Cr}$ doprowadził do wniosku, że jednostkowe obciążenie reaktora ładunkiem zanieczyszczeń organicznych nie powinien przekraczać 3 $gO_2/L \cdot d$ [Szyprowska M. i in., 2011, Zając A. i in., 2015].



Rysunek 9. Schemat reaktora UASB [Szyprowska M. i in., 2011]

Jak wskazują wyniki analiz, najbardziej podatne na usuwanie są niektóre leki przeciwbólowe (np. ibuprofen, ketoprofen, aspiryna), których skuteczność redukcji może przekraczać ponad 90%. Diklofenak natomiast ulega biodegradacji tylko w 75% w zimie, natomiast do 67% w lecie. Znacznie bardziej odporne na usuwanie są grupy antybiotyków oraz leków hormonalnych (do 15%) [Khetan S.K. i in., 2007, Kruszelnicka I. i in., 2012, Taewoo Y., 2007]. W wyniku ich działania dochodzi do powstawania mutacji genetycznych przyczyniających się do rozwoju kultur bakteryjnych lekoopornych [Kummerer K. i in., 2003]. Obecność leków wpływa także na zmiany dokonujące się w mikrofaunie osadu czynnego w oczyszczalniach ścieków [Kummerer K. i in., 2003]. Efektywność biodegradacji nie jest stała. Jej wartość zależy od wielu parametrów, m.in. od temperatury procesu, wieku osadu, napowietrzania, pory dnia, stężenia danego farmaceutyku, a także od rodzaju i składu ścieków dopływających do oczyszczalni ścieków. Według badań przeprowadzonych w Waszyngtonie w roku 2008r. mających na celu analizę skuteczności usuwania wytypowanych 172 związków farmaceutycznych, dwustopniowa tradycyjna oczyszczalnia ścieków usuwała jedynie 1/5 wszystkich zanieczyszczeń lekowych poniżej poziomu detekcji [Lubliner B. i in., 2010, Zając A. i in., 2015].

Metodą, która potencjalnie może stać się skuteczna w usuwaniu substancji lekowych jest fotodegradacja. Proces fotokatalitycznego utleniania przebiega przy udziale promieniowania UV lub światła słonecznego, w obecności półprzewodników. Mechanizm procesu jest wolnorodnikowy, polega na generowaniu wysoce reaktywnych, a przy tym mało selektywnych rodników hydroksylowych (HO^*), należących do jednych z najsilniejszych utleniaczy. Są one zdolne do rozkładu prawie wszystkich substancji organicznych, łącznie z bakteriami. W wyniku tego procesu powstają produkty przejściowe CO_2, H_2O oraz związki

nieorganiczne. Jako katalizatory najczęściej wykorzystuje się tlenki metali: np. TiO_2, ZnO, SnO_2 oraz siarczki: ZnS, CdS [Adamek E. i in., 2011]. Najpopularniejszym i najczęściej wykorzystywanym jest związek TiO_2 P25 składający się w 70% z anatazu i w 30% z rutylu, (firma Aeroxide® Evonik Degussa GmbH- katalizator). Posiada on dużą aktywność, stabilność fotochemiczną. Jest odporny na zmiany pH środowiska, co pozwala na przeprowadzenie procesu w zadanych warunkach ciśnienia i temperatury oraz nie powoduje rozwoju mikroorganizmów. Mimo, że metoda fotokatalitycznego rozkładu może osiągać wysoką skuteczność, nie zawsze udaje się uzyskać całkowity rozkład zanieczyszczeń. Skuteczność procesu jest jednak uzależniona od wielu parametrów, m.in. rodzaju ścieku, jego źródła pochodzenia, ilości fotokatalizatora, czasu naświetlania czy obecności innych związków.

Dodanie TiO_2 w czasie 120 minut oraz przy naświetlaniu światłem słonecznym skutkowało 80% usunięciem ze ścieków związków takich jak atenolol oraz propronolol [Ioannou L.A. i in., 2011]. Usuwanie betablokerów (atenolol, metoprolol, propranolol) po 240 minutach fotokatalizy z udziałem TiO_2 doprowadziło do całkowitej mineralizacji do CO_2 i wody. Proces przebiegał na powierzchni TiO_2 z udziałem OH^*. W wyniku tego nastąpiło rozerwanie bocznego łańcucha i przyłączenia grup hydroksylowych. Acetaminofen natomiast o stężeniu 100 umol/L uległ redukcji fotokatalitycznej w 95% w ciągu 100 minut przy stężeniu 1,0 g/L TiO_2 [Czech B., 2012]. Karbamazepina o stężeniu 5 mg/L uległa 70% redukcji na materiałach z nanowłókien tytanowych z dodatkiem TiO_2 i potasu już w pierwszym cyklu oczyszczania. Usuwanie diklofenaku przyniosło optymistyczne rezultaty przy wykorzystaniu TiO_2 i nanorurek węglowych podczas naświetlania promieniami UV w obecności 50% objętości O_2 [Czech B., 2012].

Dodatek TiO_2 wykorzystany podczas fotokatalitycznego ozonowaniam, którego celem jest wyłapywanie elektronów przez O_3, z użyciem związku TiFeC o właściwościach magnetycznych okazało się skuteczne w usuwaniu metoprololu. Obecność TiO_2 przy ozonowaniu kwasu klofibrowego zwiększył jego mineralizację w pierwszym etapie reakcji [Czech B., 2012].

Analizę degradacji acetaminofenu, antypiryny, kofeiny, metoprololu i bisfenolu A przeprowadzono z wykorzystaniem materiałów o właściwościach magnetycznych TiO_2/Fe_3O_4 oraz $TiO_2/SiO_2/Fe_3O_4$. Mimo nieco niższej skuteczności, pozytywnym aspektem tej metody był łatwy odzysk fotokatalizatorów, głównie $TiO_2/SiO_2/Fe_3O_4$ [Zając. A. i in., 2015].

Kolejną testowaną obecnie przez naukowców metodą mającą poprawić efektywność usuwania farmaceutyków jest elektrokoagulacja. Polega ona na wprowadzeniu do analizowanego roztworu (w tym przypadku wody lub ścieków) jonów metali, z których zbudowane są elektrody (głównie żelaza i glinu). Anoda, pod wpływem prądu elektrycznego

ulega roztwarzaniu, natomiast na katodzie wydziela się wodór, który wspomaga proces flotacji skoagulowanych cząstek [Sires I. i in., 2012, Zając A. i in., 2015].

Podczas gdy do procesu elektrokoagulacji używana jest anoda z żelaza, Fe^{2+} jest rozpuszczane w ściekach zgodnie z reakcją: $Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2e^-$, na katodzie następuje uwolnienie wodoru wg reakcji: $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2(g)$ lub wody: $2H_2O + 2e^- \rightarrow 2OH^- + H_{2(g)}$. Nierozpuszczalny wodorotlenek żelaza (II) strącany jest przy pH > 5,5. Wodorotlenek żelaza zachowany w równowadze z Fe^{2+} powoduje podwyższenie pH do 9,5. Mogą również tworzyć się monomery w postaci $Fe(OH)^+$, $Fe(OH)_2$ i $Fe(OH)^{3-}$ przy wyższych wartościach pH. W obecności tlenu rozpuszczony Fe^{2+} jest utleniany do $Fe(OH)_3$, zgodnie z reakcją: $4\ Fe^{2+} + 10\ H_2O + O_{2(g)} \rightarrow 4\ Fe(OH)_3(s) + 8H^+$. W przypadku, gdy elektrokoagulacja przebiega z glinem, reakcja prowadzi do powstania rozpuszczalnego Al^{3+}, który jest przetwarzany do rozpuszczalnego $Al(OH)^{2+}$ oraz $Al(OH)_2^+$ w środowisku kwaśnym, nierozpuszczalny $Al(OH)_3$ przy pH 6-9 oraz rozpuszczalny $Al(OH)^{4-}$ w warunkach alkalicznych. Związki rozpuszczalne są przetwarzane w nierozpuszczalne kłaczki wodorotlenku glinu (III), które adsorbują jony oraz rozkładalne składniki organiczne następnie formowane w większe cząstki, koagulują przy neutralnym pH [Sires I. i in., 2012, Zając A. i in., 2015].

Obecnie, coraz częściej wykorzystywaną metodą do walki z nowo pojawiającymi się zanieczyszczeniami chemicznymi w środowisku jest adsorpcja. Badania wskazują, że węgiel aktywny uzyskany z odpadów z korka aktywowany chemicznie parą wodną i K_2CO_3, osiąga wyższe wartości adsorpcji oraz cechuje się większą pojemnością adsorpcyjną niż materiał uaktywniany samym związkiem węglanu potasu. Dzięki bardziej rozwiniętej strukturze mikroporowatej oraz szerokiemu zakresowi pracy dla parametru pH w zakresie od 2 do 11, materiał ten w 100% był zdolny zaadsorbować ibuprofen [Mestre A.S. i in., 2007]. Inny lek z grupy przeciwbólowych osiągnął wysoką skuteczność redukcji w wyniku adsorpcji na materiale wykonanym z odpadów moreli, aktywowanym chemicznie za pomocą chlorku cynku ($ZnCl_2$) [Onal Y. i in., 2007].

W badaniu mającym na celu adsorpcję PPCPs (ang. *Pharmaceutical and Personal Care Products*) i nutrientów w ściekach miejskich, w bioreaktorze membranowym dodano postać sproszkowanego węgla aktywnego (PAC- ang. *Powdered Activated Carbon*) o stężeniu 1 g/L. W efekcie, uzyskano redukcję parametru chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) o 95%, azotu amonowego o 70-80% oraz fosforu w granicach 80% [Guedidi H. i in, 2014, Serrano D. i in., 2001]. Usunięcie naproksenu i erytromycyny następowało do wartości z zakresu 42-67% bez dodatku PAC natomiast redukcja ibuprofenu, roksitromycyny i fluoksetyny osiągnęła 71-91%. Dodatek PAC spowodował obniżenie poziomu karbamazepiny, diazepamu, diklofenaku i trimetopromu o 85% [Serrano D. i in., 2001]. Stosowanie granulowanego węgla aktywnego

(GAC- ang. *Granular Activated Carbon*), jak wskazują badania jest skuteczne, ale jego zdolność adsorpcyjna maleje w miarę przepuszczonej objętości próbki ścieków (ze względu na rosnącą zawartość innych związków organicznych zawartych w ściekach). Trwająca 150 dni filtracja na piasku kwarcowym okazała się skuteczna do zatrzymania estronu i 17-α etynyloestradiolu [Ho L. i in., 2011]. GAC natomiast nie sprawdził się, jako materiał adsorbujący primidon, DEET czy kofeinę [Yang X. i in., 2011, Zając A. i in., 2015].

Kanadyjscy naukowcy [Yu Z. i in., 2008] podjęli badania w zakresie usuwania naproksenu, karbamazepiny (PPACs) oraz nonylfenolu (EDC) w zakresie stężeń od 80 do 100 ng/L na drodze adsorpcji na węglu aktywnym. Najlepsze rezultaty adsorpcji osiągnęła karbamazepina, natomiast najmniejsze przedstawiciel EDC – nonylfenol. Porównanie izoterm adsorpcji dla związków docelowych, jak i w przypadku innych tradycyjnych mikrozanieczyszczeń sugeruje, że naproksen i karbamazepinę można skutecznie usunąć stosując tę samą dawkę wykorzystywaną do usuwania związków zapachowych przy bardzo niskich stężeniach [Yu Z. i in., 2008].

Inną, często stosowaną grupą adsorbentów PPCPs są gliny, tj. montmorylonit, bentonity z czwartorzędowymi kationami alkiloamoniowymi bądź też materiały mikroporowate, tzw. *pillared clays*. Podczas badań nad usuwaniem kwasu salicylowego, kwasu klofibrowego, karbamazepiny i kofeiny skuteczną metodą okazało się modyfikowanie za pomocą Co^{2+}, Cu^{2+} lub Ni^{2+} (podczas, którego następuje zaindukowanie oddziaływań podobnych do kompleksowania). Dodatek Ni^{2+} wzmacniał adsorpcję kwasu salicylowego i klofibrowego, a Co^{2+} - kofeiny. Badania ujawniły, że inkorporowanie Cu^{2+}, Co^{2+} lub Ni^{2+} zwiększa zdolność adsorpcyjną w kwaśnym i obojętnym pH, szczególnie w zakresie stężeń na poziomie ppm [Czech B., 2012, Zając A. i in., 2015].

Jak wskazują badania naukowców ze Stanów Zjednoczonych i Chin, wiele PPCPs, np. naproksen czy trimetoprim jest skutecznie adsorbowana na minerałach glebowych. Inne leki, jak np. diklofenak, ibuprofen czy sulfametoksazol, ze względu na słaby proces adsorpcji, mogą być wymywane z gleb [Lin K. i in., 2011]. Degradacja analizowanych substancji farmaceutycznych zależy od aktywności mikroorganizmów, dostępności tlenu, rodzaju gleby oraz składu zanieczyszczeń. W warunkach beztlenowych diklofenak i ibuprofen nie są trwale adsorbowane, stąd może istnieć ryzyko wymywania obu tych substancji z gleby w wyniku nawadniania. Kanadyjscy naukowcy zajmujący się analizą osadu czynnego z oczyszczalni ścieków, który jest wykorzystywany rolniczo, zalecają wstępne przemycie wodą w celu usunięcia z osadu słabiej zaadsorbowanych PPCPs [Topp E. i in., 2008, Zając A. i in., 2015].

Naukowcy z Nowej Zelandii Han J., Qiu W., Meng S., Gao W. [2012] poddali badaniom poliamidy alifatyczne, jako adsorbenty 17α-etynyloestradiolu, sytnetycznego

hormonu o wysokim potencjale estrogennym [Han J. i in., 2012]. Wykonane analizy wskazały, że materiał ten posiada podobne właściwości i daje zbliżone wyniki jak komercyjnie stosowana żywica AMBERLITE XAD4, mimo odmiennej struktury i znacznie mniejszej wielkości powierzchni. Zapewnienie kontaktu EE2 z 24,1L złoża zawierającego 1,0g PA612 (poliamidu) w czasie 0,8 – 1 minut pozwoliło na usunięcie 30 mg/L EE2 do poziomu poniżej granicy oznaczalności HPLC [Han J. i in., 2012, Zając A. i in., 2015].

Wysoką skutecznością selektywnego usuwania naproksenu z wody charakteryzuje się krzemionka. Mezoporowate krzemiany typu MCM-41 z dodatkiem niklu pozwalają uzyskać wysoką skuteczność adsorpcji tej substancji czynnej [Mestre A.S. i in. 2007, Rivera-Jimenez S.M. i in., 2008].

Obiecujące rezultaty redukcji nawet wysokich stężeń produktów farmaceutycznych zawartych w wodzie dają również metody odwróconej osmozy oraz nanofiltracja. Analizie poddano następujące farmaceutyki: erytromycynę, sulfametoksazol, hydrokodon, acetaminofen, trimetoprim, naproksen, ibuprofen, diklofenak, karbamazepinę, a także leki hormonalne: estriol, testosteron i androstendion, w wyniku której uzyskano 95% skuteczność zatrzymania tych mikrozanieczyszczeń [Kizer M.A. i in., 2008]. Pozostałości antybiotyków w ściekach oczyszczonych poddane procesom membranowym, w zależności od zmieniających się parametrów, są usuwane nawet w granicach 98% [Gholami M. i in., 2012, Zając A. i in., 2015].

Obiecującą metodą wydaje się również nowa technologia zawieszonego złoża ruchomego - MBBR (ang. *Moving Bed Biofilm Reactor*), która wg Tang K. i in. [2017] jest bardziej skuteczna niż osad czynny w usuwaniu pozostałości farmaceutycznych [Tang K. i in., 2017]. Zasada działania opiera się na tworzeniu błony biologicznej, tzw. biofilmu, który narasta na specjalnie zaprojektowanych elementach wykonanych z odpowiedniego tworzywa, rozmieszczonych w całej objętości reaktora. Najistotniejszym elementem tej metody oczyszczania ścieków są kształtki oraz materiał, z jakich są one wykonywane. Godne uwagi wydaje się rozwiązanie kompozytów polimerowo-drzewnych (WPC). Posiadają one dużą powierzchnię czynną dla błony biologicznej (powyżej 1200 m^2/m^3) oraz charakteryzują się dużą elastycznością w dostosowywaniu do zmiennego natężenia dopływających ścieków [Kruszelnicka I. i in., 2014]. Właściwości tego materiału mogą okazać się kluczowe w tworzeniu biofilmu mikroorganizmów osadu czynnego odpowiadających za redukcję produktów farmaceutycznych.

2.6.3. Wpływ farmaceutyków na skład i strukturę osadu czynnego

Osad czynny stanowi złożony układ biologiczny, gdzie równocześnie zachodzą procesy zarówno fizyczne, jak i biochemiczne, w efekcie których jest możliwe oczyszczanie ścieków. Mikroorganizmy stanowią kłaczkowatą zawiesinę. Na powierzchni kłaczków zachodzi adsorpcja substancji organicznych. Umożliwia ona rozkład większych fragmentów, które następnie są wchłaniane bezpośrednio do wnętrza kłaczka, gdzie zachodzą dalsze przemiany. Mikroorganizmy stanowiące osad czynny wytwarzają enzymy katalizujące, dzięki którym możliwy jest rozkład związków wielocząsteczkowych (np.: białka, tłuszcze, węglowodany) do prostych produktów nieorganicznych (tj. CO_2, H_2O, NO_3^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}). [Dymaczewski Z., 2011].

Proces powstawania osadu czynnego następuje podczas napowietrzania ścieków, w trakcie, gdy zawarte w ściekach drobnoustroje tworzą większe aglomeraty. Od właściwego przebiegu tworzenia kłaczków zależy wiele czynników. Do najważniejszych z nich należą:
- wytwarzanie przez bakterie śluzowatych otoczek umożliwiających łączenie się komórek w większe skupiska kłaczków,
- dodatnio naładowane jony pozwalają na przyłączanie ujemnie naładowanych komórek,
- wytwarzanie przez niektóre rodzaje bakterii bardzo cienkich nitek zbudowanych z polisacharydów, ułatwia łączenie się komórek [Kocwa-Haluch i in., 2011].

Ze względu na rosnącą konsumpcję i produkcję leków na całym świecie oraz obecność nierozłożonych ich form w ściekach oczyszczonych i odbiornikach wodnych, kluczowe znaczenie ma dokładniejsze zbadanie działania preparatów farmaceutycznych na aktywność bakterii, drobnoustrojów i innych mikroorganizmów osadu czynnego. Dotychczas nie przeprowadzono wielu analiz w zakresie wpływu leków na strukturę osadu czynnego. [Jiang C. i in., 2017].

Jiang i współpracownicy wykonali analizę wpływu stężeń środowiskowych diklofenaku (DCF), ibuprofenu (IBP) i naproksenu (NPX) na wzrost i funkcjonowanie kultur bakterii osadu czynnego. Badanie było prowadzone w sekwencyjnych reaktorach typu SBR, dla 3 stężeń: 5μg/L DCF, 5 μg/L DCF + 5 μg/L IBP i 5 μg/L DCF + 5 μg/ L IBP + 5 μg/ L NPX, przez 130 dni. W efekcie, nie zanotowano negatywnego wpływu leków na zmianę wartości ChZT i $N\text{-}NH_4^+$, natomiast zaobserwowano zahamowanie usuwania azotu całkowitego (TN). IBP i NPX wykazały wysoką skuteczność usuwania (79,96% do 85,64%), podczas gdy DCF był bardziej oporny (57,24% do 64,12%). Wyniki aktywności enzymów żywych komórek i wydzielanych poza komórkę polimerowych substancji (*extracellular polymecic substances* EPS) wskazują, że analizowane leki uszkadzają ścianki komórek lub mikroorganizmy,

a mieszaniny analizowanych związków zwiększają toksyczność. Jednocześnie stwierdzono wzrost różnorodności bakterii wraz z dodatkiem wybranych NLPZ. Wyniki sekwencjonowania małych podjednostek rybosomowych z rybosomem bakteryjnym RNA wykazały, że wraz z dodaniem NLPZ następował przyrost proteobakterii, aktynowców, TM 7 i *Bacteroidetes*. *Actinobacteria* oraz *Bacteroidetes* oraz spadek *Micropruina* i *Nakamurella*. Rozwój *Actinobacteria* i *Bacteroidetes* wykazało, że oba gatunki mogą mieć zdolność do degradowania NSAID, a tym samym mogą dobrze przystosować się do obecności NLPZ [Jiang C. i in, 2017]. Podobnie Zhang i in. stwierdzili również, że *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Proteobacteriain* najlepiej dostosowały się do zmienionego środowiska zewnętrznego występującego na terenach podmokłych [Zhang D. i in., 2016].

Niesteroidowe leki przeciwzapalne mogą stymulować zachowanie i struktury mikroorganizmów oraz różnorodność bakterii. Zhang i wsp. zauważyli wzrost mikroorganizmów oraz dużą różnorodność gatunkową bakterii w osadzie czynnym, pracującym w układzie SBR, do którego dozowano tetracyklinę i sulfametoksazol w stężeniu 5μg/L [Zhang Y.Y. i in., 2016]. Huang i wsp. wykorzystali dwa laboratoryjne systemy anaerobowo-anoksykotoksyczne zawierające 300 μg/L tetracykliny w celu zbadania zmian w rozwoju mikroorganizmów. Uzyskany wynik potwierdził, że po dodaniu tego leku wzrasta różnorodność bakterii [Huang M. i in., 2015]. Tendencja do wzrostu zróżnicownia gatunków w obecności substancji toksycznych jest obserwowana jedynie do określonej wartości stężenia leku, dozowanego do układu oczyszczania ścieków wykorzystującego osad czynny. W rzeczywistości, wraz ze wzrostem stężenia farmaceutyku do 10 mg/L, następuje obniżenie zróżnicowania bakterii [Zhang Y.Y. i in., 2016]. W badaniach Tomskiej udowodniono spadek aktywności dehydrogenaz osadu czynnego wraz ze wzrostem stężenia analizowanych antybiotyków: sulfanilamidu i erytromycyny [Tomska A., 2016]. Dalszych analiz wymaga badanie zdolności do adaptacji drobnoustrojów osadu czynnego w obecności leków oraz określenie wartości progowej stężenia farmaceutyku dozowanego do układu biologicznego.

Zhao i wsp. analizowali bioreaktory membranowe zaszczepione tlenowym granulowanym osadem czynnym, w celu oczyszczania ścieków zawierających pięć rodzajów farmaceutyków i środków higieny osobistej (*Pharmaceutical and Personal Care Products* - PPCP). Uzyskane wyniki potwierdziły, że obecność tych związków powoduje zmiany strukturalne drobnoustrojów [Zhao X. i in., 2015]. Wang i Gunsch stwierdzili, że mieszaniny czterech farmaceutycznie aktywnych związków (*Pharmaceutically Active Compounds* - PhACs) hamowałyby proces nitryfikacji i wpłynęłyby na strukturę bakterii utleniających amoniak (*Ammonium Oxidizing Bacteria* AOB) w sekwencyjnych reaktorach biologicznych

(SBR). Nie badano jednak wpływu tych substancji na mikroorganizmy występujące w warunkach beztlenowych [Wang i in., 2011].

Pabitra w swojej pracy udowodnił, że farmaceutyki nie tylko hamują zużycie tlenu, ale także mogą stanowić pokarm dla mikroorganizmów. W celu uzyskania dobrych rezultatów założono, że osad powinien być homogeniczny, pozbawiony zgrubień i grudek [Pabitra B., 2010].

Analizy mikroorganizmów oparte na metodzie końcowego poliformizmu długości fragmentów restrykcyjnych (*restriction fragment length polymorphism* T-RFLP) i dwóch bibliotek klonów przprowadzone przez Kraigher i współ. wskazują, że mieszanina farmaceutyków zawierających powszechnie stosowane NLPZ i kwas klofosforowy w stężeniach 50 mg/L spowodowała zmiany w strukturze bakterii wchodzących w skład osadu czynnego. Zaobserwowano zmniejszenie różnorodności wśród bakterii w badanych reaktorach. Niezdolność do wykrycia gatunku *Nitrospira* w reaktorze z dodatkiem środków farmaceutycznych sugeruje, że działanie tych bakterii odgrywa kluczową rolę w odprowadzaniu azotu ze ścieków [Kraigher B. i in., 2008].

Ze względu na fakt, że osad czynny stanowi podstawowy element biologicznych technolologii oczyszczania ścieków, kluczowym zagadnieniem staje się szczegółowe poznanie wpływu obecności substancji farmakologicznie aktywnych na zachowanie i struktury mikroorganizmów, a tym samym działanie oczyszczalni ścieków.

2.7. Regulacje prawne w zakresie substancji farmaceutycznych w środowisku

2.7.1. Regulacje prawne w Polsce

W aktach prawnych można znaleźć zapisy dotyczące przemysłu farmaceutycznego w odniesieniu do producentów i instytucji sprzedających te produkty lekowe. Ustawy i rozporządzenia wykonawcze do nich w zakresie prawa farmaceutycznego odnoszą się do norm jakościowych wytwarzanego produktu lekowego, dystrybucji a także marketingu. Obowiązujące prawodawstwo polskie nie uwzględnia bezpośrednio informacji na temat szkodliwości oddziaływania substancji farmaceutycznych i zapobieganiu ich dalszemu rozprzestrzenianiu w środowisku.

Podstawowym aktem prawnym jest *Prawo farmaceutyczne* uchwalone 6 września 2011r. Po licznych poprawkach, obowiązujący tekst jednolity ustawy został uchwalony w 2016r. [Dz. U. z 2016r., poz. 2142 z późn. zm.]. Stanowi ona pierwszy zapis prawny, dostosowujący polskie prawo do norm Unii Europejskiej. Późniejsze modyfikacje tej ustawy wynikają ze zmian prawa Europejskiego m.in. Rozporządzenia (WE) NR 726/2004 Parlamentu

Europejskiego i Rady z dnia 31 marca 2004 r. ustanawiające wspólnotowe procedury wydawania pozwoleń dla produktów leczniczych stosowanych u ludzi i do celów weterynaryjnych i nadzoru nad nimi oraz ustanawiające Europejską Agencję Leków, Dyrektywy 2009/9/WE z dnia 10 lutego 2009 r. zmieniającej dyrektywę 2001/82/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do weterynaryjnych produktów leczniczych oraz Dyrektywy 2009/120/WE z dnia 14 września 2009 r. zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi w zakresie produktów leczniczych terapii zaawansowanej. Zmiany związane były z profesją lekarską, popularyzowaniem sklepów oraz punktów dystrybuujących leki. Główne postulaty dotyczą m.in.: zasad oraz etapów wdrażania do obrotu leków, wymagań związanych z jakością i czystością produkowanych farmaceutyków jak również bezpieczeństwa ich zażywania. Treść ustawy mówi także o prowadzeniu działań reklamowych. W końcowych paragrafach ustawy omówione zostały funkcje, które pełni Inspekcja Farmaceutyczna, sposoby przeprowadzania kontroli jakości oraz tworzenia dokumentacji po przeprowadzonej kontroli [Ginter-Kramarczyk D. i in., 2013].

Innym aktem prawnym jest Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 6 marca 2017r. *zmieniające rozporządzenie w sprawie opłat za korzystanie ze środowiska*, które m.in. nakłada obowiązek uiszczenia opłat za umieszczanie wybranych szkodliwych substancji na składowisku odpadów. W załączniku tego Rozporządzenia znajduje się zestawienie jednostkowych stawek opłat od 2018r. Na liście zostały uwzględnione odpady z produkcji, przygotowania, obrotu i stosowania farmaceutyków oznaczone kodem o nr 07 05, odpady z opieki okołoporodowej, diagnozowania, leczenia i profilaktyki medycznej o nr 18 01 oraz odpady z badań, diagnozowania, leczenia i profilaktyki weterynaryjnej o nr 18 02. W załączniku nr 4 ustawy o odpadach z dnia 14 grudnia 2012r. został umieszczony zapis, że *farmaceutyki oraz związki stosowane w medycynie lub weterynarii* stanowią składniki, *które mogą powodować, że odpady są odpadami niebezpiecznymi*.

Obowiązującymi w Polsce aktami prawnymi w zakresie sposobu dystrybucji i wydawania zezwoleń na leki odurzające i psychotropowe jest Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 16 marca 2017r. *w sprawie szczegółowych warunków i trybu wydawania pozwoleń oraz dokumentów niezbędnych do przywozu, wywozu, wewnątrzwspólnotowego nabycia lub wewnątrzwspólnotowej dostawy środków odurzających, substancji psychotropowych lub prekursora kategorii 1* [Dz.U. 2017, poz 686] oraz Rozporządzenia Ministra Zdrowia *w sprawie szczegółowych warunków i trybu postępowania ze środkami odurzającymi, substancjami psychotropowymi i prekursorami kategorii 1, ich mieszaninami*

oraz produktami leczniczymi: zepsutymi, sfałszowanymi lub którym upłynął termin ważności, zawierającymi w swoim składzie: środki odurzające, substancje psychotropowe lub prekursory kategorii 1 [Dz. U., 2012, poz. 236]. W 2012 r. podpisano także Ustawę *o zmianie przepisów refundacji leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych* [Dz. U., 2012 r., poz. 95]. W żadnym z aktów prawnych nie jest poruszony problem szkodliwości, toksyczności i negatywnego oddziaływania substancji farmaceutycznych na środowisko.

Obecnie, obowiązującymi w Polsce aktami prawnymi określającymi wymagania w zakresie dystrybucji i jakości wody do picia a także odprowadzania ścieków są: Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 10 lutego 2017 r. *w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym odprowadzaniu ścieków* [Dz.U. 2017, poz. 328] a także Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 13 listopada 2015 r. *w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi* [Dz.U. 2015, poz. 1989]. Oba kluczowe akty prawne, ustanawiające jakość i zarządzanie krajową gospodarką wodno- ściekową nie odwołują się w swojej treści do substancji farmaceutycznych w aspekcie ochrony środowiska. Jedyna wzmianka dotycząca kontroli obecności substancji farmaceutycznych w wodach znajduje się w Ustawie z dnia 18 lipca 2001 r. *Prawo wodne*. W odniesieniu do substancji farmaceutycznych przywołuje zapis, że wstępna ocena stanu środowiska wód morskich, na potrzeby opracowania analizy presji i oddziaływań pochodzenia lądowego na wody morskie. Oddziaływania te dotyczą analizy m.in. związków syntetycznych, w szczególności określonych w przepisach prawa Unii Europejskiej dotyczących polityki wodnej i substancji priorytetowych, istotnych dla środowiska morskiego, takich jak substancje czynne biologicznie, pestycydy, środki farmaceutyczne, pochodzących ze źródeł rozproszonych, z opadów atmosferycznych lub ładunków doprowadzanych rzekami [Dz. U. 2017, poz. 1121, art. 61h pkt 3 ppkt 1c].

Ogromną rolę w podejmowaniu decyzji o nabyciu leku odgrywają środki masowego przekazu. Odpowiednio brzmiące krótkie hasła i slogany zachęcają do kupowania wszelkiego rodzaju leków dostępnych bez recepty. Łatwość nabywania różnych medykamentów z grupy leków dostępnych bez recepty OTC (*over the counter drug)* prowadzi w konsekwencji do prób samodzielnego leczenia się, co niejednokrotnie kończy się rezygnacją z wizyt i porad u specjalisty. Samowola w dawkowaniu medykamentów, brak odpowiedniej wiedzy na temat ich działania może powodować nieodwracalne zmiany w organizmie, a w najgorszych przypadkach prowadzi nawet do śmierci. W celu ograniczenia przypadków samodzielnego dawkowania w 2008 r. weszło w życie Rozporządzenie Ministra *Zdrowia w sprawie reklamy produktów leczniczych* [Dz. U., 2008, Nr 210, poz.1327]. W tym samym niemal czasie

uaktualniono treść dyrektywy 2009/53/WE na temat pozwoleń obrotu lekami [Dz. Urz. UE, 2009, 168/33]. Ustawa europejska zakazuje jakichkolwiek form upubliczniania i propagowania treści dotyczących leków wydawanych na receptę. W polskim prawie dokonano implementacji prawa europejskiego, wprowadzając w 2012 roku całkowity zakaz promowania punktów aptecznych [http://www.eapteki.info, odczyt 04.2017, http://www.zdrowie.abc.com.pl, odczyt 04.2017]. Oba te akty prawne nakładają na koncerny farmaceutyczne obowiązek sporządzania charakterystyk leków, zawierających w swojej treści informacje m.in. na temat działania leku i skutków ubocznych ich stosowania. Treść takich informacji musi zostać wcześniej zatwierdzona przez specjalnie powołany do tego celu organ.

Dotychczas, w Polsce nie uchwalono jeszcze żadnych aktów prawnych określających dopuszczalne stężenia jakichkolwiek grup farmaceutyków transportowanych do oczyszczalni ścieków. Rosnąca konsumpcja leków a także ich transport wraz z oczyszczonymi ściekami do odbiorników wodnych budzi niepokój związany z negatywnym oddziaływaniem tych substancji na środowisko. Prowadzone przez ośrodki naukowe badania nad obecnością pozostałości farmaceutyków w środowisku, wskazują, że przekroczenie pewnych dawek poszczególnych leków wpływa negatywnie na organizmy ludzi, zwierząt bądź nawet mniejszych żywych form występujących w wodzie i glebie. Koncerny farmaceutyczne, których ścieki odprowadzane są do oczyszczalni ścieków muszą spełniać zasady i zapisy obowiązujące w Rozporządzeniu Ministra Budownictwa z 2006 r., *w sprawie sposobu realizacji obowiązków dostawców ścieków przemysłowych oraz warunków wprowadzania ścieków do urządzeń kanalizacyjnych* [Dz. U., 2016, poz. 1757]. Rozporządzenie to zawiera dwa załączniki, w których zawarte są dane dotyczące dopuszczalnych dawek różnych substancji szkodliwych, jakie mogą być odprowadzane do oczyszczalni, w zależności od wielkości aglomeracji. Spis ten nie obejmuje substancji lekowych ani ich pochodnych metabolitów. Można zatem wysnuć wniosek, że zakłady przemysłowe mogą odprowadzać bezpośrednio do sieci kanalizacyjnej ścieki poprodukcyjne z nieokreśloną ilością stężenia leków. Brak regulacji prawnych w zakresie dopuszczalnych wielkości stężeń leków odprowadzanych do kolektora głównego, nie motywuje producentów leków do kontrolowania oraz budowania odpowiednich technologii zapewniających zatrzymywanie zanieczyszczeń lekowych przed ich zrzutem do kanalizacji. Obecnie, przyzakładowe oczyszczalnie ścieków zobowiązane są regulować jedynie poziom tłuszczy oraz pH. Zgodnie z Obwieszczeniem Ministra Infrastruktury i Budownictwa z dnia 28 września 2016 r. [Dz. U. 2016, poz. 1757] ścieki przemysłowe mogą być wprowadzone do urządzeń kanalizacyjnych zapewniając, że temperatura tych ścieków nie powinna przekraczać 35°C, a odczyn pH mieści się w przedziale od 6,5 do 9,5, z wyłączeniem ścieków zawierających cyjanki i siarczki, dla których pH mieści się w przedziale od 8 do 10. Rosnąca

jednak świadomość społeczna związana z toksycznym działaniem leków w środowisku naturalnym spowodowała, że większość koncernów farmaceutycznych w Europie i na świecie ustala wewnątrzzakładowe poziomy stopnia redukcji i jakości odprowadzanych do kanalizacji miejskiej ścieków poprodukcyjnych, zawierających pozostałości wytwarzanych produktów.

Odpady powstające w zorganizowanych placówkach, takich jak szpital czy apteka są utylizowane przez wytwórcę leków. Zagospodarowanie odpadów farmaceutycznych pochodzących z gospodarstw domowych leży po stronie gmin. Kwestia jednak tego rodzaju odpadów jest pomijana w planowaniu gospodarki odpadami na dany okres. Niepokój związany z konsekwencjami obecności leków w środowisku popularyzuje jednak wiele działań społecznych przeciwdziałających, choć w małej skali, rozprzestrzenianiu się tych substancji w środowisku. Problem jednak jest dostrzegany przez samorządy. Obecnie, apteki posiadają specjalne pojemniki na odpady lekowe, do których bezpłatnie każdy konsument może wrzucać niezużyte lub przeterminowane produkty farmaceutyczne, skąd są przejmowane przez firmy wyspecjalizowane w utylizowaniu tego typu odpadów [http://www.nazdrowie.pl odczyt 04.2017]. Apteki nie mają nakazu prowadzenia takiej zbiórki, często brakuje również informacji na jej temat, lub widocznego miejsca w aptece, gdzie można oddawać niezużyte leki. Informacje o możliwości zwrócenia przeterminowanego leku lub inne sposoby ich utylizacji nie są zamieszczane ani w treści ulotek, ani na opakowaniach z danym medykamentem. Nagłośnienie działań związanych ze zbiórką odpadów lekowych dodatkowo wspartych przez *mass media* mogłyby podnieść zainteresowanie i przekonać wielu pacjentów do potrzeby i słuszności zwrócenia uwagi na ten problem. Inicjatywę popularyzowania tego zagadnienia często podejmują sami farmaceuci oraz lokalne izby aptekarskie, zwracając się do gmin z prośbą o pozwolenie przeprowadzenia takich akcji. Powstaje także wiele inicjatyw społecznych dążących do zwiększenia liczby pojemników na odpady, w celu nauczania oraz przekonania członków prowadzących gospodarstwa domowe o potrzebie sortowania oraz właściwej utylizacji leków [http://www.nazdrowie.pl, odczyt 04.2017, Ginter-Kramarczyk D., 2013].

Polska, jako członek Unii Europejskiej została zobligowana do realizacji postulatów zapisanych w Dyrektywie Rady Unii Europejskiej 91/271/EWG dotyczącej oczyszczania ścieków komunalnych do końca 2015 r. [Dz. Urz. WE L 135/40 z 30.05.1991] Zasadniczy akt prawny, który określa strategię państwa w obrębie rozwoju gospodarki ściekowej to Krajowy Program Oczyszczania Ścieków Komunalnych. Jego zadaniem jest realizacja inwestycji, modernizacja oczyszczalni ścieków oraz ograniczenie zrzutu trudno usuwalnych zanieczyszczeń lub poprawa skuteczności ich redukcji, dostosowana do standardów obowiązujących w Unii Europejskiej. Według kontroli przeprowadzonej przez członków

Parlamentu Europejskiego, Polska nie wywiązuje się z wymagań zawartych w dyrektywie. Przyczynia się do tego między innymi stosowanie tańszych technologii oczyszczania biologicznego w mniejszych miejscowościach, gdzie liczba mieszkańców wynosi 2-15 tys. Jakość ścieków oczyszczonych nie odpowiada normom zapisanym w dyrektywie. Niewywiązanie się ze wszystkich założeń do 2015 r. zobligowało Polskę do wypłaty odszkodowań dla Unii Europejskiej w wysokości nawet 1,5 mld euro rocznie [Ginter-Kramarczyk D., 2013, Liziniewicz J. i in., 2013].

W związku z faktem, iż Polska boryka się z budową i modernizacją konwencjonalnych oczyszczalni ścieków, trudno przewidzieć jak poradzi sobie z potencjalnymi regulacjami dotyczącymi usuwania pozostałości farmaceutyków, które może w niedługim czasie zostaną ustanowione przez Unię Europejską [Ginter-Kramarczyk D. i in., 2013].

2.7.2. Regulacje prawne w Europie

Pierwszym zapisem prawnym w Europie dotyczącym medycyny i farmacji była wydana w 2001 r. dyrektywa dotycząca zbliżania przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych Państw Członkowskich odnoszących się do wdrożenia zasad Dobrej Praktyki Klinicznej w prowadzeniu badań klinicznych produktów leczniczych przeznaczonych do stosowania przez człowieka (2001/20/WE) [Dyrektywa 2001/20/WE, 2001]. W tym samym roku, wydano jeszcze kolejne dwie dyrektywy (2001/82/WE i 2001/83/WE) [Dyrektywa 2001/82/WE, 2001, Dyrektywa 2001/83/WE, 2001] w sprawie weterynaryjnych i stosowanych u ludzi produktów leczniczych. Dwa lata później Parlament Europejski i Rada Unii Europejskiej uchwaliły następne postulaty. Zapisy zawarte w dyrektywie [Dyrektywa 2001/83/WE, 2001] zostały rozszerzone o trzy kolejne dyrektywy (2004/24/WE, 2004/27/WE, 2004/28/WE) [Dyrektywa 2004/24/WE, 2004, Dyrektywa 2004/27/WE, 2004, Dyrektywa 2004/28/WE, 2004].

Niezwykle intensywny rozwój przemysłu farmaceutycznego skupił uwagę prawodawców na jakość, skuteczność oraz bezpieczeństwo stosowania produktów leczniczych. W 2004 r. zostały zaprezentowane przez Parlament Europejski i Radę Unii Europejskiej kolejne rozporządzenia (2004/854/WE i 2004/882/WE) [Dz. Urz. UE, 2004, 226/83, Dz. Urz. UE, 2009, 191/1] dotyczące kontroli i jakości produktów pochodzenia zwierzęcego, przeznaczonych do spożycia przez ludzi. W 2005 r. przyjęto dyrektywę [Raport WHO, 2011] ustanawiającą wymagania dotyczące higieny pasz, nadzoru nad obrotem, jakością i stosowaniem leków weterynaryjnych. Jej kluczowym aspektem było zobligowanie Inspekcji Weterynaryjnej do zwiększenia liczby kontroli produktów leczniczych przechowywanych

w hurtowniach farmaceutycznych, a także zakładach leczniczych dla zwierząt [Ginter-Kramarczyk D. i in., 2013].

W zakresie gospodarki ściekowej została uchwalona dyrektywa 91/271/EWG dotycząca oczyszczania ścieków komunalnych. Jej główny cel zakłada ochronę środowiska przed niekorzystnymi skutkami zanieczyszczeń komunalnych i przemysłowych. W dyrektywie zostały określone minimalne normy i harmonogramy zbierania, oczyszczania i odprowadzania ścieków komunalnych. Ponadto ustanawia ona kontrolę odprowadzania osadów ściekowych i nakazuje wyeliminowanie zrzutów osadów do mórz.

Unia Europejska wspiera politykę przybrzeżną i morską. W dyrektywie 2008/56/WE w sprawie strategii morskiej (tzw. dyrektywa morska) zawarto główne postulaty. Należą do nich m.in. osiągnięcie dobrego stanu środowiska wód morskich do 2020r., dalsza jego ochrona i zachowanie oraz zapobieganie dalszemu pogarszaniu jego stanu. Zawiera również zapisy dotyczące ochrony morskiej różnorodności biologicznej. Dyrektywa uwzględnia także koncepcję ochrony środowiska i jego zrównoważonego użytkowania jako przeciwdziałanie skutkom działalności człowieka [http://www.europarl.europa.eu, odczyt 07.2017].

W ramach wspólnoty europejskiej została opracowana Ramowa Dyrektywa Wodna 2000/60/WE, która stanowi fundament w zakresie zagospodarowania zasobów wodnych i ich ochrony. Obejmuje ona śródlądowe wody powierzchniowe, wody przejściowe, przybrzeżne oraz podziemne. Działania Dyrektywy mają na celu zapobieganie zanieczyszczeniom wód lub/i ich ograniczeniom, wpieranie zrównoważonego korzystania z wód, ochrony środowiska wodnego a także poprawę stanu ekosystemów wodnych oraz łagodzenie skutków powodzi i susz. Dodatkowo, w ramach gromadzenia oraz wymiany danych i informacji związanych z monitorowaniem zanieczyszczeń uwalnianych do wód powierzchniowych oraz kumulujących się w środowisku wodnym, Komisja Europejska ustanowiła Europejski System Informacji Wodnej (WISE) [http://www.europarl.europa.eu, odczyt 07.2017, Schroder P i in., 2016].

Około 75% wody przeznaczonej do spożycia w Unii Europejskiej stanowią wody podziemne. Czynnikami mogącymi negatywnie wpłynąć na jakość wód, a tym samym zdrowie odbiorców, są zanieczyszczenia przemysłowe, składowiska odpadów, rolnictwo. W celu ochrony wód poziemnych przed wszelkimi rodzajami zanieczyszczeń, utworzona została sieć monitorująca wody podziemne. W dyrektywie 2006/118/WE w sprawie ochrony wód podziemnych określono kryteria stanu chemicznego wód, identyfikacji oraz przeciwdziałania przekroczeniu dopuszczalnych limitów zanieczyszczeń. Dyrektywa 98/83/WE określa najważniejsze normy jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Zobowiązuje państwa członkowskie do regularnego monitorowania nazdrowie.pl jakości wody metodą punktów pobierania próbek. Ważnym punktem jest również zapewnienie dostępu do informacji

konsumentom. Dyrektywa zakłada sporządzanie sprawozdań na temat stanu jakości wody pitnej raz na 3 lata. W celu kontrolowania zanieczyszczenia chemicznego wód powierzchniowych wprowadzono wymóg utworzenia wykazu (listy) substancji priorytetowych, których występowanie stanowi istotne ryzyko dla środowiska wodnego w obszarze Państw UE. W dyrektywie dotyczącej spraw norm jakości środowiska 2008/105/WE przewidziano ograniczenia stężenia w wodach powierzchniowych dla 33 substancji priorytetowych i 8 innych substancji zanieczyszczających. Na mocy ustanowionej dyrektywy zmieniającej 2013/39/UE do dotychczasowej listy dodano 15 nowych substancji. Wprowadzenie listy dodatkowej zobowiązało Komisję Europejską do utworzenia dodatkowego wykazu substancji monitorowanych we wszystkich państwach członkowskich (tzw. lista obserwacyjna) [http://www.europarl.europa.eu, odczyt 07.2017]. Wskazana w Dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2013/39/UE z dnia 12 sierpnia 2013 r. lista obserwacyjna obejmuje substancje, których monitoring będzie prowadzony na terenie całej Unii [http://eur-lex.europa.eu, odczyt 07.2017]. Pierwsza lista obserwacyjna obejmuje maksymalnie 10 substancji lub grup substancji oraz wskazuje, w odniesieniu do każdej z nich, matryce do monitorowania a także możliwe metody analizy niepowodujące nadmiernych kosztów. Przy każdej aktualizacji listy, Komisja Europejska może umieszczać na niej jedną substancję lub grupę substancji do maksymalnej liczby 14. Substancje, które mają zostać umieszczone na liście obserwacyjnej, według przedstawionych argumentów wskazuje, że na poziomie Unii stanowią znaczące ryzyko dla środowiska wodnego lub za jego pośrednictwem i w przypadku których dane z monitorowania nie są wystarczające [http://eur-lex.europa.eu, odczyt 07.2017].

W 2012 r. Komisja Europejska, na prośbę mieszkańców i ośrodków badawczych należących do państw członkowskich, poddała ocenie temat zanieczyszczeń chemicznych występujących w wodach naturalnych obszaru Unii Europejskiej. Opublikowane do tej pory wyniki badań dowodzą, że rośnie stężenie substancji toksycznych, wpływających negatywnie na organizmy żywe. W związku z wystosowanym apelem ze strony społeczności europejskiej i ośrodków naukowych, Rada Europejska zmodyfikowała dotychczas obowiązującą listę substancji zanieczyszczających środowisko wodne. Wystosowano propozycję rozszerzenia jej o 10 nowych związków chemicznych, mających podlegać monitoringowi w wodach powierzchniowych w krajach unijnych. Należą do nich związki przemysłowe, substancje zawarte w środkach biobójczych, ochrony roślin, a także, po raz pierwszy uwzględniono substancje farmaceutyczne. Na pierwszej liście obserwacyjnej znalazł się diklofenak (CAS 15307-79-6), 17 beta-estradiol (E2) (CAS 50-28-2) i 17 alfa-etynyloestradiol (EE2) (CAS 57-63-6). Pozwoli to na zebranie danych z monitorowania, w celu ułatwienia określenia

odpowiednich środków służących rozwiązaniu problemu zagrożenia, jakie stanowią te substancje [Dz. Urz. UE L226/1 24.8.2013, Dz. Urz. UE L78/40, 24.3.2015].

W celu wytypowania substancji do listy obserwacyjnej, Komisja Europejska ocenia w szczególności:

- wyniki najbardziej aktualnego przeglądu, wg załącznika X Dyrektywy 2000/60/WE,
- projekty badawcze,
- zalecenia podmiotów,
- charakterystykę obszaru dorzecza i wyniki programów monitorowania państw członkowskich,
- wielkość produkcji, sposobu użytkowania, właściwości [Dz.Urz UE L226/10,24.8.2013].

Lista obserwacyjna jest aktualizowana co 24 miesiące. Podczas aktualizacji usuwana jest z listy substancja, dla której możliwe jest sporządzenie oceny ryzyka (wg art. 15 ust.2 dyrektywy 2000/60/WE), bez dodatkowych danych z monitoringu. Okres ciągłego monitorowania wynosi maksymalnie 4 lata [Dz. Urz. UE L226/1 24.8.2013]. Minimalny czas prowadzenia monitoringu każdej substancji znajdującej się na liście obserwacyjnej, w wybranych stacjach wynosi 12 miesięcy. Państwa członkowskie rozpoczynają monitorowanie każdej z analizowanych substancji umieszczonej na kolejnych listach w terminie sześciu miesięcy od jej umieszczenia na liście [Dz. Urz. UE L226/1 24.8.2013]. Ilość stacji monitorowania jest zależna od liczby mieszkańców oraz dodatkowo od wielkości powierzchni wyrażonej w km^2. Na podstawie wyboru stacji, częstotliwości (nie mniejsza niż raz w roku) i harmonogramu monitorowania każdej substancji, państwa członkowskie uwzględniają sposoby użytkowania i możliwość pojawienia się danej substancji. Państwa członkowskie składają sprawozdanie z wyników monitorowania Komisji Europejskiej w terminie 21 miesięcy od umieszczenia substancji na liście obserwacyjnej a także co 12 miesięcy, jeśli substancja nadal będzie występowała na liście [Dz. Urz. UE L226/1 24.8.2013]. Na mocy art. 16 ust. 9 dyrektywy 2000/60/WE, Komisja jest zobligowana do opracowania strategicznego podejścia do zanieczyszczenia wody substancjami farmaceutycznymi. Działania te mają na celu dokładne określenie oddziaływania leków na środowisko w procedurze wprowadzania produktów leczniczych do obrotu. W ramach tego podejścia Komisja, w stosownych przypadkach, do dnia 14 września 2017 r. zaproponowała odpowiednie działania, które należy podjąć na szczeblu Unii lub na szczeblu państw członkowskich, w celu rozwiązania problemu ewentualnego wpływu substancji farmaceutycznych na środowisko, z myślą o zmniejszeniu zrzutów, emisji, i strat takich substancji do środowiska wodnego, z uwzględnieniem potrzeb zdrowia publicznego oraz opłacalności proponowanych działań.

2.7.3. Regulacje prawne na świecie

Obecnie, na świecie powołanych jest wiele organizacji, stowarzyszeń oraz firm biorących udział w formułowaniu zapisów prawnych, weryfikacji oraz aktualizacji zapisów w odniesieniu do sektora farmaceutycznego, jak i szeroko interpretowanym i definiowanym pojęciem ochrony zdrowia ludzkiego. Najbardziej popularne firmy i organizacje, których decyzje osiągają zasięg międzynarodowy zostały przedstawione w tabeli 6. W Stanach Zjednoczonych regulacjami prawnymi w zakresie sektora farmaceutycznego oraz nadzorowaniem obecności substancji farmaceutycznych w środowisku zajmuje się Amerykańska Federalna Komisja Leków i Żywności – FDA. Według obowiązujących przepisów, każdy podmiot gospodarczy prowadzący działalność opartą na produkcji i dystrybucji produktów farmaceutycznych i spożywczych jest zobowiązany do uzyskania oceny środowiskowej przedsięwzięcia. Dokument ten określa, czy dany produkt lub sposób jego wytwarzania oddziałuje na środowisko naturalne. Ocena środowiskowa jest wymagana w przypadku, gdy stężenie wprowadzanego do środowiska leku przekracza stężenie 1 µg/L [Ginter-Kramarczyk D., 2013, Santos Lucia H.M.L.M. i in., 2010].

W celu ujednolicenia zapisów przy wydawaniu oceny środowiskowej dla weterynaryjnych podmiotów leczniczych Europejska Agencja Leków EMEA, Stany Zjednoczone oraz Japonia opracowały wspólną koncepcję dyrektywy tzw. Oceny Oddziaływania na Środowisko (OOŚ) dla Weterynaryjnych Produktów Leczniczych [Santos Lucia H.M.L.M. i in., 2010]. W dokumencie zostały zawarte wytyczne dla projektantów i konsultantów opracowujących Raporty Oddziaływania na Środowisko dla planowanej inwestycji. Opracowany raport jest podstawą do podjęcia decyzji przez organy opiniujące, czy

Tabela 6. Organizacje światowe działające w obszarze ochrony zdrowia

Symbol	Nazwa angielska	Nazwa polska
WHO	*World Health Organization*	Światowa Organizacja Zdrowia
WHA	*World Health Assembly*	Światowe Zgromadzenie Zdrowia
FDA	*Food and Drug Administration*	Amerykańska Federalna Komisja Leków i Żywności
DEA	*Drug Enforecement Administration*	Amerykańska Rządowa Agencja do Wdrażania Legalnego Obrotu Leków
ECHA	*European Chemical Agency*	Europejska Agencja Chemikaliów
EFPIA	*European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations*	Europejska Federacja Producentów Leków i ich Stowarzyszeń
EFSA	*European Food Safety Authority*	Europejski Urząd do spraw Bezpieczeństwa Żywności
EMA	*European Medicines Agency*	Europejska Agencja Leków
IMS Health	*Information Medical Statistics Health*	firma specjalizująca się w dostarczaniu informacji dla przemysłu farmaceutycznego

dany rodzaj planowanej inwestycji jest bezpieczny dla środowiska i nie narusza przepisów regulujących jego ochroną. Wytyczne dotyczące Weterynaryjnych Produktów Leczniczych podają dokładnie, w jakich wypadkach państwo członkowskie może zawetować pozwolenie na dopuszczenie do obrotu lub pozytywną ocenę, ze względu na potencjalne poważne zagrożeniedla zdrowia ludzi, zwierząt, bądź dla środowiska naturalnego. Dyrektywa ta przede wszystkim powinna chronić zdrowie i życie ludzi. Zakłada, że konsument nie może ponosić ryzyka podczas spożywania produktów pochodzenia zwierzęcego. W tym celu wykonywana jest ocena bezpieczeństwa wszystkich pozostałości związków farmakologicznie czynnych zawartych w substancjach leczniczych przeznaczonych dla zwierząt hodowlanych. Kryterium oceny stanowi akceptowane dzienne pobranie ADI (*acceptable daily intake*), wyrażone w jednostkach µg lub mg/kg masy ciała, która następnie pozwala ustalić maksymalny poziom pozostałości leków weterynaryjnych MRL (*maximum residue limit*) wyrażone w mg/kg masy w surowym produkcie zwierzęcym [Dyrektywa 2006/C 132/08,2006, Ginter-Kramarczyk D. i in., 2013].

Sprawozdanie oceny oddziaływania na środowisko powinno zawierać informacje o produkcie, zagrożeniu dla środowiska, zachowaniu się niepożądanych substancji w środowisku i skutki ich występowania, a także skuteczne środki zaradcze, strategie przeciwdziałające potencjalnym zagrożeniom. W raporcie należy uwzględnić także kwestie dotyczace sposobu stosowania leków, dawkowanie produktu, wydalanie substancji czynnej oraz głównych jej metabolitów [Dyrektywa 2006/C 132/08, 2006]. Stosowanie źle lub wcale nieocenionego preparatu leczniczego może nieść ze sobą zagrożenie zdrowia dla zwierząt. Przyczyną tego może być źle określona dawka leku, często umieszczona już na etykiecie, nieposiadająca rzetelnej opinii specjalisty lub badań potwierdzających jego skuteczność. Innym powodem negatywnego działania takiego specyfiku jest niewystarczająca kontrola jakości oraz nie zawsze przestrzegane warunki produkcji. Wszystko to razem wpływa na bezpieczeństwo konsumpcji produktu [Ginter-Kramarczyk D., 2013].

Rządowy Organ do Spraw Ochrony Środowiska (*Environmental Protection Authority*) wraz z inną instytucją sponsorującą badania, jaką jest działająca w Australii *National Health and Medical Research Council* (NHMRC), określiły, że odpady farmaceutyczne nie powinny być transportowane na składowiska odpadów lub odprowadzane do kanalizacji, gdyż odbiorcą odpadów lekowych ze szpitali i innych koncernów produkujących farmaceutyki są zakłady wyspecjalizowane w ich unieszkodliwianiu i usuwaniu [Ginter-Kramarczyk D., 2013, Santos Lucia H.M.L.M. i in., 2010].

W Stanach Zjednoczonych najbardziej rozpowszechnionymi lekami są epinefryna, warfarin oraz wyselekcjonowane rodzaje chemoterapeutyków. Ze względu na dużą konsumpcję

i szeroką dostępność tych farmaceutyków, amerykańska ustawa dotycząca odpadów i ich odzyskiwania (*Resource Conservation and Recovery Act*) określa sposób ich zagospodarowania i unieszkodliwiania. Niezastosowanie się do wytycznych określonych w tym dokumencie, może skutkować karami materialnymi. Rozpowszechnianiu bezpiecznej utylizacji odpadów sprzyjają, opracowane przez EPA instrukcje pomagające szpitalom rozwijać i wdrażać kompleksową gospodarkę niebezpiecznymi odpadami farmaceutycznymi [Raport WHO, 2011, Allen Ch., 2008]. Innym dokumentem opracowanym przez EPA jest instruktaż skierowany do zakładów opieki zdrowotnej oraz placówek weterynaryjnych, które zużywają największe ilości leków. Dokument zawiera informacje dotyczące sposobów zagospodarowania odpadów lekowych, mając na celu zmniejszenie ich poziomu stężeń w środowisku [Ginter-Kramarczyk D. i in., 2013, Raport WHO, 2011].

Stany Zjednoczone są jednym z krajów zmagających się z nadmierną dostępnością i konsumpcją leków, co skutkuje ich obecnością i akumulacją w środowisku. Dlatego też, obecnie temat przeciwdziałania i racjonalnej gospodarki farmaceutykami jest coraz częściej podejmowany przez rządzących, przy okazji rozmów dotyczących wody do spożycia, oczyszczania ścieków czy gospodarki odpadami [Ginter-Kramarczyk D. i in., 2013].

2.8. Metody analityczne oznaczenia substancji farmaceutycznych w próbkach środowiskowych

Do wykrywania, identyfikacji i oznaczania leków w ekosystemach wodnych i ściekach wykorzystuje się głównie wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC oraz chromatografię gazową – GC połączone z metodą spektrometrii mas, co pozwala na oszacowanie ilościowe i jakościowe. Obecnie, tylko te metody są w stanie analizować związki występujące w stężeniach rzędu ppt lub ppb. Istotnym elementem pozwalającym na właściwe oznaczenie próbki zawierającej lek jest proces przygotowania próbek do analiz, co jest kluczowe ze względu na złożoność matryc do przeprowadzenia tego typu badań [Koszowska A. i in, 2015]. Wydajność ekstrakcji dochodzi nawet do 90%. Czułość metody pozwala na wykrycie substancji farmaceutycznych do 150 ng/L z błędem 14 ng/L [Sosnowska K. i in. 2010].

Wykorzystanie wysokosprawnej chromatografii w analizach pozostałości farmaceutyków na różnych matrycach dopiero się rozwija. Każda opracowana metodyka analityczna w tym zakresie wymaga walidacji. Rola i waga tych urządzeń jest niezwykle ważna, umożliwia ona bowiem określenie i śledzenie szkalów rozprzestrzeniania się PPCPS, a także określania stopnia toksyczności jak i ich trwałości w środowisku [Koszowska A. i in., 2015].

W tabeli 7 przedstawiono zestawienie metod analitycznych wykorzystywanych do oznaczania ibuprofenu, diklofenaku oraz ich metabolitów w próbkach wód powierzchniowych oraz w ściekach, opracowane na podstawie przeglądu literaturowego.

Tabela 7. Metody analityczne do oznaczania ibuprofenu i diklofenaku w wodzie i ściekach

Analizowany związek	Metoda	Ekstrakcja	Faza ruchoma	Literatura
Ibuprofen (IBU)/ Diklofenak (DLC)	GC-MS-EI	Ekstrakcja do fazy stałej: Kolumna Supelclean^{TM} ENVI-8 o objętości 6 cm^3 (1,0 g), komora ciśnieniowa firmy Supelco	ekstrakcja: dwa roztwory wodne na bazie wody zdejonizowanej z dodatkiem wzorców DCL i IBU o stężeniu 0,5 i 1,0 mg/L, korekta pH = 7,0 przy użyciu 0,1 mol HCl/L lub 0,1 mol NaOH/L, liniowość detektora DCL i IBU 0,2 - 2,0 mg/cm^3,	Kudlek E. i in. 2015
Ibuprofen (IBU)/ Diklofenak (DLC)	GC-MS-EI (kolumna 60m x 0,25mm x 0,25µm RTX-5)	Ekstrakcja:Kolumna ENVI-18 o przepływie 3ml/min, przemycie: 3ml aceton, 3ml metanol, 3ml woda, pH < 2,0	400 µl pentafenylobenzyl bromku (2% w toulenie) oraz 4 µl trietyloaminy, ekstrakt przepuszczonu przez cartridge SiOH, anality wypłukiwane 15 ml toulenu	Tauxe-Wuersch A. i in., 2005
Diklofenak (DLC)	GC-MS z dwoma portami nastrzykowymi split/splitless oraz detektorem masowym MS HP i kolumną kapilarną HP-5MS (30m x 0,25 mm, film: 0,25µm)	Sorbent HLP (wielkość porów 83Å, wielkość ziaren 30 µm, masa 60 mg),	woda demineralizowana (< 0,2 S/cm), odczynniki: metanol, aceton, n-heksan 90%), octan etylu, ścieki zakwaszono HCl 36-38%, derywatyzacja: związek sililowy N-metyl-N-trymetylsili tryfluoroacetamid MSTFA	Sosnowska K. i in., 2010
Ibuprofen (IBU)/ Diklofenak (DLC)	HPLC z detektorem UV Kolumna C18 (250 x 4,6mm, 5µm)		Acetonitryl oraz 0,1mol octan amonu (pH= 5,0) w proporcji 50:50, przepływ 1 ml/min	Ashfaq M. i in., 2017
Ibuprofen (IBU)/ Diklofenak (DLC)	HPLC z kwadrupolową spektrometrią mas	kolumna Purospher Star RP-18 (125mm x 2,0 mm, 5µm) oraz C18	5 ml metanol, 5 ml wody demineralizowanej w proporcji 25:75, przemywanie 2x4ml metanolem przy prędkości przepływu 1 ml/min	Radjenovic J. i in., 2007
Ibuprofen (IBU)/ Diklofenak (DLC)	HPLC z detektorem UV	Kolumna CLC-ODS (150mm x 4,6mm x 5µm)	10 mmol/L kwas fosforowy, acetonitryl w proporcji 60:40	Bo L. i in., 2009
Ibuprofen (IBU)/ Diklofenak (DLC)	chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas z jonizacują elektronową GC-MS-EI	Kolumna RP-18 w środowisku kwaśnym	Octan etylu , dichlorometan, derywatyzacja – diazometanem	Clara M. i in., 2005

Ibuprofen (IBU)/ Diklofenak (DLC)	ultrasprawna chromatografia cieczowa z podwójną spektrometrią mas UPLC-MS/MS	kartriżdże SPE (z zachowaniem równowagi hydrofilowo-lipofilowej)	(próbki do analiz zakwaszane HCl do pH < 3,0), Przemywanie: 12 ml metanolu, przepływ 5-10 ml/min + 20 ml acetonitryl i 15 ml buforu fosforanowego,	Kruglova A. i in., 2014
Diklofenak (DLC)	HP-LC ESI-MS	Kolumna Kromasil C18 (500 µm x 150mm, 5µm)	0,1% metanol, kwas mrówkowy, pH=2,5, proporcja 80:20, przepływ 0,4ml/min	Galmier M.-J. i in., 2005
Ibuprofen (IBU) i metabolity	GC-MS-MS	DB5MS 30m x 0,25 mm, film 0,25 µm	10 ml aceton, 7,5 ml metanol, 12 ml kwaśnej wody o pH < 2,0, przepływ 3 ml/min, 3 ml dejonizowanej wody	Zwiener C. i in., 2002
Ibuprofen (IBU)	HPLC - UV-VIS	Kolumna Microsorb-MV C18 (250mm x 4,6mm)	70% metanol : 30% 40mmol kwas octowy, przepływ 1 ml/min	Murdoch R.W. i in. 2015

Spis skrótów:

GC- (z ang. *gas chromatography*) chromatografia cieczowa
HPLC – (z ang. *high-performance liquid chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa
UPLC – (z ang. *ultraperformance liquid chromatography*) – ultrasprawna chromatografia cieczowa

EI – (z ang. *elektron ionization*) - jonizacja elektronowa
MS – (z ang. *mass spektrometry*) - detektor masowy
MS-MS – podwójny detektor masowy
UV – detektor absorpcji w nadfiolecie
UV-VIS – detektor absorpcji w nadfiolecie i świetle widzialnym

2.9. Podsumowanie - wnioski wynikające z przeglądu literatury

Przemysł farmaceutyczny, od początku istnienia branży, obwarowany jest wieloma aktami prawnymi, określającymi kwestie produkcji, jakości leków, opakowań, dawkowania, sposobów kontroli, jakości, reklam oraz metody ich dystrybucji. Problem wzmożonej produkcji i konsumpcji leków spowodował, że zakres obecnych postanowień zawartych w dotychczas opracowanych aktach prawnych przestaje być wystarczający. Rosnący niepokój społeczny oraz wyniki badań wskazują na obecność związków lekowych w ściekach dopływających do miejskich oczyszczalni ścieków oraz w wodach naturalnych a nawet tych przeznaczonych do picia. Coraz częściej podejmowane są inicjatywy obywatelskie zwracające uwagę na uzupełnienie aktów prawnych o wytyczne związane z określeniem dopuszczalnych dawek granicznych, które zapewnią bezpieczeństwo i nienaruszalność środowiska naturalnego. Unia Europejska poczyniła już pierwsze kroki w tym kierunku, nakazując monitoring odbiorników wodnych i środowiska lądowego pod kątem obecności dwóch grup farmaceutyków (leków hormonalnych oraz leku przeciwbólowego - diklofenaku), uznanych za najbardziej popularne i zarazem niebezpieczne dla fauny i flory. Pozwala to przypuszczać, że wprowadzenie nowej dyrektywy zmusi wszystkie państwa członkowskie, w tym również Polskę, do przyjęcia tych postanowień.

W związku z rozpoczynającymi się zmianami ustawodawczymi zarówno na arenie europejskiej jak i światowej, można spodziewać się, że wkrótce zaistnieje potrzeba określenia dopuszczalnych, bezpiecznych stężeń dla różnych grup farmaceutyków występujących w środowisku oraz ich skutecznego usuwania z odbiorników wodnych i oczyszczalni ścieków. W związku z powyższym, niezbędne okaże się również poszukiwanie efektywnych metod ich zatrzymywania i poprawy stopnia rozkładu.

Projektowanie i wdrażanie technologii przeznaczonych do usuwania lub podniesienia skuteczności usuwania farmaceutyków w oczyszczalniach ścieków wydaje się odległa, przy obecnie prowadzonej polityce i stanie gospodarki Polski. Perspektywa najbliższych kilku lat raczej nie zwiastuje gwałtownych zmian w tym zakresie. Ograniczony budżet Państwa i luki prawne dotyczące usuwania leków z wód i ścieków hamuje zakres prowadzonych działań. Produkcja leków natomiast stale rośnie, co może sugerować wzrost ich obecności w środowisku. Istnieje zatem zagrożenie, że jeśli tendencja ta będzie się utrzymywać, problem związany z ich nagromadzeniem doprowadzi do nieodwracalnych zmian w ekosystemach: wodnym i lądowym. Nadzieję przynosi uchwalenie aktów prawnych, które zobligują zakłady farmaceutyczne i innych przedsiębiorców odprowadzających ścieki z zawartością farmaceutyków do zwiększenia kontroli, monitorowania i zaostrzenia kryteriów jakości

odprowadzanych ścieków, np. poprzez wprowadzenie określonych dopuszczalnych stężeń i poszukiwania prostszych i tańszych rozwiązań ich usuwania (usuwanie problemów „u źródła"). Innym, ważnym aspektem, dotyczącym skutecznej eliminacji farmaceutyków ze środowiska jest zakaz ich wyrzucania wraz z innymi odpadami komunalnymi. Oddawanie niezużytych lub/i przeterminowanych leków do punktów aptecznych lub tworzenie specjalnych punktów do tego celu przeznaczonych, powinno stać się powszechną praktyką.

Próby wprowadzenia zmian w zapisach prawnych, mających na celu uwzględnienie substancji farmaceutycznych, jako związków toksycznych i szkodliwych dla środowiska, należą do zagadnień trudnych do przeforsowania. Głównymi argumentami są perspektywy dużych nakładów inwestycyjnych związanych z budową lub modernizacją dotychczas wykorzystywanych technologii oczyszczania ścieków lub uzdatniania wody celem zwiększenia skuteczności usuwania leków. Prowadzone obecnie na terenie całego świata badania skupiające się na oszacowaniu szkód związanych z dalszą akumulacją związków farmaceutycznych w środowisku i ich wpływu na żywe organizmy, mogą być silną motywacją dla organów ustawodawczych do wprowadzenia stosownych reform.

3. Tezy i zadania badawcze pracy

3.1. Problem badawczy

Współczesna wiedza w dziedzinie medycyny i farmacji daje możliwość szybkiego, trafnego rozpoznawania oraz leczenia wielu dotychczas poznanych, jak i nowo odkrywanych przypadków chorób i towarzyszących im dolegliwości. Zakłady farmaceutyczne rozwinęły i zdynamizowały opracowywanie nowych form leków, procesów produkcji a także sprzedaży różnych grup i rodzajów oferowanych wyrobów. W związku z rosnącym zapotrzebowaniem na produkty lekowe, zarówno ich sprzedaż, jak i wytwarzanie budzą obawy w odniesieniu do aspektu ochrony środowiska. Z jednej strony skonsumowane bądź przeterminowane leki, usuwane w toaletach lub w umywalkach, przedostają się siecią kanalizacyjną do oczyszczalni ścieków. Z drugiej natomiast, proces wytwarzania leku do postaci handlowej wiąże się z odprowadzaniem pozostałości farmaceutycznych do ścieków poprodukcyjnych generowanych przez dany zakład. Ścieki pochodzące z przemysłu są transportowane do miejskiej sieci kanalizacyjnej lub, niekiedy, bezpośrednio do odbiorników wodnych. Współcześnie obowiązujące prawo polskie, europejskie czy światowe nie uwzględnia dopuszczalnych granicznych limitów dawek dla substancji farmaceutycznych. Wobec tej luki prawnej zarówno miejskie przedsiębiorstwa kanalizacyjne, jak i koncerny farmaceutyczne nie mają obowiązku monitorowania i usuwania tego rodzaju związków przed odprowadzeniem do odbiornika wodnego. Rosnąca jednak świadomość społeczna, związana z toksycznym działaniem leków w środowisku naturalnym, nakłoniła zagraniczne zakłady farmaceutyczne do ustalenia wewnętrznych procedur w zakresie stopnia redukcji i jakości odprowadzanych do kanalizacji miejskiej ścieków poprodukcyjnych zawierających ich pozostałości. Oddziały koncernów zagranicznych, funkcjonujących na terenie Polski coraz częściej starają się dostosować do standardów jednostek macierzystych. W związku z określonymi wewnętrznymi standardami danego zakładu, w zakresie jakości odprowadzanych ścieków, poszukiwane są technologie, które będą w stanie sprostać narzuconym normom. Wyzwaniem stojącym przed zaprojektowaniem właściwej technologii jest zapewnienie niskich kosztów poszczególnych elementów i urządzeń na etapie budowy, jak i eksploatacji a także możliwość sterowania parametrami układu, w celu zapewnienia jak najwyższej skuteczności usuwania produkowanych w danym zakładzie postaci aktywnych leków. Najpopularniejszą i podstawową formą oczyszczania ścieków jest metoda osadu czynnego. Obecność leków w ściekach oczyszczonych świadczy jednak o tym, że nie jest ona wystarczająca w usuwaniu tego rodzaju związków. Zmiana parametrów fizykochemicznych jak np. pH, temperatura czy wiek osadu wpływają na poprawę efektywności redukcji leków. Ponadto nie jest jednoznaczne, jakie

procesy decydują o rozkładzie leku metodą biologiczną, czy jest to biodegradacja czy np. procesy adsorpcji na kłaczkach osadu. Istotnym parametrem, decydującym o skuteczności rozkładu związku farmaceutycznego jest również stężenie danego związku. W odniesieniu do zakładów farmaceutycznych bardzo trudno jest obecnie ustalić rząd wielkości stężeń poszczególnych rodzajów leków ze względu na poufność informacji. Ważnym zagadnieniem w projektowaniu układu technologicznego, mającego na celu usuwanie określonych grup bądź rodzajów leków jest również utrzymanie wysokiego stopnia redukcji pozostałych związków zawartych w ściekach, zgodnie z obowiązującymi przepisami prawnymi.

3.2. Tezy pracy

Wobec wyżej przedstawionego problemu badawczego, w niniejszej rozprawie doktorskiej postanowiono następujące tezy:

1) **Powszechnie stosowana technologia oczyszczania ścieków miejskich oparta na metodzie osadu czynnego, na przykładzie Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach nie stanowi skutecznego rozwiązania pozwalającego na całkowite usunięcie związków farmaceutycznych zawartych w dopływających do niej ściekach.**
2) **Mikroorganizmy osadu czynnego wykazują zdolność do usuwania związków z gupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Skuteczność usuwania jest zależna od parametrów fizykochemicznych takich jak: temperatura, pH, obciążenie osadu ładunkiem zanieczyszczeń oraz stężenie tlenu.**
3) **Diklofenak i ibuprofen mogą stanowić dodatkowe źródło węgla organicznego dla bakterii osadu czynnego umożliwiające im prowadzenie procesów życiowych.**
4) **Obecność związków farmaceutycznych w ściekach dopływających do miejskich oczyszczalni ścieków zmniejsza skuteczność usuwania zawartych w nich związków biogennych.**

3.3. Zadania badawcze

W celu udowodnienia przedstawionych tez badawczych, wykonano określone zadania i przypisane im cele badawcze.

- Wobec tezy pierwszej **(TI)** podjęto następujące zadania i cele badawcze:

Zadanie 1: Przeprowadzenie badań monitoringowych mających ocenić stan zanieczyszczenia lekami NLPZ rzeki Warty w obszarze miasta Poznania.

Cel zadania 1: Analiza obecności i wielkości stężeń wybranych leków w trzech wybranych punktach rzeki Warty, w obszarze miasta Poznania. Badania przeprowadzono w latach 2012-2014. Pozwoliło to wstępnie oszacować zakres stężeń leków NLPZ w rejonie lokalnym.

Zadanie 2: Przeprowadzenie badań wstępnych pozwalających określić obecność i skuteczność usuwania wybranych leków z grupy NLPZ w 4 wytypowanych punktach Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach (pod Poznaniem).

Cel zadania 2: Zbadanie, w jakich stężeniach leki z grupy NLPZ dopływają miejską siecią kanalizacyjną do oczyszczalni ścieków oraz jaka jest skuteczność ich usuwania na poszczególnych punktach procesu oczyszczania ścieków.

Zadanie 3: Przeprowadzenie badań poglądowych pozwalających na określenie rodzajów i stężenia leków z grupy NLPZ w ściekach pochodzących z zakładów farmaceutycznych.

Cel zadania 3: Określenie zawartości aktywnych form leków z grupy NLPZ w ściekach poprodukcyjnych z wybranych sześciu zakładów farmaceutycznych, działających na terenie powiatu poznańskiego. Badane koncerny nie posiadają przyzakładowych oczyszczalni ścieków. Odprowadzenie ścieków poprodukcyjnych odbywa się bezpośrednio do sieci kanalizacji miejskiej aglomeracji poznańskiej. Zakłady prowadzą korektę w zakresie odczynu pH oraz ilości tłuszczów.

- Uzasadniając sformułowaną tezę drugą **(TII)** wykonano zadanie 4 i 5:

Zadanie 4: Przeprowadzenie testu statycznego dla zadanej temperatury otoczenia:

Cel zadania 4: oszacowanie stopnia i szybkości redukcji ibuprofenu dla przyjętego stężenia leku tj. 0,05 mg/L

Zadanie 5: Przeprowadzenie testu statycznego dla trzech wartości temperatury otoczenia:

Cel zadania 5: Oszacowanie skuteczności usuwania ibuprofenu dla zmiennych trzech wartości temperatury, przy stałym stężeniu leku 10 mg/L.

Celem przeprowadzonych testów statycznych w zadaniu 4 i 5 było także zweryfikowanie czy ten rodzaj testu z wykorzystaniem mikroorganizmów osadu czynnego wykonany w skali laboratoryjnej, oddaje zdolności mikroorganizmów do usuwania ibuprofenu w odniesieniu do warunków rzeczywistych.

- Zadania badawcze mające na celu uzasadnienie tezy drugiej, trzeciej i czwartej **(TII, TIII, TIV)** obejmują:

Zadanie 6. Zaprojektowanie i skonstruowanie nowatorskiego układu technologicznego typu SBR – etap próbny. W skład układu wchodzą dwa jednakowo pracujące reaktory tlenowe o pojemności 50L wykonane ze stali kwasoodpornej. W trakcie badań jeden reaktor (R1) stanowił punkt odniesienia, jako matryca wzorcowa w stosunku do reaktora drugiego (R2), w którym analizowany był lek przeciwbólowy. Układ zaprojektowano w taki sposób, aby mógł on pracować przez długi okres, przy stałych, określonych parametrach fizykochemicznych. Jest to główny element układu badawczego, który został zaprojektowany i wykonany w oparciu o uzyskane wcześniej wyniki analiz i przegląd literatury. W badaniach została wykorzystana postać wyjściowa diklofenaku, przed transformacją metaboliczną, ze względu na fakt, że postać handlowa leku produkowana w zakładach farmaceutycznych zawiera pierwotną, aktywną formę leku.

Cel zadania 6: Weryfikacja poprawności działania zaprojektowanego układu w okresie od września do grudnia 2016r.

Zadanie 7: Etap wpracowania osadu czynnego.

Cel zadania 7: Wstępne badania mające na celu zaadaptowanie mikroorganizmów osadu czynnego oraz ustabilizowanie parametrów pracy układu tj. temperatury, stężenia tlenu oraz utrzymanie stałego stężenia suchej masy osadu.

Zadanie 8: Etap dozowania diklofenaku w przy określonych parametrach fizykochemicznych (pH, stężenia tlenu oraz temperatury).

Cele zadania 8:

- Ocena zdolności usuwania diklofenaku na wyhodowanym i zaadaptowanym do pracy w określonych warunkach osadzie czynnym oraz oszacowanie, w jakim stopniu, przy zmiennych parametrach pracy oraz przy ciągłym dozowaniu trzech określonych stężeń diklofenaku w stopniu od najniższego do najwyższego, mikroorganizmy są w stanie redukować analizowane zanieczyszczenie.
- Sprawdzenie zdolności do adsorpcji diklofenaku na kłaczkach osadu czynnego. Zadanie przeprowadzono za pomocą ekstrakcji ciecz-ciało stałe. Ekstrakcję prowadzo z wykorzystaniem kolumienki Oasis HLB, a następnie oznaczono techniką LC-MS/MS. Wyniki uzyskane za pomocą metody chromatograficznej, zostały również potwierdzone za w badaniu z użyciem widm FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*).

Zestawienie zadań i celów badawczych zrealizowanych w ramach niniejszej pracy w odniesieniu do postawionych tez badawczych przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Zadania i cele badawcze realizowane w ramach postawionych tez badawczych

Nr zadania	Teza	Zadanie	Cel
1	**Teza 1 (TI)**	Pobór próbek z rzeki Warty w obszarze miasta Poznania.	Analiza obecności i wielkości stężeń wybranych leków w trzech wybranych punktach rzeki Warty, w obszarze miasta Poznania.
2	**Teza 1 (TI)**	Pobór próbek ścieków z 4 wybranych punktów Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach (pod Poznaniem).	Zbadanie, w jakich stężeniach leki z grupy NLPZ dopływają miejską siecią kanalizacyjną do oczyszczalni ścieków oraz jaka jest skuteczność ich usuwania na poszczególnych punktach procesu oczyszczania ścieków.
3	**Teza 1 (TI)**	Pobór próbek ścieków poprodukcyjnych z zakładów farmaceutycznych działających w obszarze i okolicach m. Poznania.	Zadanie pozwoliło na określenie zawartości aktywnych form leków z grupy NLPZ w ściekach poprodukcyjnych z wybranych sześciu zakładów farmaceutycznych, działających na terenie miasta Poznania.
4	**Teza 2 (TII)**	Przeprowadzenie testu statycznego przy zachowaniu stałych warunków zewnętrznych	Oszacowanie stopnia i szybkośći redukcji ibuprofenu dla przyjętego stężenia 0,05 mg/L przy stałej wartości temperatury otoczenia (22^{o}C)
5	**Teza 2 (TII)**	Przeprowadzenie testu statycznego dla trzech zmiennych wartości temperatury	Oszacowanie skuteczności usuwania ibuprofenu w stężeniu 10 mg/Lw zależności od wartości temperatury tj. 8, 18 i 28^{o}C
6		Projekt, budowa i eksploatacja nowatorskiego układu technologicznego typu SBR- etap wstępny	Testowanie pracy stanowiska badawczego
7		Eksploatacja nowatorskiego układu technologicznego typu SBR- etap wpracowania osadu czynnego	Ustabilizowanie pracy układu, zachowanie stałych parametrów: temperatury, tlenu, stężenia suchej masy osadu
8	**Teza (II, III, IV)**	Eksploatacja nowatorskiego układu technologicznego typu SBR- etap dozowania badanej substancji czynnej - diklofenaku.	Ocena zdolności usuwania diklofenaku na wyhodowanym i zaadaptowanym osadzie czynnym oraz oszacowanie, w jakim stopniu, przy zmiennych parametrach pracy oraz przy ciągłym dozowaniu trzech określonych stężeń diklofenaku (tj. 1,5,10mg/L) mikroorganizmy są w stanie redukować analizowany związek. Sprawdzenie zdolności do adsorpcji diklofenaku na kłaczkach osadu czynnego

4. Opis i metodyka przeprowadzonych badań

4.1. Opis ogólny wykonanych badań

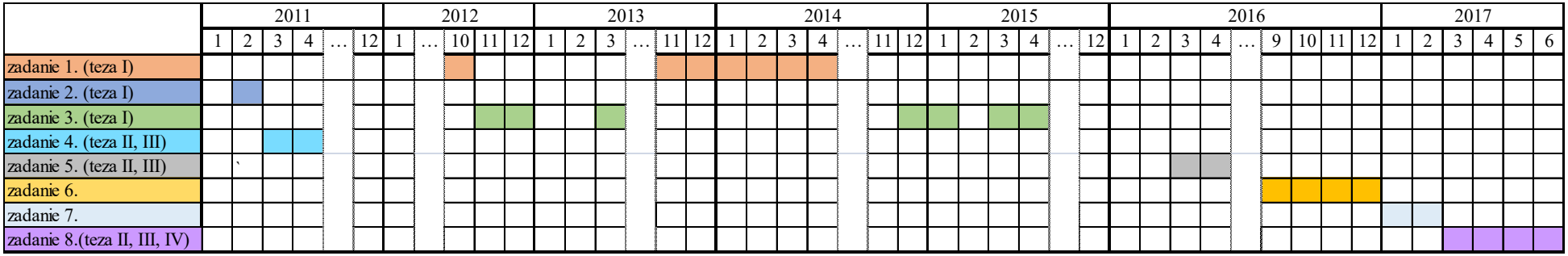
Całość badań opisanych w ramach niniejszej pracy przeprowadzono w latach 2011-2017 zakres wykonanych zadań obejmował badania terenowe oraz badania laboratoryjne. Badania terenowe miały na celu oszacowanie zawartości analizowanych leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) w warunkach rzeczywistych, występujących w:

- trzech wybranych punktach rzeki Warty w obszarze miasta Poznania i Lubonia,
- czterech określonych punktach ciągu technologicznego Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach,
- ściekach poprodukcyjnych z sześciu zakładów farmaceutycznych zlokalizowanych na obszarze powiatu poznańskiego.

Badania laboratoryjne natomiast obejmują wykonanie testów statycznych analizujących szybkość rozkładu oraz efektywność usuwania ibuprofenu przez mikroorganizmy osadu czynnego oraz test dynamiczny obrazujący sposób i zdolność rozkładu diklofenaku przy zmiennych parametrach fizykochemicznych panujących w układzie biologicznym typu SBR. Na rysunku 10 zaprezentowano harmonogram i zakres wszystkich zadań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej.

Na podstawie przeglądu literatury określono, że najczęściej występującą grupą farmaceutyków analizowaną w ściekach dopływających do miejskich oczyszczalni ścieków oraz w odbiornikach wodnych są niesteroidowe leki przeciwzapalne. W latach 2012/2013 oraz 2014/2015 przeprowadzono analizę występowania i rozkładu wybranych leków z grupy NLPZ, tj. fenoprofenu, ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu, paracetamolu oraz tolmetinu w trzech wybranych punktach rzeki Warty w obszarze miasta Poznania i Lubonia (szczegółowo opisane w pkt 4.2.1.).

Powyższe badania wykazały obecność wybranych leków z grupy NLPZ we wszystkich punktach pomiarowo-kontrolnych na odcinku rzeki Warty. Zainspirowało to do sprawdzenia, jakie źródła zanieczyszczeń mogą powodować kumulację wytypowanych leków w analizowanym cieku wodnym. W tym celu, w lutym 2011r. przeprowadzono badania określające, jakie rodzaje oraz stężenia spośród analizowanej grupy leków dopływają do Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach. Dodatkowo zbadano szybkość ich usuwania w 4 wybranych punktach ciągu technologicznego oczyszczalni, szczegółowo opisanych w pkt 4.2.2. Przebieg i efektywność usuwania leków prześledzono również



Zadanie 1. Pobór próbek wody z 3 wybranych punktów rzeki Warty w obszarze m. Poznania
Zadanie 2. Pobór próbek ścieków z 4 wybranych punktów ciągu technologicznego COŚ w Koziegłowach
Zadanie 3. Pobór próbek ścieków z zakładów farmaceutycznych Z1- Z6
Zadanie 4. Wykonanie testu statycznego określającego szybkość rozkładu ibuprofenu za pomocą osadu czynnego - seria I i II
Zadanie 5. Wykonanie testu statycznego określającego efektywność usuwania ibuprofenu w zależności od wartości temperatury z zakresu 8, 18 i 28^{o}C
Zadanie 6. Test dyamiczny diklofenaku - etap próbny
Zadanie 7. Test dynamiczny - etap wpracowania osadu
Zadanie 8. Test dynamiczny - etap dozowania diklofenaku

Rysunek 10. Harmonogram prac badawczych w latach 2011-2017

w warunkach laboratoryjnych. W tym celu, w marcu i kwietniu 2011r. przeprowadzono testy statyczne pozwalające oszacować szybkość rozkładu jednego spośród analizowanych przedstawicieli leków przeciwbólowych - ibuprofenu, za pomocą mikroorganizmów osadu czynnego (opis szczegółowy przedstawiono w pkt 4.3.1.).

Obecność leków w odpływie z oczyszczalni ścieków zainspirowała do wykonania kolejnych badań terenowych. Fakt, że w niektórych miejscach pomiarowych w rzece Warcie wystąpiły większe stężenia leków niż w ściekach oczyszczonych, pozwolił przypuszczać, że istnieją jeszcze inne źródła mogące zwiększać ładunek zanieczyszczeń farmaceutycznych w ekosystemie Warty. Dlatego, w ostatnim kroku badań terenowych przeprowadzono analizę stężeń zawartych w ściekach poprodukcyjnych z wybranych sześciu zakładów farmaceutycznych zlokalizowanych w powiecie poznańskim (opis badań zamieszczono w rozdziale 4.2.3.). Każdy z badanych zakładów odprowadza ścieki do miejskiej sieci kanalizacyjnej aglomeracji poznańskiej. Dodatkowo, uzyskane wyniki pozwoliły oszacować, jaki procent analizowanych leków dopływających do COŚ w Koziegłowach stanowią pozostałości wybranych substancji farmaceutycznych oznaczonych w ściekach poprodukcyjnych z sześciu wytypowanych zakładów przemysłowych (opisanych w pkt 4.2.3.).

Analiza stężeń leków z grupy NLPZ w wybranych punktach ciągu technologicznego COŚ w Koziegłowach oraz wyznaczonych punktach poboru z rzeki Warty doprowadziły do wniosku, że rozkład związków farmaceutycznych jest zależy od wielu parametrów fizykochemicznych oraz czynników atmosferycznych. Dlatego też, wykorzystując wcześniej analizowany w warunkach laboratoryjnych lek – ibuprofen, wykonano kolejny test statyczny. Jego założeniem była weryfikacja wpływu wybranych trzech wartości temperatury na efektywność usuwania tego związku przez mikroorganizmy osadu czynnego w ciągu jednej doby. Jednocześnie, dla każdej z trzech wytypowanych wartości temperatury wykonano pomiar stężenia leku, odczynu pH oraz chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT). Dla każdej z serii przeprowadzono analizę mikroskopową osadu czynnego. Szczegółowy opis testu statycznego został zawarty w pkt 4.3.2.

Uzyskane wyniki, pozwoliły zaobserwować podatność na biologiczne usuwanie związków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, w tym również szczegółowo przedstawionego w badaniach statycznych ibuprofenu. Na podstawie uzyskanych wyników, które wykazały wysoką podatność ibuprofenu na biodegradację i dalszego studium literatury, do dalszych badań wytypowano trudno rozkładalny lek z grupy NLPZ – diklofenak. Lek ten, wraz z ibuprofenem zajmuje czołową pozycję na liście najczęściej kupowanych i spożywanych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych. W przeciwieństwie jednak do ibuprofenu,

charakteryzuje się niską podatnością na rozkład metodami biologicznymi. W ostatnim etapie badań zaprojektowano układ dynamiczny składający się z dwóch reaktorów typu SBR, wykorzystujący mikroorganizmy osadu czynnego w celu głębszej analizy przebiegu rozkładu tego leku. Określono podatności diklofenaku na rozkład biologiczny, przy zmiennych warunkach fizykochemicznych panujących w układzie. Założone stężeżenia miały na celu odzwierciedlenie przypuszczalnych wielkości stężenia leku odprowadzanych wraz ze ściekami poprodukcyjnymi do miejskich sieci kanalizacyjnych oraz zbadanie jego wpływu na efektywność rozkładu azotu i fosforu. Badania były prowadzone od września do czerwca. Szczegóły zostały opisane w punkcie 4.4.

4.2. Badania terenowe

4.2.1. Określenie obecności wybranych NLPZ w rzece Warcie w odcinku miasta Poznania i Lubonia w latach 2012-2014

Próbki wody z rzeki Warty zostały pobrane w trzech ustalonych punktach:

1. przed ujęciem wody w Luboniu, w okolicach ul. Rzecznej,
2. przy moście św. Rocha (okolice Politechniki Poznańskiej),
3. za oczyszczalnią ścieków w Koziegłowach (okolice Akwenu Marina).

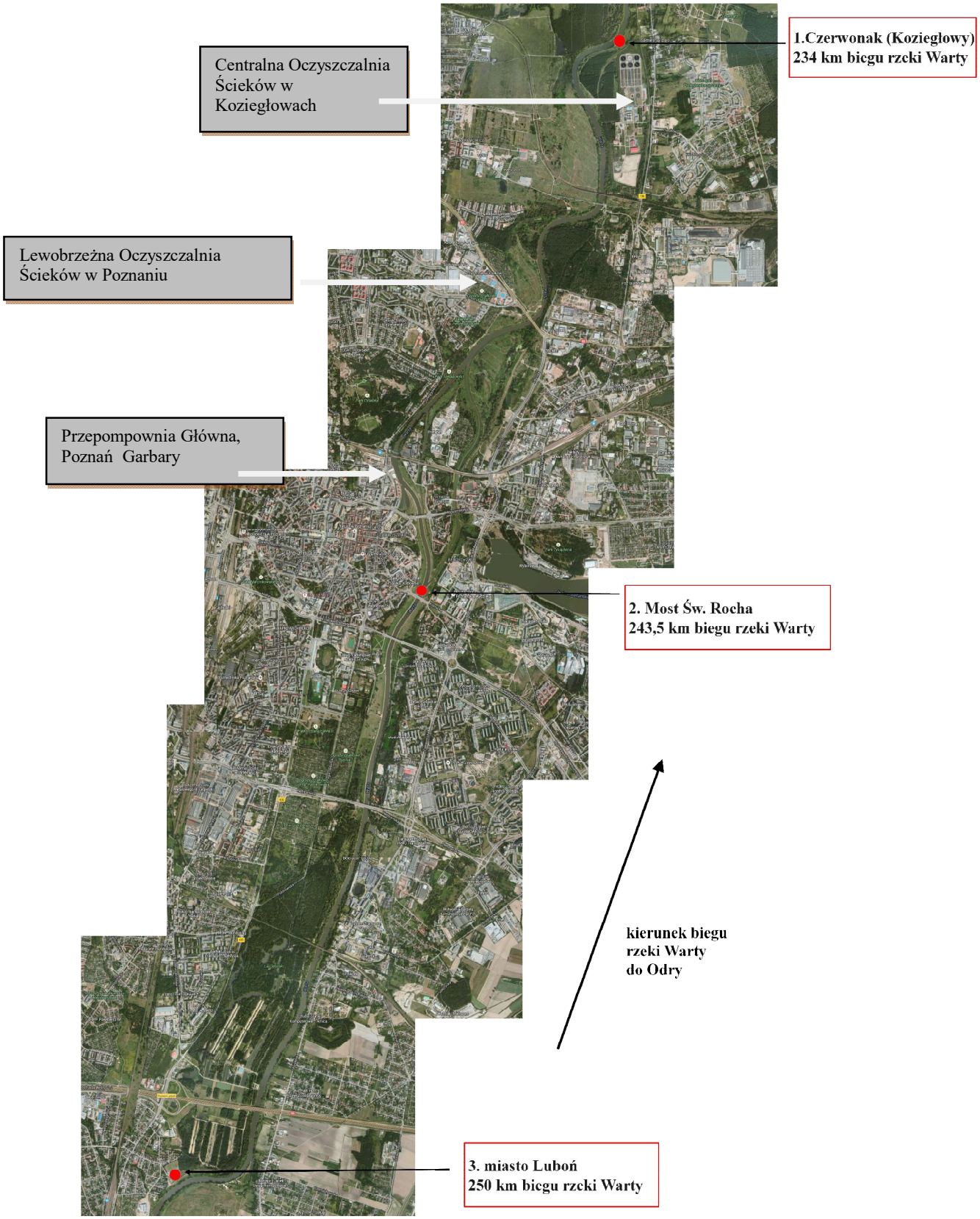
Miejsca poboru próbek zostały zaprezentowane na rysunku 11.

Sposób poboru próbek:

Pobór próbek do analiz zawartości leków w poszczególnych punktach rzeki Warty był wykonywany analogicznie, jak pobór próbek ścieków z COŚ w Koziegłowach, opisany w pkt 4.2.1. Oznaczenia obejmowały następujące rodzaje leków z grupy NLPZ: ibuprofen, ketoprofen, fenoprofen, naproksen, paracetamol oraz tolmetin. Badania zostały przeprowadzone w okresie 2012 – 2014r., w następujących miesiącach: październik 2012r., listopad, grudzień 2013r., styczeń, luty, marzec, kwiecień, 2014r.

Oznaczenie stężenia poszczególnych związków z grupy leków NLPZ:

Oznaczeń zawartości poszczególnych substancji farmaceutycznych dokonano techniką LC-MS/MS w Zakładzie Chemii Ogólnej i Analitycznej Instytutu Chemii i Elektrochemii Technicznej na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, zgodnie z metodyką przedstawioną w publikacji Zając A. i in., 2014r.



Rysunek 11. Mapa obrazująca kierunek biegu rzeki Warty w obszarze miasta Poznania z naniesionymi punktami poboru próbek

4.2.2. Określenie zawartości wybranych leków z grupy NLPZ na poszczególnych odcinkach Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach

Próbki ścieków były pobrane w czterech punktach w Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach:

1. przepompowni ścieków (ścieki surowe, za kratami i piaskownikiem),
2. reaktorze biologicznym – w komorze denitryfikacji,
3. reaktorze biologicznym – w komorze nitryfikacji,
4. na wylocie kanału odprowadzającego ścieki oczyszczone do odbiornika (rzeki Warty).

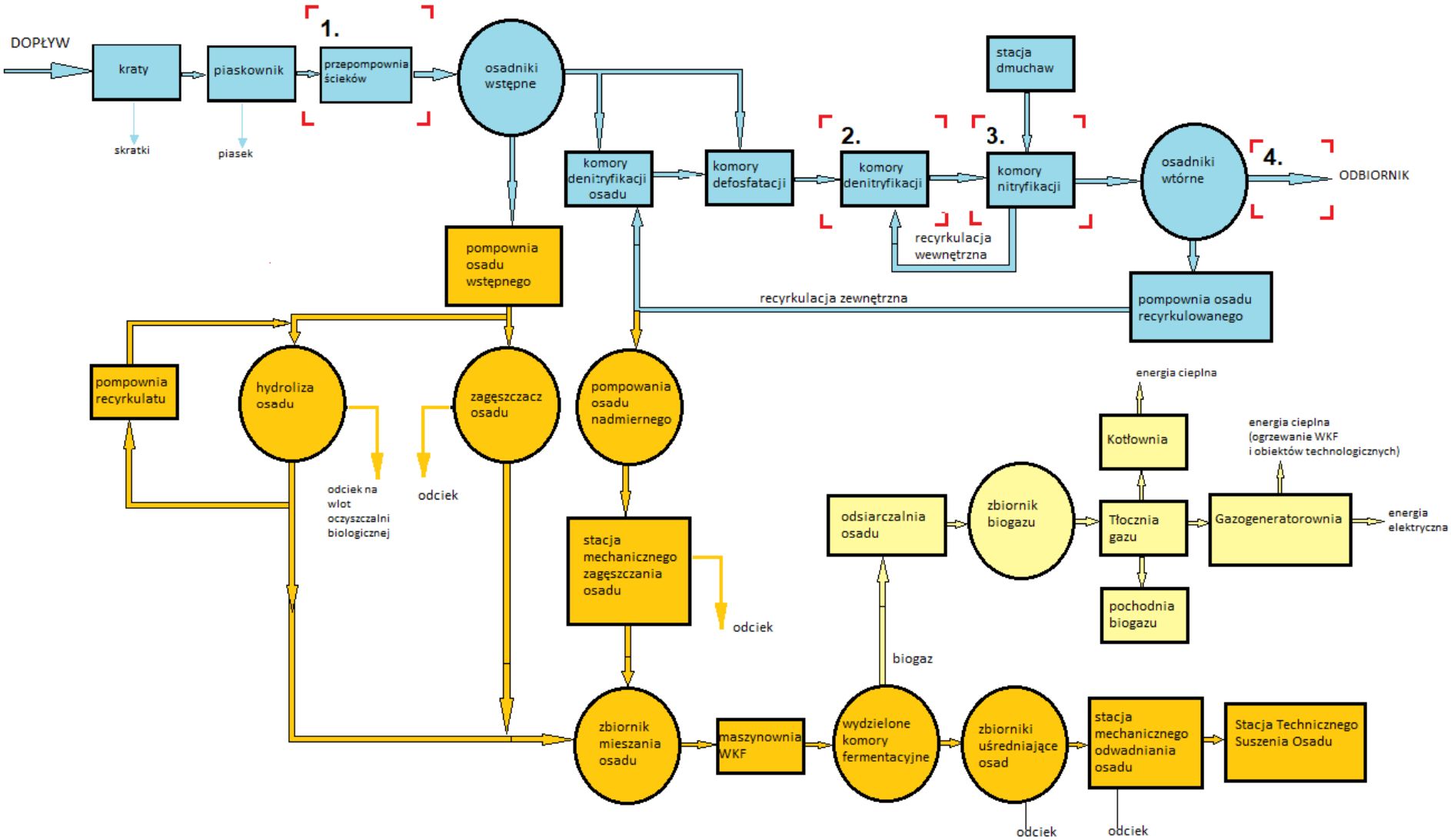
Miejsca poboru próbek zostały przedstawione na rysunku 12.

Sposób poboru próbek:

Pobór próbek następował do ciemnych butelek szklanych o pojemności 5 L, na których zostały zawarte informacje dotyczące miejsca/punktu poboru, dnia, godziny poboru oraz objętości próbki. Próbki nie były utrwalane. Bezpośrednio po przewiezieniu do laboratorium, próbki zostały przesączone na bibułowych sączkach jakościowych o średnicy 12,5cm firmy MACHEREY-NAGEL i przekazane do analizy chromatograficznej. Oznaczenia obejmowały następujące rodzaje leków z grupy NLPZ: ibuprofen, ketoprofen, fenoprofen, naproksen, paracetamol oraz tolmetin. Badania zostały przeprowadzone w lutym 2011r.

Oznaczenie stężenia poszczególnych związków z grupy leków NLPZ:

Oznaczeń zawartości poszczególnych substancji farmaceutycznych dokonano techniką LC-MS/MS z jonizacją poprzez elektrorozpylanie. Próbki wody lub ścieków, przed końcowym oznaczeniem poddano ekstrakcji do ciała stałego (SPE). Stężenia pozostałości farmaceutyków w wodach i ściekach wyznaczono techniką wielokrotnego dodatku wzorca. Badania przeprowadzono w Zakładzie Chemii Ogólnej i Analitycznej Instytutu Chemii i Elektrochemii Technicznej na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej.



Rysunek 12. Schemat Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach z zaznaczonymi miejscami poboru próbek

4.2.3. Określenie źródeł zanieczyszczeń farmaceutycznych pochodzących z wybranych zakładów farmaceutycznych w obszarze powiatu poznańskiego

W celu sprawdzenia, jakie stężenia leków z grupy NLPZ są generowane przez zakłady farmaceutyczne oraz określenia ich udziału w całkowitym ładunku transportowanym do COŚ w Koziegłowach, pobierano do badań próbki z odpływu ścieków poprodukcyjnych przedsiębiorstw zlokalizowanych na terenie powiatu poznańskiego. W latach 2012-2013 analizowano sześć zakładów przemysłowych oznaczonych symbolami Z1-Z6, natomiast w latach 2014-2015 do badań pobierano próbki dla 3 z sześciu analizowanych zakładów w roku poprzednim (tj. Z1, Z4, Z6). Rozpatrywane przedsiębiorstwa zajmują się głównie produkcją leków, dermo-kosmetyków i suplementów diety. Każdy z analizowanych zakładów odprowadza ścieki do kanalizacji sanitarnej/miejskiej aglomeracji poznańskiej.

Ze względu na fakt, że zarówno prawo polskie, europejskie i światowe nie posiada zapisów prawnych w zakresie dopuszczalnych stężeń leków, jakie zakłady farmaceutyczne mogą wraz ze ściekami produkcyjnymi odprowadzać do odbiorników wodnych czy miejskich sieci kanalizacyjnych, nie można egzekwować od przedsiębiorstw ograniczenia redukcji tych substancji.

Pobór wykonywany był bezpośrednio w studzienkach kanalizacji miejskiej mieszczącej się na terenie zakładu wytwórstwa leków. Ze względu na brak norm i wytycznych w zakresie monitorowania oraz usuwania substancji farmaceutycznych z wody czy ścieków, nie ma również jednoznacznej procedury określającej sposób poboru próbek do analiz. Próbki były pobierane trzykrotnie, w odstępach 30 minutowych. Następnie zostały one przewiezione do laboratorium i poddane analizie.

Oznaczenie stężenia poszczególnych związków z grupy leków NLPZ:

Analizowane związki obejmowały wybrane rodzaje leków z grupy NLPZ: ibuprofen, ketoprofen, fenoprofen, naproksen, paracetamol oraz tolmetin. Stężenia poszczególnych związków farmaceutycznych zawartych w ściekach poprodukcyjnych z zakładów farmaceutycznych zostały oznaczone techniką LC-MS/MS w Zakładzie Chemii Ogólnej i Analitycznej Instytutu Chemii i Elektrochemii Technicznej na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej zgodnie z metodyką przedstawioną w publikacjach: Zając A. i in., 2014r. Zembrzuska J. i in., 2016.

4.3. Określenie zawartości ibuprofenu w teście statycznym

4.3.1. Określenie szybkości degradacji ibuprofenu w funkcji czasu

W celu określenia szybkości i skuteczności rozkładu ibuprofenu, przedstawiciela leku z grupy NLPZ, wykonano dwa testy statyczne z wykorzystaniem osadu czynnego. Dodatkowo, przeprowadzone badania miały na celu sprawdzenie, czy zastosowanie testów statycznych stanowi wiarygodną metodę w ocenie stopnia usuwania analizowanego związku farmaceutycznego (jaki można uzyskać w warunkach rzeczywistych, np. w konwencjonalnej oczyszczalni ścieków wykorzystujące metody osadu czynnego, zgodnie ze studium literatury). Argumentem przeważającym nad wyborem ibuprofenu, jako substancji reprezentującej grupę leków NLPZ był fakt, że preparaty lekowe zawierające substancję czynną ibuprofen są powszechnie stosowane i dostępne na rynku bez recepty, a tym samym są najczęściej wybierane przez konsumentów (pacjentów) spośród leków ogólnodostępnych.

W pierwszym teście statycznym analizowano szybkość rozkładu ibuprofenu przy założonym stężeniu początkowym leku 0,05 mg/L. Lek dozowano jednorazowo do układu. Test przebiegał w stałej temperaturze 22^{o}C.

Przebieg badania

Mikroorganizmy osadu czynnego wykorzystane do badań w teście statycznym zostały pobrane do ciemnych butelek o pojemności 500 mL z komory tlenowej Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach. Zostały przewiezione do laboratorium. Po przelaniu osadu do 0,5 L zlewki osad napowietrzano za pomocą napowietrzacza akwariowego firmy HAILEA serii *Aco*. Oznaczenia indeksu oraz suchej masy osadu wykonano w trzech powtórzeniach.

Oznaczenie suchej masy osadu czynnego:

Do 3 cylindrów o pojemności 100 mL wlano dobrze wymieszany osad czynny. Zawartość każdego z cylindrów została przesączona przez wcześniej wysuszone i zważone sączki bibułowe (sączki jakościowe o średnicy 12,5 cm firmy MACHEREY-NAGEL). Zatrzymana na sączkach zawiesina została umieszczona w suszarce (firmy Binder typu *FD23*) i poddana suszeniu w temp. 105^{o}C przez okres 2 godzin. Niezbędną ilość suchej masy osadu, jaką należy dodać do próby badawczej o objętości 200 mL przyjęto na postawie normy PN-EN 12879:2004.

*Przygotowanie próbek do badań***:**

Do 3 z 6 kolb stożkowych dozowano roztwór ibuprofenu w ilości 200 µL, co odpowiada 80 µg analizowanego leku. Po odparowaniu metanolu, do każdej z próbek dodano wcześniej określoną ilość osadu czynnego. Pozostałą część próbki, do objętości 200 ml uzupełniono pożywką syntetyczną, której skład prezentuje tabela 9. Równocześnie przygotowano także 3 roztwory wzorcowe, zawierające tę samą ilość osadu czynnego i pożywki, co roztwory badawcze, z wykluczeniem analizowanego leku przeciwbólowego. Przygotowane próbki do badań były przechowywane na wytrząsarce w stałej temperaturze 22^{o}C i szybkości obrotów 150 obr./min. w odseparowaniu od dostępu do światła słonecznego i sztucznego. Schemat stanowiska badawczego przedstawiono na rysunku 13.

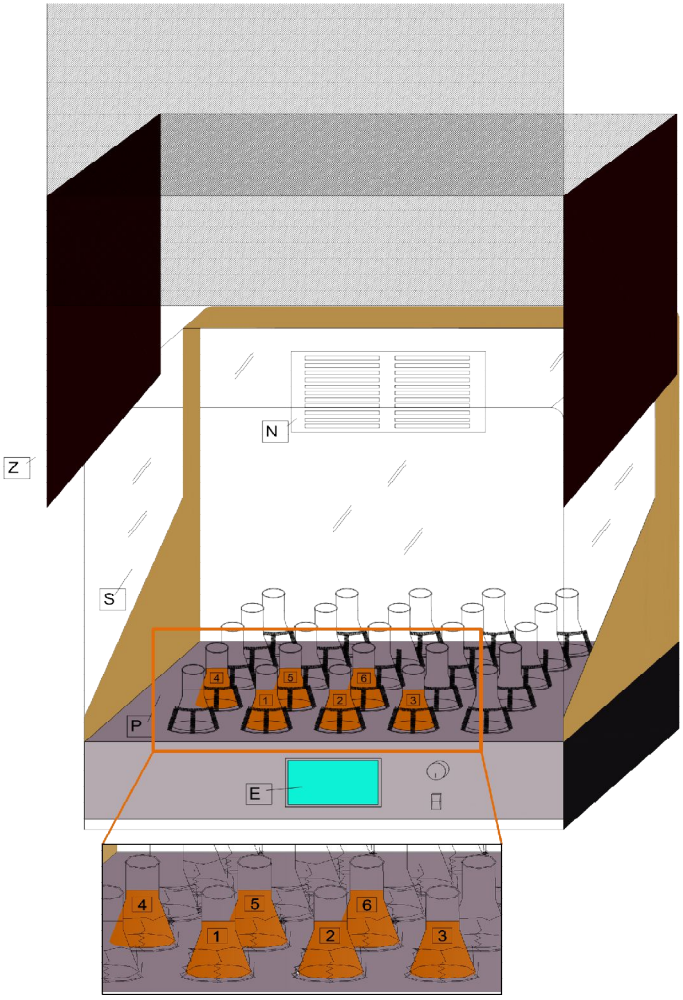
Oznaczenie stężenia ibuprofenu:

Oznaczenie zawartości ibuprofenu w funkcji czasu wykonano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas LC-MS/MS z jonizacją poprzez elektrorozpylanie, w Zakładzie Chemii Ogólnej i Analitycznej Instytutu Chemii i Elektrochemii Technicznej na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, zgodnie z metodyką przedstawioną w publikacji Zając A. i in. (2014).

Badania zostały przeprowadzone w dwóch seriach:
- I seria badawcza: marzec 2011r., czas trwania badania: 15 dni,
- II seria badawcza: kwiecień 2011r., czas trwania badania: 15 dni.

Tabela 9. Skład pożywki syntetycznej przygotowanej wg normy PN-C-04645:2001

lp.	związek chemiczny	jednostka	wartość
1	KH_2PO_4	mg	1,7
2	K_2HPO_4	mg	4,35
3	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	mg	14,95
4	$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	mg	6,68
5	NH_4Cl	mg	0,34
6	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	mg	4,5
7	$CaCl_2$	mg	5,5
8	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	mg	7,28
9	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	mg	0,05
10	$MnSO_4 \cdot H_2O$	mg	0,008
11	H_3BO_4	mg	0,0115
12	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	mg	0,0085
13	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	mg	0,007



Z - czarna zasłona chroniąca przed promieniami słońca i sztucznym oświetleniem**,**
N – wentylator**,**
S- zamykana pokrywa szklana**,**
E -ekran wskazujący parametry pracy wytrząsarki
Oznaczenia próbek:
1, 2, 3 – próbki wzorcowe, bez dodatku ibuprofenu
4, 5, 6 – próbki z dodatkiem ibuprofenu (0,05 mg/L)

Rysunek 13. Schemat stanowiska badawczego przedstawiający sposób przechowywania próbek do analiz [test statyczny-szybkość usuwania ibuprofenu w czasie]

4.3.2. Określenie szybkości rozkładu ibuprofenu w zależności od wartości temperatury

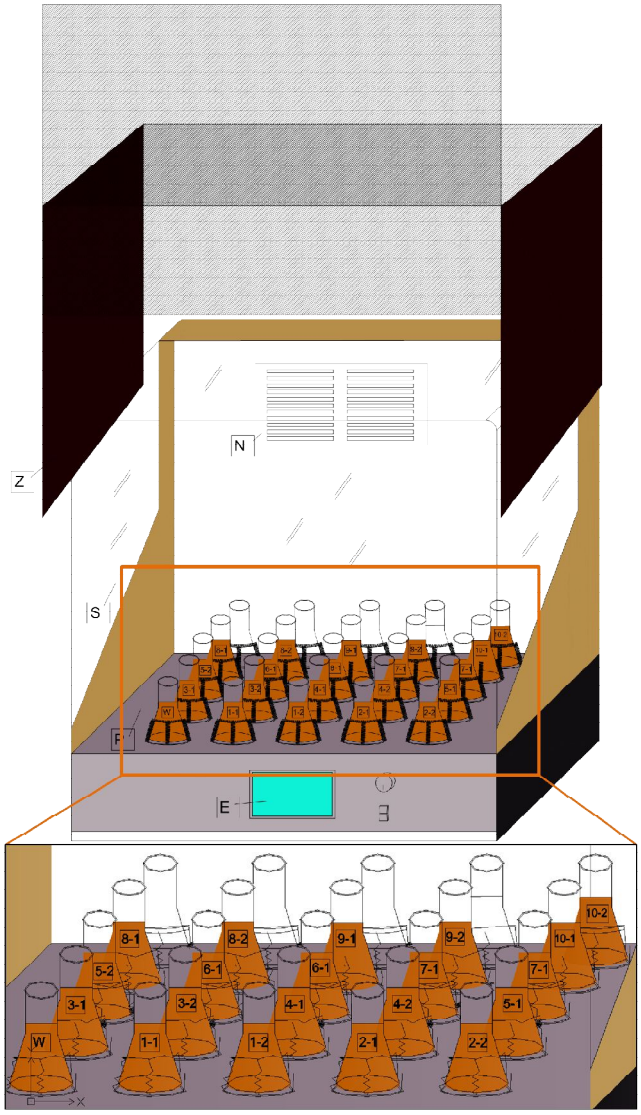
Drugie badanie degradacji przeprowadzone za pomocą testu statycznego (wg normy: PN-C-04645) w marcu i kwietniu 2016r. obejmowało analizę skuteczności usuwania ibuprofenu w określonym stężeniu (10 mg/L) dla trzech wybranych wartości temperatury (8^{o}C, 18^{o}C, 28^{o}C).

Przygotowanie próbek:

Osad czynny wykorzystany w badaniu został pobrany z komory tlenowej bioreaktora zlokalizowanego w Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach. Po przetransportowaniu do laboratorium, osad był intensywnie napowietrzany przez okres 5 h a następnie zaszczepiony, jako *inoculum* (1g/L) do sterylnych probówek z pożywką i ibuprofenem w stężeniu 10 mg/L. Przygotowane próbki zostały umieszczone w wytrząsarce typu Innova 40R firmy New Brunswick. Urządzenie zostało zaprogramowane na następujące warunki pracy: zmienną, w zależności od serii pomiarowej temperaturę: 8^{o}C, 18^{o}C, 28^{o}C oraz

stałą szybkość obrotów wynoszącą 150 obr/min. Próbki były przechowywane w odseparowaniu od światła słonecznego i sztucznego.

Dla każdej z trzech serii pomiarowych, w zależności od ustalonej temperatury przygotowywano dwa razy po 11 kolb stożkowych. Do każdej z kolb odmierzono określoną ilość osadu czynnego, tak aby stężenie osadu w każdej próbce wynosiło 1,0g s.m.o/L. Następnie dozowano dawkę ibuprofenu (Ibuprofen – $C_{13}H_{18}O_2$ (98% (GC) Pfizer, Sigma Aldrich Co. LLC) w stężeniu 10 mg/L. W badaniach przyjęto, że ibuprofen stanowi jedyne źródło węgla dla mikroorganizmów, dlatego też w czasie 1 serii pomiarowej (dla jednej z trzech określonych temperatur) trwającej 24h nie dodawano do próbek żadnych innych składników odżywczych. Następnie, każdą z próbek przygotowanych w kolbach uzupełniono wodą destylowaną do objętości 250 ml (rysunek 14).



Z - czarna zasłona chroniąca od światła,
N – wentylator**, S-** zamykana pokrywa szklana**,**
E -ekran wskazujący parametry pracy wytrząsarki
Oznaczenia próbek:
W - próba wzorcowa (bez ibuprofenu)
1-1, 1-2: (gdzie pierwsza cyfra określa nr próbki, badawczej z dodatkiem ibuprofenu, pobieranej do analiz w określonym czasie, druga cyfra wskazuje ilość powtórzeń w obrębie analizowanej próbki)

Rysunek 14. Schemat stanowiska badawczego przedstawiający sposób przechowywania próbek do analiz [test statyczny- analiza rozkładu ibuprofenu dla zmiennych wartości temperatury]

Pobór próbek odbywał się w ustalonych odstępach czasu tj. w momencie startu testu, tuż po zadozowaniu 10 mg/L (tzw. próba „0”), następnie po 0,5 h, 1,0 h, 2,0 h, 3,0 h, 4,0 h,

5,0 h, 6,0 h, 7,0 h, 8,0 h oraz 24 h od zadozowania ibuprofenu (próbkę w danej godzinie pobierano z dwóch jednakowo przygotowanych kolb- opis próbek prezentuje tabela 10).

Pobrany materiał był wykorzystywany do analizy chromatograficznej oraz do oznaczenia chemicznego zapotrzebowania tlenu (ChZT wg normy PN-ISO 15705:2005). Jednocześnie, podczas poboru prób prowadzono pomiar odczynu pH. Dodatkowo, na początku i końcu każdej serii pomiarowej wykonywana była jakościowa analiza mikroskopowa osadu czynnego przy użyciu mikroskopu firmy *Delta Optical*.

Oznaczenie stężenia ibuprofenu:

Oznaczenie zmiennego stężenia ibuprofenu w określonych odstępach czasu w cyklu dobowym przeprowadzono, podobnie jak w pozostałych przypadkach techniką LC-MS/MS z jonizacją poprzez elektrorozpylanie, w Zakładzie Chemii Ogólnej i Analitycznej Instytutu Chemii i Elektrochemii Technicznej na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej.

Tabela 10. Opisująca rodzaje analizowanych próbek z ibuprofenem w teście statycznym

Nr oznaczenia próbki	Opis analizowanej próbki
„W”	próba zerowa, wzorcowa, zawierająca wodę destylowaną i osad czynny
„0”	próba wyjściowa, zawierająca wodę destylowaną, osad czynny oraz ibuprofen w stężeniu wyjściowym 10 mg/L
1	próba z ibuprofenem pobrana po 0,5h
2	próba z ibuprofenem pobrana po 1,0h
3	próba z ibuprofenem pobrana po 2,0h
4	próba z ibuprofenem pobrana po 3,0h
5	próba z ibuprofenem pobrana po 4,0h
6	próba z ibuprofenem pobrana po 5,0h
7	próba z ibuprofenem pobrana po 6,0h
8	próba z ibuprofenem pobrana po 7,0h
9	próba z ibuprofenem pobrana po 8,0h
10	próba z ibuprofenem pobrana po 24,0h

4.4. Określenie zawartości diklofenaku w układzie dynamicznym

W tej części badań założono analizę przebiegu skuteczności usuwania diklofenaku przy zmiennych parametrach fizykochemicznych (tj. odczynu pH, stężenia tlenu oraz ilości pożywki syntetycznej). Koncepcja prowadzenia badań została zaprojektowana i wykonana z myślą o redukcji wysokich stężeń leków pochodzących ze ścieków produkcyjnych generowanych przez zakłady farmaceutyczne. Przeprowadzone badanie miało na celu zweryfikowanie, czy metoda osadu czynnego może zostać wzięta pod uwagę, jako proces technologiczny usuwający badany rodzaj farmaceutyku oraz, w jakim stopniu jest ona skuteczna. Analizie poddano lek z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych – diklofenak. Mimo, że nie był on analizowany we wcześniejszych etapach badań, wybór tego związku wydawał się zasadny ze względu na wysoko zajmowaną pozycję na liście najczęściej konsumowanych leków dostępnych bez recepty (tuż za ibuprofenem). Dodatkowym argumentem wskazującym na wybór diklofenaku jest fakt uwzględnienia go przez Parlament Europejski, w prognozie zmian dyrektywy obejmującej listę substancji toksycznych, jako jedego z trzech farmaceutyków wymagających stałego monitoringu w środowisku. Diklofenak jest jednym z najmniej podatnych leków z grupy NLPZ na procesy biologicznego rozkładu, co potwierdza studium literatury [Strenn B. i in., 2004, Zhang Y. i in., 2008, Zhou H. i in., 2013, Vieno N. i in., 2014]. W pracy badawczej diklofenak jest analizowany w strukturze wyjściowej, nierozłożonej, przed transformacją metaboliczną, wynikającą z konsumpcji, ze względu na fakt, że postać handlowa leku produkowana w zakładach farmaceutycznych zawiera pierwotną, aktywną formę leku. Analiza skuteczności usuwania diklofenaku pozwoliła również określić efektywność redukcji innych parametrów opisujących jakość ścieków odprowadzanych do kanalizacji miejskiej.

Harmonogram i przebieg badań

Cały cykl badawczy rozpoczął się w drugiej połowie września 2016r. Po przywiezieniu osadu czynnego z COŚ w Koziegłowach do laboratorium, osad został rozlany do dwóch reaktorów R1 i R2. Głównym zadaniem było ustabilizowanie parametrów pracy w układach w zakresie: temperatury na poziomie 20^{o}C oraz tlenu w granicach 2 mgO_2/L ± 1,0 mgO_2/L. W tym czasie również sprawdzano wpływ wybranej do badań pożywki syntetycznej na mikroorganizmy osadu czynnego, stanowiącej odpowiednik ścieków rzeczywistych (jej skład przedstawiono w tabeli 12). Wytypowana pożywka nie przyniosła założonych rezultatów. Zaobserwowano spadek suchej masy osadu, spadek liczebności i żywotności mikroorganizmów, wzrost produkcji amoniaku oraz duże wahania odczynu pH. Drugi cykl

wpracowania układu obejmował zmianę składu pożywki oraz wyeliminowanie składników, które w założeniu miały wpływ na niestabilną pracę układu. W trzecim tygodniu badań od momentu zmiany składu pożywki (na przełomie listopada i grudnia 2016r.) uzyskano poprawę i równowagę pracy układu w zakresie odczynu pH, tlenu oraz zmian ilościowych i jakościowych mikroorganizmów osadu czynnego. W grudniu 2016r. zakończono etap badań w zakresie testowania pracy osadu czynnego w zaprojektowanym układzie badawczym oraz ustalono ostateczny skład pożywki. Od stycznia 2017r. uruchomiono ponownie układ badawczy dla nowo przywiezionego osadu, pobranego z komory tlenowej COŚ w Koziegłowach. Po 2 miesiącach obserwacji i uzyskaniu powtarzalnych wyników pracy w obu reaktorach, w marcu 2017r. rozpoczęto badania obejmujące 6 serii badawczych. Każda z nich trwała 12 dni, podczas których do reaktora R2 dozowano substancję czynną diklofenak w trzech ustalonych stężeniach: 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, przy założonym czasie zatrzymania 4 dób. Po każdym cyklu następowała 4-dniowa przerwa w dozowaniu leku, w celu regeneracji układu i przygotowanie do kolejnego cyklu badań. W tym czasie do reaktorów R1 i R2 dozowano jedynie pożywkę syntetyczną.

Wykonanie testu dynamicznego zostało przeprowadzone w 6 cyklach badawczych:

Cykl wprowadzający „O" – obejmował wpracowanie i przystosowanie osadu czynnego do warunków laboratoryjnych i zapewnienie stałych warunków pracy układu w temperaturze $20^{o}C \pm 2^{o}C$, pH: 6,5 - 7,5, stężeniu tlenu na poziomie 2 $mgO_2/L \pm 1$ mgO_2/L i jednakowym obciążeniu ściekami syntetycznymi – przy założonym czasie zatrzymania 4 d. Cykle badawcze oznaczone „I-V" obejmowały analizę efektywności usuwania diklofenaku dla trzech wybranych stężeń leku: 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, przy ustalonych w cyklu „O" warunkach pracy układu, tj. temperatury: $20^{o}C \pm 2^{o}C$ oraz stężenia tlenu na poziomie 2 $mgO_2/L \pm 1$ mgO_2/L. W cyklach badawczych od I do IV analizowaną zmienną była wartość odczynu pH. W serii „I" wartość odczynu pH została ustabilizowana przez mikroorganizmy osadu czynnego w wyniku zachodzących przemian w układzie na poziomie 7,0-7,5 (na rysunkach 41-55 odczyn ten został zdefiniowany jako „naturalny"). W cyklu „II" odczyn pH wynosił 7,5, natomiast w kolejnych cyklach, od II do IV, był obniżany kolejno o 1,0 i 0,5 (zatem w cyklu „III" odczyn pH został ustabilizowany na poziomie 6,5, a w „IV" utrzymywano wartość 6,0). Korekta pH była prowadzona molowym kwasem solnym HCl lub 3-molowym wodorotlenkiem sodu NaOH. W cyklu „V" zachowano warunki pracy układu, jak we wcześniejszych seriach badawczych. Odczyn pH został ustalony przez mikroorganizmy osadu czynnego. Cykl ten zakładał analizę skuteczności usuwania diklofenaku, przy zmniejszonej o 5% ilości węgla w pożywce wyjściowej. Ostatni, dodatkowo wprowadzony „VI" etap badań obejmował

sprawdzenie skuteczności usuwania diklofenaku przy zmniejszonym stężeniu tlenu wahającym się w granicach 0,5 - 1,0 mg/L. Został on przeprowadzony jedynie dla najwyższego stężenia 10 mg/L. Trwał, zgodnie z przyjętą długością czasu zatrzymania 4 dni. Zakres prowadzonych analiz był taki sam, jak w cyklach poprzednich. W każdej serii badawczej (od I do VI), codziennie wykonywano pomiar: suchej masy osadu, temperatury, tlenu oraz, w zależności od potrzeby, korektę pH. Analiza parametrów: fosforu ogólnego P_{og}, ortofosforanów – $P\text{-}PO_4$, azotu ogólnego – N_{og}, azotanów $N\text{-}NO_3$, amoniaku $N\text{-}NH_4$, ChZT, BZT_5 odbywała się w momencie startu testu, po 24h oraz po 4 dobie każdego z trzech wybranych stężęń diklofenaku.

Harmonogram i dni poboru próbek do analiz zaprezentowano na rysunku 15.

rok/ miesiąc	2016				2017					
	IX	X	XI	XII	I	II	III	IV	V	VI
Wpracowanie osadu, testowanie pożywki, analiza przyrostu osadu	x	x	x	x						
Badania właściwe - wpracowanie osadu, analiza suchej masy					x	x	x			

rok/miesięc/dzień rodzaj prowadzonych prac R2	2017/03/																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
dozowanie pożywki + 1 mg/L DLC, pH-naturalne																				x	x	x	x								
dozowanie pożywki + 5 mg/L DLC, pH-naturalne																								x	x	x	x				
dozowanie pożywki + 10 mg/L DLC, pH-naturalne																												x	x	x	x

rok/miesięc/dzień rodzaj prowadzonych prac R2	2017/04/																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
przerwa, dozowanie pożywki, korekta pH = 7,5	x, P	P	P	P																										
dozowanie pożywki + 1 mg/L DLC, korekta pH = 7,5					x	x	x	x																						
dozowanie pożywki + 5 mg/L DLC, korekta pH = 7,5									x	x	x	x																		
przerwa, dozowanie pożywki, pH= 7,5 (okres Świąt Wielkanocnych)													P	P	P	P	P													
dozowanie pożywki + 10 mg/L DLC, korekta pH = 7,5																		x	x	x	x									
przerwa, dozowanie pożywki, korekta pH = 6,5																						x, P	P	P	P					
dozowanie pożywki + 1 mg/L DLC, korekta pH = 6,5																										x	x	x	x	
dozowanie pożywki + 5 mg/L DLC, korekta pH = 6,5																														x

rok/miesięc/dzień rodzaj prowadzonych prac R2	2017/05/																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
dozowanie pożywki + 5 mg/L DLC, korekta pH = 6,5	x	x	x																												
dozowanie pożywki + 10 mg/L DFN, korekta pH = 6,5				x	x	x	x																								
przerwa, dozowanie pożywki, korekta pH = 6,0								x, P	P	P	P																				
dozowanie pożywki + 1 mg/L DLC, korekta pH = 6,0												x	x	x	x																
dozowanie pożywki + 5 mg/L DLC, korekta pH = 6,0																x	x	x	x												
dozowanie pożywki + 10 mg/L DLC, korekta pH = 6,0																				x	x	x	x								
przerwa, dozowanie pożywki, bez korekty, pH naturalne																								x, P	P	P	P				
dozowanie pożywki z obniżoną zawartością C + 1mg/L DLC, pH naturalne																												x	x	x	x

rok/miesięc/dzień rodzaj prowadzonych prac R2	2017/06/																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
dozowanie pożywki z obniżoną zawartością C + 5mg/L DLC, pH naturalne	x	x	x	x																										
dozowanie pożywki z obniżoną zawartością C + 10mg/L DLC, pH naturalne					x	x	x	x																						
przerwa, dozowanie pożywki, , bez korekty, pH naturalne									x, P	P	P																			
dozowanie pożywki + 10mg/L DLC, stężenie tlenu ok. 1mg/L, pH naturalne												x	x	x	x	x														

* w reaktorze R1 prowadzono ww. czynności z pominięciem dozowania diklofenaku

DLC - diklofenak

dni poboru prób dla 1 mg/L DLC

dni poboru prób dla 5 mg/L DLC

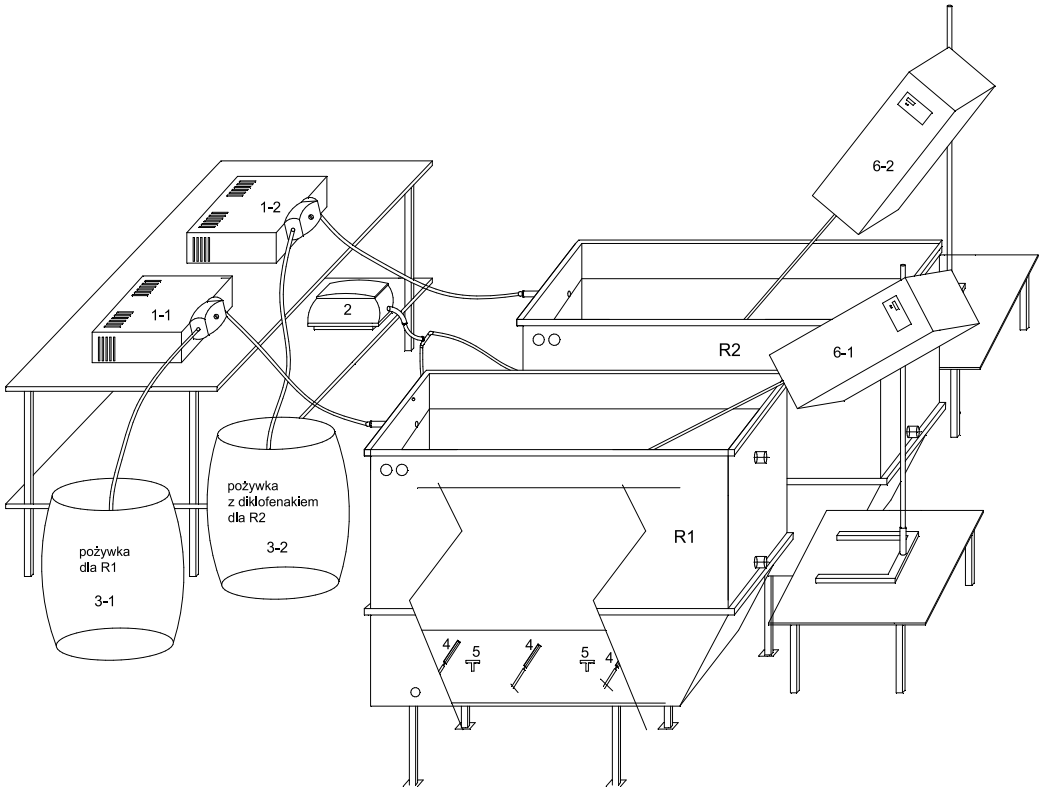
dni poboru prób dla 10 mg/L DLC

Rysunek 15. Harmonogram badań testu dynamicznego (okres od wpracowania osadu czynnego do zakończenia badań właściwych z dozowaniem diklofenaku) - opis oznaczeń na str. 88

Oznaczenia do rysunku 15: P – przerwa, **x**- dni poboru próbek do analiz podczas dozowania diklofenaku w stężeniu 1 mg/L, **x** -dni poboru próbek do analiz podczas dozowania diklofenaku w stężeniu 5 mg/L, **x** - dni poboru próbek do analiz podczas dozowania diklofenaku w stężeniu 10 mg/L

Budowa stanowiska badawczego

Sprawdzenie skuteczności usuwania diklofnaku zostało przeprowadzone w zaprojektowanym i wykonanym w skali laboratoryjnej układzie/modelu oczyszczalni ścieków, którego schemat przedstawiono na rysunku 16. Badania miały na celu ocenę stopnia usuwania diklofenaku na wyhodowanym i adaptowanym do pracy w określonych warunkach osadzie czynnym, pobranym jednorazowo z komory tlenowej z COŚ w Koziegłowach.



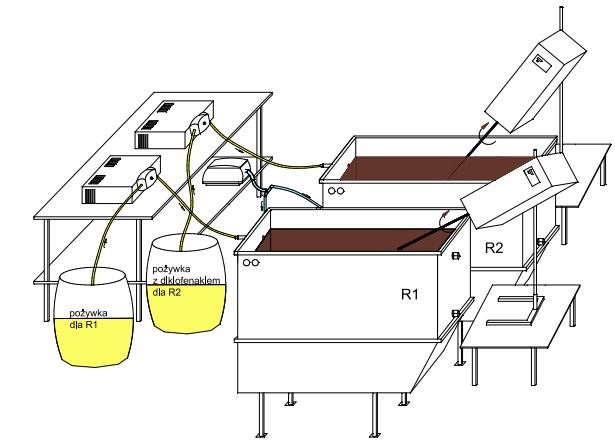
Rysunek 16. Schemat stanowiska badawczego bioreaktorów R1 i R2

Oznaczenia: R1 – bioreaktor tlenowy (reaktor wzorcowy, bez dozowania diklofenaku), **R2** – bioreaktor tlenowy (reaktor, do którego dozowano diklofenak), **1-1**- pompa dozująca pożywkę do reaktora R1, **1-2** – pompa dozująca pożywkę do reaktora R2, **2** – dmuchawa, **3-1** beczka z pożywką bez diklofenaku dozowana do reaktora R1, **3-2** – beczka z pożywką z diklofenakiem dozowana do reaktora R2, 4 – napowietrzanie dorobopęcherzykowe, **5** – napowietrzanie grubo pęcherzykowe, **6-1** – mieszadło reaktora R1, **6-2**- mieszadło reaktora R2

Badania były prowadzone równolegle w dwóch reaktorach typu SBR o nazwach roboczych R1 i R2, wykonanych ze stali nierdzewnej o pojemności czynnej 50 L. Na dnie komór zostały zainstalowane dysze drobno i grubopęcherzykowe. Powietrze do reaktorów było tłoczone za pomocą dmuchawy firmy AirTech model DBMX120 o wydajności 120 L/min. Zbiornik oznaczony symbolem R1 stanowił reaktor wzorcowy, porównawczy, w którym dozowany był jedynie ściek syntetyczny (pożywka syntetyczna, skład przedstawiony w tabelach 12-14), bez dodatku substancji czynnej – diklofenaku. W reaktorze R2 natomiast, oprócz pożywki syntetycznej dozowano określoną ilość analizowanego leku - diklofenaku.

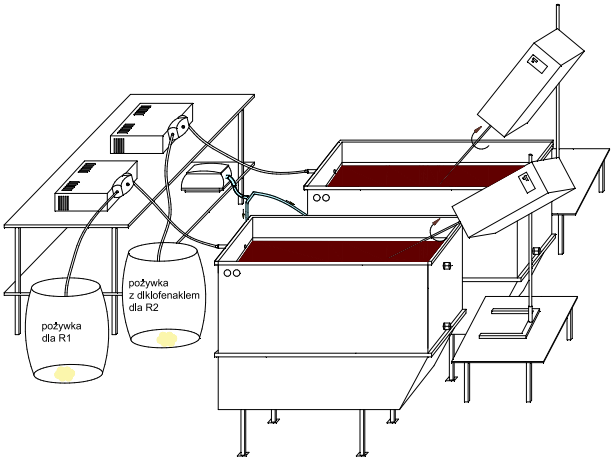
Pożywka syntetyczna była transportowana do układu za pomocą dwóch pomp dozujących (odrębnie dla każdego z reaktorów) firmy JIHPUMP model 153Yx o wydajności przepływu 0 – 2,36 L/min i prędkości 0,1-600 obr/min. Dodatkowo, w celu utrzymania równomiernego rozprowadzenia pożywki oraz dodawanej substancji czynnej – diklofenaku w reaktorach, do układu wprowadzono laboratoryjne mieszadła mechaniczne typu BMX-15 o prędkości 150 obr/min. Reaktory były wyposażone w grzałki z termostatem o mocy 75W, pozwalające na utrzymanie stałej temperatury w układzie na poziomie $20^{o}C \pm 2^{o}C$.

Na rysunku 17 zaprezentowano poszczególne fazy pracy reaktora. Pracę układu rozpoczynało równomierne (o jednakowym natężeniu) dozowanie pożywki do objętości czynnej reaktorów R1 i R2 wynoszącej 50 L w cyklu 24 h. Po upływie doby wyłączano pompy dozujące pożywkę. Następnie, z każdego z reaktorów pobierano próbkę ścieków o objętości 2x100 mL do analizy suchej masy osadu. Na podstawie uzyskanego wyniku suchej masy osadu z dnia poprzedniego, usuwano osad nadmierny z układu. W bioreaktorach starano się utrzymywać stałe stężenie osadu czynnego równe 3 g/L. Po odrzuceniu właściwej objętości osadu nadmiernego wyłączano napowietrzanie oraz mieszadła w celu sedymentacji kłaczków osadu. W kolejnym etapie dekantowano ciecz nadosadową w ilości zapewniajacej czas zatrzymania wynoszącemu 4d. Odrzucona ciecz nadosadowa stanowiła materiał do analiz stężenia diklofenaku oraz poszczególnych parametrów charakteryzujących ściek oczyszczony, tj. ChZT, BZT_5, azot ogólny, azot amonowy, azot azotanowy, fosfor ogólny ortofosforany. Pobór prób do analiz odbywał się zgodnie z przedstawionym na rysunku 15 harmonogramem prac. Przed ponownym uruchomieniem układu, codziennie czyszczono przewody doprowadzające pożywkę do reaktorów za pomocą strumienia ciepłej i zimnej wody. W etapie końcowym załączano napowietrzanie, mieszadła oraz pompy dozujące pożywkę. Dwa razy dziennie, w odstępach sześciogodzinnych, odbywał się pomiar stężenia tlenu, pH oraz temperatury. Raz w tygodniu natomiast pobierano próbkę do analiz mikrobiologicznych.



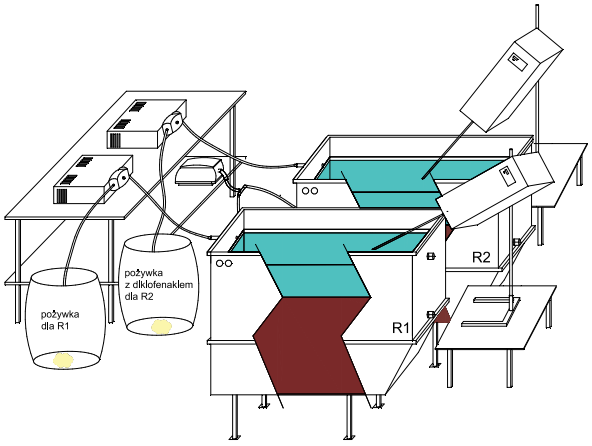
Faza I

Dozowanie pożywki do reaktorów R1, R2 do objętości 50 L w cyklu 24 dobowym. (przy jednoczesnym utrzymaniu stałych warunków temperatury, tlenu oraz intensywności mieszania).



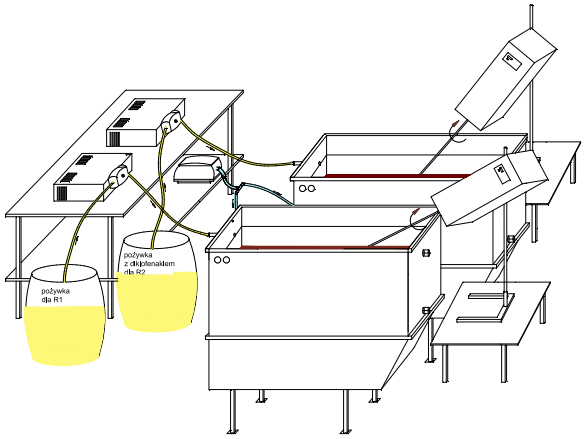
Faza II

Wyłączenie pomp dozujących. Usunięcie osadu nadmiernego zgodnie z założonym stężeniem osadu. Pobór prób do oznaczenia suchej masy osadu i analiz mikrobiologicznych



Faza III

Wyłączenie napowietrzania oraz mieszania. Odebranie cieczy nadosadowej zgodnie z założonym czasem zatrzymania. Pobór prób do analizy parametrów ścieków oczyszczonych



Faza IV

Podłączenie pomp dozujących tłoczących pożywkę, napowietrzania oraz mieszadeł.

Rysunek 17. Fazy pracy układu dynamicznego

Analiza parametrów fizykochemicznych

Oznaczanie parametrów suchej masy osadu, fosforu ogólnego Pog, ortofosforanów – P-PO_4, azotu ogólnego – N_{og}, azotanów N-NO_3, amoniaku N-NH_4, ChZT, BZT_5 zostały przeprowadzone wg norm lub wytycznych, które prezentuje poniższa tabela 11.

Tabela 11. Metody oznaczania poszczególnych parametrów fizykochemicznych

Badany parametr	**Sposób wykonania oznaczeń**
Sucha masa osadu [gsm/L]	PN-EN 12880:2004 Charakterystyka osadów ściekowych - Oznaczanie suchej pozostałości i zawartości wody
Azot amonowy N-NH_4 [mgNNH_4/L]	PN-ISO 7150-1:2002, Jakość wody – Oznaczanie azotu amonowego – Część 1: Manualna metoda spektrometryczna
Azot azotanowy N-NO_3 [mgNNO_3/L]	Testy kuwetowe firmy NANOCOLOR, metoda nr 1-65 z pominięciem etapu mineralizacji próbki badawczej
Azot ogólny Nog [mgN_{og}/L]	Testy kuwetowe firmy NANOCOLOR, metoda nr 1-65 z uwzględnieniem mineralizacji próbki badawczej
Ortofosforany P-PO_4 [mgPPO_4/L]	Testy kuwetowe firmy NANOCOLOR, metoda 1-77: oznaczanie barwy błękitu molibdenowego po redukcji fosforomolibdenianu (z pominięciem mineralizacji próbki badawczej)
Fosfor ogólny Pog [mgP_{og}/L]	Testy kuwetowe firmy NANOCOLOR, metoda nr 1-77 z uwzględnieniem mineralizacji próbki badawczej
Chemiczne zapotrzebowanie tlenu ChZT [mgO_2/L]	PN-ISO 15705:2005, Jakość wody – Oznaczanie indeksu chemicznego zapotrzebowania tlenu (SP-ChZT) – Metoda zminiaturyzowana z zastosowaniem szczelnych probówek
Biochemiczne zapotrzebowanie tlenu BZT [mgO_2/L]	EN 1889-1:1998 E, Jakość wody – Oznaczanie biochemicznego zapotrzebowania tlenu po n dniach (BZTn) – Część 1: Metoda rozcieńczania i szczepienia z dodatkiem allolotiomocznika (ISO 5815: 1989 zmodyfikowana)
Stężenie diklofenaku [mg/L]	Oznaczenia zawartości poszczególnych substancji farmaceutycznych dokonano techniką LC-MS/MS z jonizacją poprzez elektrorozpylanie. Próbki wody lub ścieków, przed końcowym oznaczeniem poddano ekstrakcji do ciała stałego (SPE). Stężenia pozostałości farmaceutyków w wodach i ściekach wynzaczano techniką wielokrotnego dodatku wzorca. Badania przeprowadzone w Zakładzie Chemii Ogólnej i Analitycznej Instytutu Chemii i Elektrochemii Technicznej na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki
Adsorpcja diklofenaku na kłaczkach osadu	1) metoda pomiaru: Ekstrakcja ciecz- ciało stałe (SPE) prowadzona z wykorzystaniem kolumienki Oasis HLB a następnie oznaczano techniką LC-MS/MS wykonano na Wydziale Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej 2) metoda widma FTIR z wykorzystaniem spektrofotometru Vertex 70 (Bruker) wykonano na wydziale Technologii Chemicznej

Przygotowanie pożywki (ścieku syntetycznego)

Do badań prowadzonych w reaktorach typu SBR wykorzystano dwa rodzaje pożywek syntetycznych. Pierwsza z nich została zaczerpnięta z publikacji Kosjek T. i in. [2007], której skład prezentuje tabela 12:

Tabela 12. Skład pierwotnie przygotowywanej pożywki

składnik	**stężenie [mg/L pożywki]**
ekstrakt drożdżowy	130
pepton kazeinowy	130
ekstrakt mięsny	130
CH_3COONH_4	317
NH_4Cl	40
K_2HPO_4	24
KH_2PO_4	8
$CaCO_3$	100
$MgCO_3$	100
NaCl	40
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5
woda destylowana	uzupełnienie do objętości 1L

Po przygotowaniu pożywki, rozlaniu jej do 0,5L butelek szklanych i ustaleniu jej pH między 7,2 – 7,5 przechowywano ją w lodówce, w temperaturze 5^oC. Trwałość pożywki w tych warunkach wynosiła 4 doby. Ze względu na dużą objętość reaktorów typu SBR, w których przeprowadzano badania efektywności usuwania diklofenaku, pożywka była wykonywana w 100-krotnym zatężeniu. Pożywkę na potrzeby badań przygotowywano codziennie lub co drugi dzień. Bezpośrednio przed użyciem rozcieńczano ją wodą wodociągową, która dodatkowo była uzdatniana przez dwa wymienne filtry mechaniczne o średnicy 10 µm oraz 5 µm oraz filtr węglowy. Początkowo pożywkę poddawano sterylizacji w 120^oC przez 20 min. Zawarte w składzie pożywki $CaCO_3$ oraz $MgCO_3$ oraz z $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ wytrącały się na dnie beczki, z której dozowano rozcieńczony ściek syntetyczny bezpośrednio do reaktorów. Dlatego też na etapie wpracowania osadu czynnego, wyeliminowano te składniki, zapewniając ich obecność w wodzie wodociągowej, służącej do rozcieńczania zatężonego roztworu pożywki. Wyeliminowanie tych składników nie wpłynęło negatywnie na buforowość układu i stabilność odczynu pH w reaktorach. Na etapie testowania pracy reaktorów w okresie od września do listopada, do których dozowano zmodyfikowany ściek syntetyczny, analiza mikrobiologiczna wskazała intensywne namnażanie się kolonii drożdży. Zaobserwowano

mniejszy przyrost biomasy lub całkowite zahamowanie wzrostu mikroorganizmów, wysoki indeks osadu i rozwój bakterii nitkowatych a także brak drobnych orzęsków swobodnie pływających i kroczących. Na etapie testowania wybranej pożywki, na przełomie listopada i grudnia 2016r., wyeliminowano ze składu ekstrakt drożdżowy zastępując go glukozą. Zmiana ta pozwoliła na wyeliminowanie drożdży z układu, a także wpłynęła na namnażanie mikroorganizmów charakterystycznych dla rozwoju w warunkach tlenowych w oczyszczalni ścieków, głównie orzęsków (*Epistylis lacustris*, *Epistylis plicatilis, Vorticella microstoma*, *Carchesium polypinum*, *Opercularia coarctata*), wrotek (*Rotaria rotatora, Caphalodella sp.*) czy krzemionóżek (*Arcella sp., Amoeba proteus*). Ostatecznie, zmodyfikowana w stosunku do wyjściowego składu pożywka zawierała następujące składniki (tabela 13):

Tabela 13. Zmodyfikowany skład pożywki [w stosunku do Kosjek T i in., 2007]

składnik	**stężenie [mg/L pożywki]**
pepton kazeinowy	130
ekstrakt mięsny	130
CH_3COONH_4	317
NH_4Cl	40
K_2HPO_4	24
KH_2PO_4	8
NaCl	40
glukoza	114
woda destylowana	uzupełnienie do objętości 1L

Pożywka przedstawiona w tabeli 13 została ponownie zweryfikowana w nowo rozpoczętym teście dynamicznym w styczniu 2017r. Na etapie wpracowania osadu czynnego, prowadzono codzienną analizę suchej masy osadu oraz kontrolowano parametry: temperatury, pH i stężenia tlenu. Raz w tygodniu pobierano próbki osadu z reaktorów R1 i R2 do analizy mikrobiologicznej. Pierwszy tydzień badań wskazywał prawidłową pracę osadu czynnego oraz wzrost biomasy. W kolejnych tygodniach zaobserwowano spadek biomasy i niewielki przyrost. Nastąpiła zmiana koloru osadu z ciemno na jasnobrązowy. Zaobserwowano liczne bakterie i grzyby nitkowate. W osadzie dominował intensywny zapach amoniaku oraz octanów, spowodowany przez wysoką wartość pH (powyżej 8,2). Ze względu na pogarszający się stan osadu czynnego, 9 lutego 2017r. zmieniono pożywkę syntetyczną, eliminując z jej składu octan amonu (CH_3COONH_4) oraz chlorek amonu (NH_4Cl) zastępując je mocznikiem ($CO(NH_2)_2$). Z pożywki usunięto także diwodorofosforan potasu. Ostateczny skład pożywki, który został zastosowany do końca badań został zamieszczony w tabeli 14.

Tabela 14. Skład ostatecznie wytypowanej pożywki

składnik	**stężenie [mg/L pożywki]**
pepton kazeinowy	160
ekstrakt mięsny	110
Mocznik $CO(NH_2)_2$	30
K_2HPO_4	28
NaCl	11
glukoza	114
diklofenak	dozowany do reaktora R2 w ilości 1, 5 lub 10 mg/L
woda destylowana	uzupełnienie do objętości 1L

Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego

Jako uzupełnienie do oznaczeń parametrów technologicznych, charakteryzujących jakość ścieków oczyszczonych oraz oceny skuteczności usuwania diklofenaku, prowadzono analizę mikroskopową. Obserwacje były wykonywane raz w tygodniu. Ich zakres obejmował określenie: kształtu, struktury oraz trwałości kłaczków osadu czynnego, a także ich wielkość i skład. Organoleptycznie oceniano barwę i zapach osadu. Analiza mikroskopowa była prowadzona w Zakładzie Zaopatrzenia w Wodę i Ochrony Środowiska w Politechnice Poznańskiej.

Adsorpcja

W celu określenia, czy i w jakim stopniu rozkład diklofenaku nastąpił w wyniku adsorpcji, wykonano dodatkowe badanie chromatograficzne. Do analiz pobrano próbki zawierające ciecz nadosadową (uzyskaną po wyłączeniu napowietrzania w bioreaktorach i sedymentacji osadu czynnego) oraz taką samą objętość próby po wymieszaniu zawartości bioreaktora, przed wyłączeniem napowietrzania i sedymentacją. Obie próby były przygotowywane techniką ekstrakcji do ciała stałego.

Próbki z testu biodegradacyjnego poddano ekstrakcji ciecz – ciało stałe. W tym celu do 2 mL próbki pobranej z odpowiedniego reaktora dodano 8 mL wody destylowanej. Tak przygotowaną próbkę poddawano ekstrakcji SPE. Ekstrakcję prowadzono z wykorzystaniem kolumienki Oasis HLB. Procedura ekstrakcji do ciała stałego próbek z testów biodegradacyjnych była następująca:

- przemycie złoża – użycie 5 mL rozpuszczalnika organicznego stosowanego później do desorpcji (metanol),

- kondycjonowanie – użycie 5 mL wody destylowanej,
- adsorpcja analitów – przepuszczenie przez kolumienkę ekstrakcyjną próbki,
- suszenie złoża – 20 minut pod niewielką próżnią,
- elucja zaadsorbowanych analitów – wymycie odpowiednią ilością rozpuszczalnika organicznego (5 mL - metanolu),

przygotowanie do oznaczeń techniką LC-MS/MS.

Próbki cieczy z osadem nie były filtrowane przed etapem ekstrakcji.

Wiarygodność tych wyników potwierdziło badanie widm FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), wykonane na wydziale Technilogii Chemicznej Politechniki Poznańskiej, które nie wskazały obecności diklofenaku na kłaczkach osadu czynnego.

5. Wyniki badań i ich omówienie

5.1. Określenie stężeń wybranych leków z grupy NLPZ

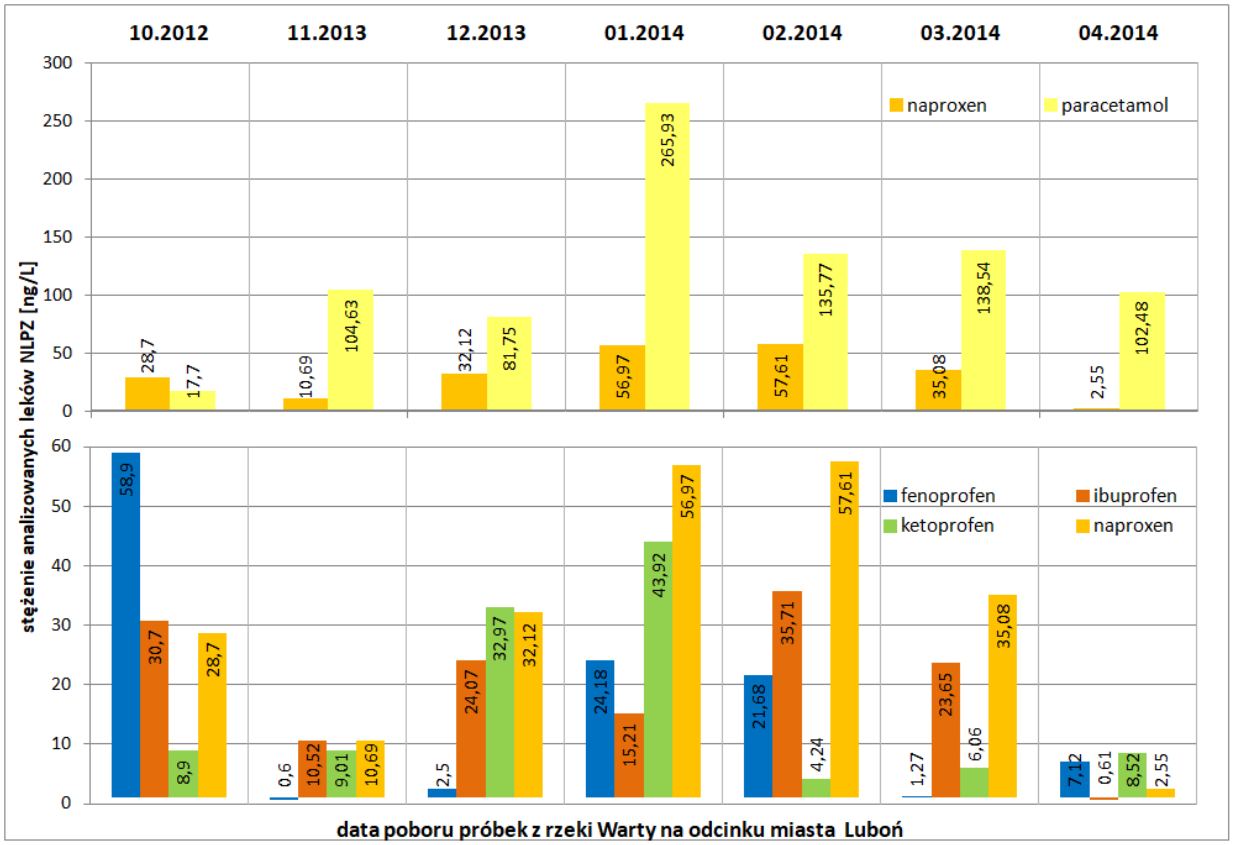
Temat obecności leków w środowisku, ich toksyczności oraz problemu ich usuwania w oczyszczalniach ścieków komunalnych został spopularyzowany w ostatnich 10 latach. Ze względu na fakt, że praca doktorka była realizowana w okresie 6 lat, sformułowanie tez oraz realizacja założonych zadań badawczych mających na celu ich udowodnienie odbywało się sukcesywnie wraz z rosnącą ilością publikacji naukowych w zakresie związków farmaceutycznych. Z tej przyczyny praca składa się z trzech etapów badawczych. W pierwszym etapie badań sprawdzono występowanie wybranych rodzajów leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, dopływających do lokalnej oczyszczalni ścieków z terenu miasta Poznania i okolic a także oznaczono stężenie wybranych substancji lekowych na odcinku rzeki Warty przepływającej przez miasto Poznań oraz Luboń. Uzyskane wyniki stężeń substancji farmaceutycznych porównano z doniesieniami literaturowymi. Analizie poddano sześć przedstawicieli leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych: fenoprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproksen, paracetamol oraz tolmentin. Wybór tych substancji czynnych był podyktowany faktem, że są one powszechnie stosowane w preparatach farmaceutycznych dostępnych bez recepty, a tym samym najczęściej kupowanymi i spożywanymi lekami przez konsumentów.

5.1.1. Obecność wybranych niesteroidowych leków przeciwbólowych w rzece Warcie w odcinku miasta Poznania i Lubonia w latach 2012 – 2014

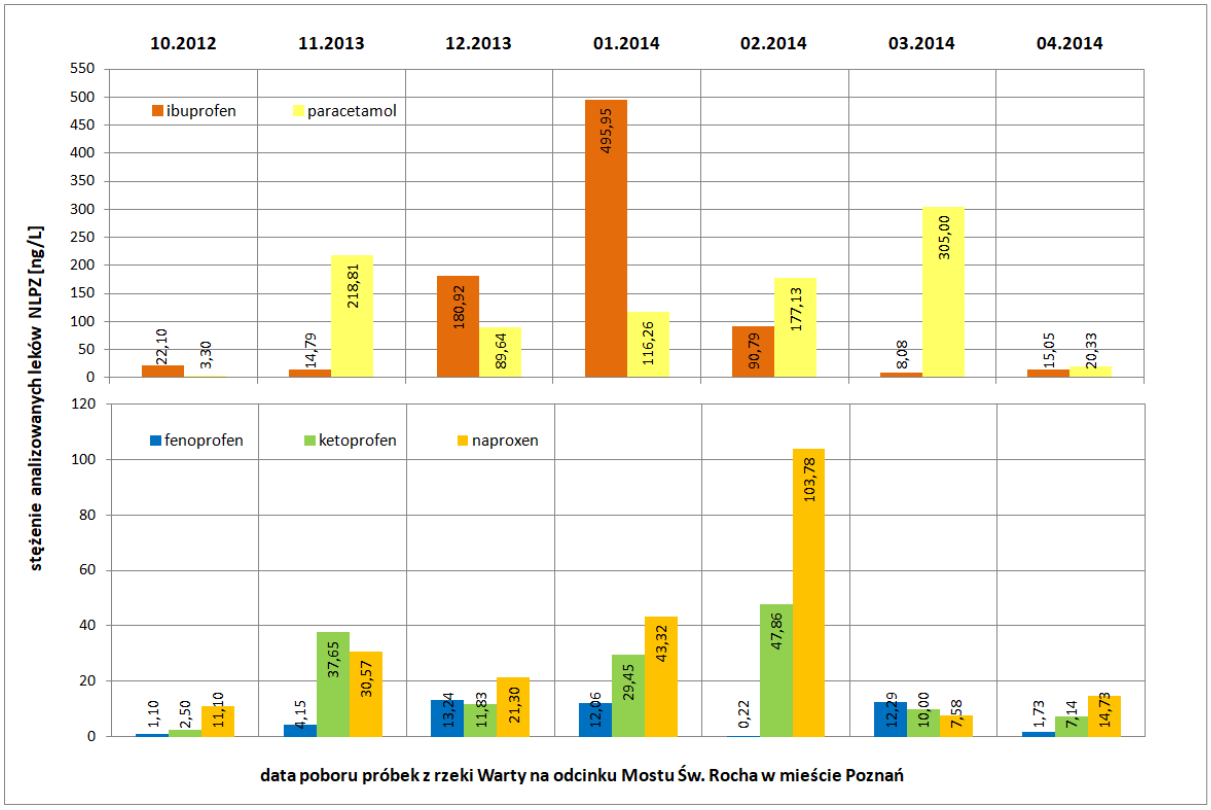
W tej części pracy przeanalizowano zawartości wybranych rodzajów leków z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych: fenoprofenu, ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu oraz paracetamolu a także podjęto próbę wyjaśnienia ich zmiennych rozkładów stężeń w wyznaczonych punktach pomiarowo-kontolnych w wybranych trzech punktach rzeki Warty, w obszarze miasta Poznania i Lubonia. Występowanie leków w rzece Warcie potwierdza, że problem obecności leków w środowisku wodnym jest spotykany w rzekach, jak i jeziorach znajdujących się na całym świecie, w tym również w Polsce. Mimo, że Poznań, zarówno pod względem liczby mieszkańców, jak i gęstości zaludnienia jest mniejszy niż wiele miast Ameryki Północnej, Australii czy Azji, stężenia analizowanych leków w rzece Warcie osiągają podobny rząd wielkości na poziomie ng/L oraz µg/L, jak w Kanadzie, Stanach Zjednoczonych, Indiach, Chinach czy Nowej Zelandii [Kim M. i in., 2014, Shala L. i in, 2010 Zhou H. i in., 2013, Murdoch K., 2015].

Za pierwszy punkt kontrolno-pomiarowy (usytuowany na 250 km biegu rzeki w kierunku ujścia do rzeki Odry ustalono miejsce przed ujęciem wody w Luboniu. Drugim, centralnym punktem został Most Św. Rocha znajdujący się na 243,5km biegu Warty. Ostatnim natomiast punktem jest odcinek za COŚ w Koziegłowach (234 km) W tym odcinku założono, że wystąpią najwyższe stężenia badanych leków z grupy NLPZ, najmniejsze natomiast w najdalej położonym od oczyszczalni ścieków punkcie, ustanowionym w okolicach miasta Luboń.

Jak przedstawiono na rysunku 18, w całym okresie analizy wybranych leków NLPZ na rzece Warcie, w odcinku miasta Luboń, w październiku 2012r. odnotowano tu najwyższe stężenie fenoprofenu. W pozostałych okresach poboru prób, najwyższe stężenia spośród analizowanych leków uzyskał paracetamol (średnia wartość 120,97 ng/L). Stężenia naproksenu, ibuprofenu oraz ketoptofenu wystąpiły na podobnym poziomie. W ocenie średniego stężenia we wszystkich okresach poboru próbek na tle pozostałych analizowanych leków, fenoprofen osiągał najniższe wartości. W tym odcinku poboru próbek, w 10.2012r. fenoprofen zaobserwowano najwyższe stężenie pod względem występowania pomiędzy trzema punktami poboru.

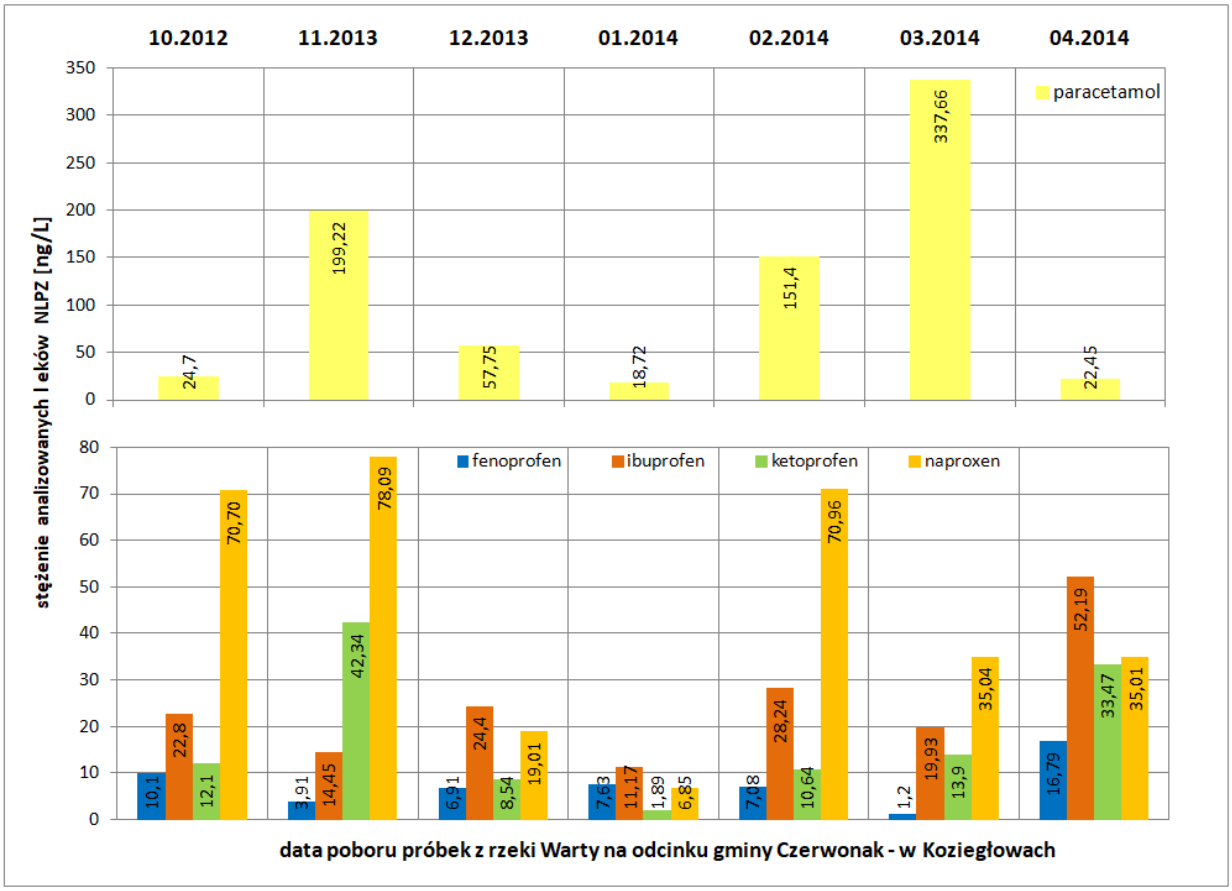


Rysunek 18. Stężenie stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w rzece Warcie na odcinku miasta Luboń



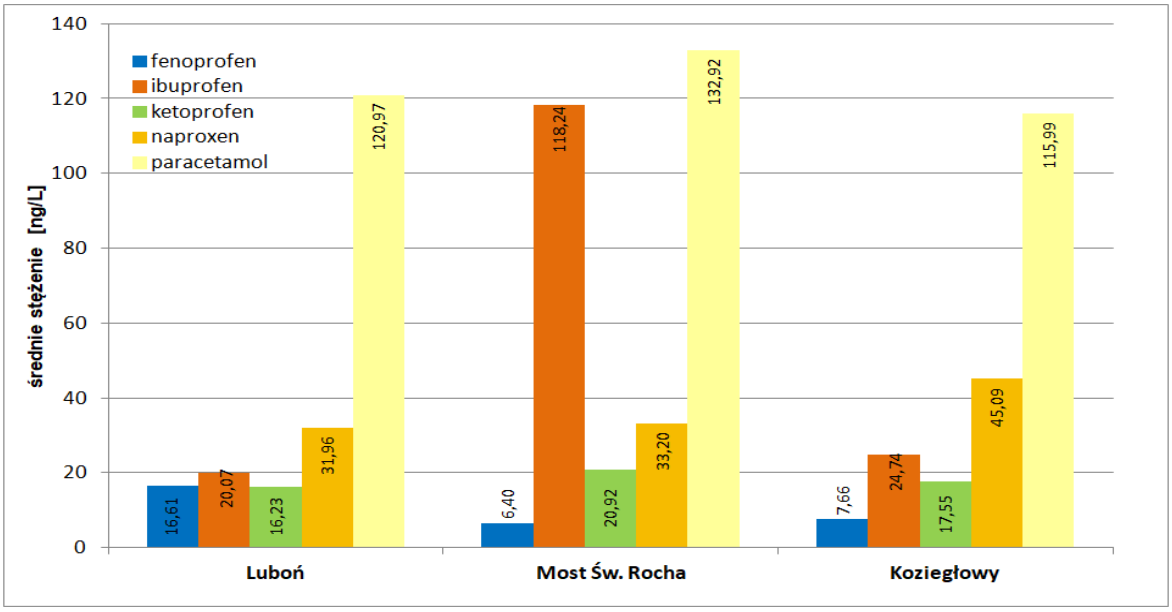
Rysunek 19. Stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w rzece Warcie na odcinku Mostu Św. Rocha w mieście Poznań

Rozpatrując wszystkie okresy poboru próbek z rzeki Warty, w odcinku Mostu Św. Rocha, będącego drugim punktem poboru prób, znajdującym się na 243,5 km wzdłuż kierunku biegu rzeki, można zauważyć, że najwyższe stężenia osiągnęły tu paracetamol i ibuprofen (rysunek 19). Z wyjątkiem fenoprofenu i naproksenu, średnie wartości stężenia analizowanych związków w tym punkcie, są wyższe niż w odcinku gminy Czerwonak. Średnie stężenie fenoprofenu w rzece Warcie na wysokości Mostu Św. Rocha jest najmniejsza w stosunku do pozostałych punktów poboru próbek wody (1,73 ng/L w 04.2014r). W styczniu 2014r. odnotowano tu najwyższe stężenie ibuprofenu wynoszące 495,95 ng/L. Wartość ta była jednocześnie najwyższym wynikiem spośród wszystkich analizowanych leków na przestrzeni całego okresu prowadzonych badań. Średnią zawartość stężenia w rzece Warcie na tym odcinku uzyskał paracetamol (najwyższą wartość 305 ng/L odnotowano w 03.2014r.) najwyższana (zgodnie z rysunkiem 24 wynosiła około 495,95 ng/L).



Rysunek 20. Stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w rzece Warcie na odcinku gminy Czerwonak w Koziegłowach

Analizując cały okres poboru próbek z rzeki Warty od 10.2012r. do 04.2014r. w odcinku gminy Czerwonak, za Centralną Oczyszczalnią Ścieków (rysunek 20), można zauważyć, że z wyjątkiem 04.2014r. najwyższe stężenia spośród analizowanych leków osiągnął paracetamol (najwyższa wartość została oznaczona w 03.2014r. i wynosiła ponad 337 ng/L). Drugą substancją czynną, pod względem zawartości w rzece Warcie był naproksen (maksymalna wartość, powyżej 78 ng/L wystąpiła w listopadzie 2013r.). Najniższe stężenia spośród analizowanych leków w tym odcinku pomiarowo-kontrolnym zajął ketoprofen (1,89 ng/L w 01.2014r.) oraz fenoprofen (1,2 ng/L w 03.2014r.).



Rysunek 21. Średnie stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w wybranych odcinkach rzeki Warty na terenie m. Poznania w okresie od 10.2012 do 04.2014

Paracetamol osiągał najwyższe stężenia we wszystkich okresach poboru próbek w stosunku do pozostałych analizowanych substancji aktywnych (rysunek 21). Jego średnia wartość osssiągnęła podobne wielkości we wszystkich analizowanych punktach poboru, z niewielką przewagą na odcinku Mostu Św. Rocha. Kolejnym związkiem, osiągającym wysokie stężenia w ekosystemie Warty był ibuprofen. W punktach pomiarowo-kontrolnych w Luboniu i Koziegłowach, stężenie leku było zbliżone. Największą wartość odnotowano na odcinku Mostu Św. Rocha. Naproksen w całym okresie pomiarowym osiągał najwyższe wartości na odpływie z COŚ w Koziegłowach. Średnie stężenie ketoprofen, w każdym analizowanym punkcie pomiarowo-kontrolnym osiągało podobne wartości. Najmniejszą wartość oznaczono dla fenoprofenu.

Szacując średnie wartości analizowanych leków z grupy NLPZ we wszystkich okresach poboru próbek w rzece Warcie, do najczęściej występujących leków, osiągających najwyższe stężenia należy paracetamol, ibuprofen oraz naproksen.

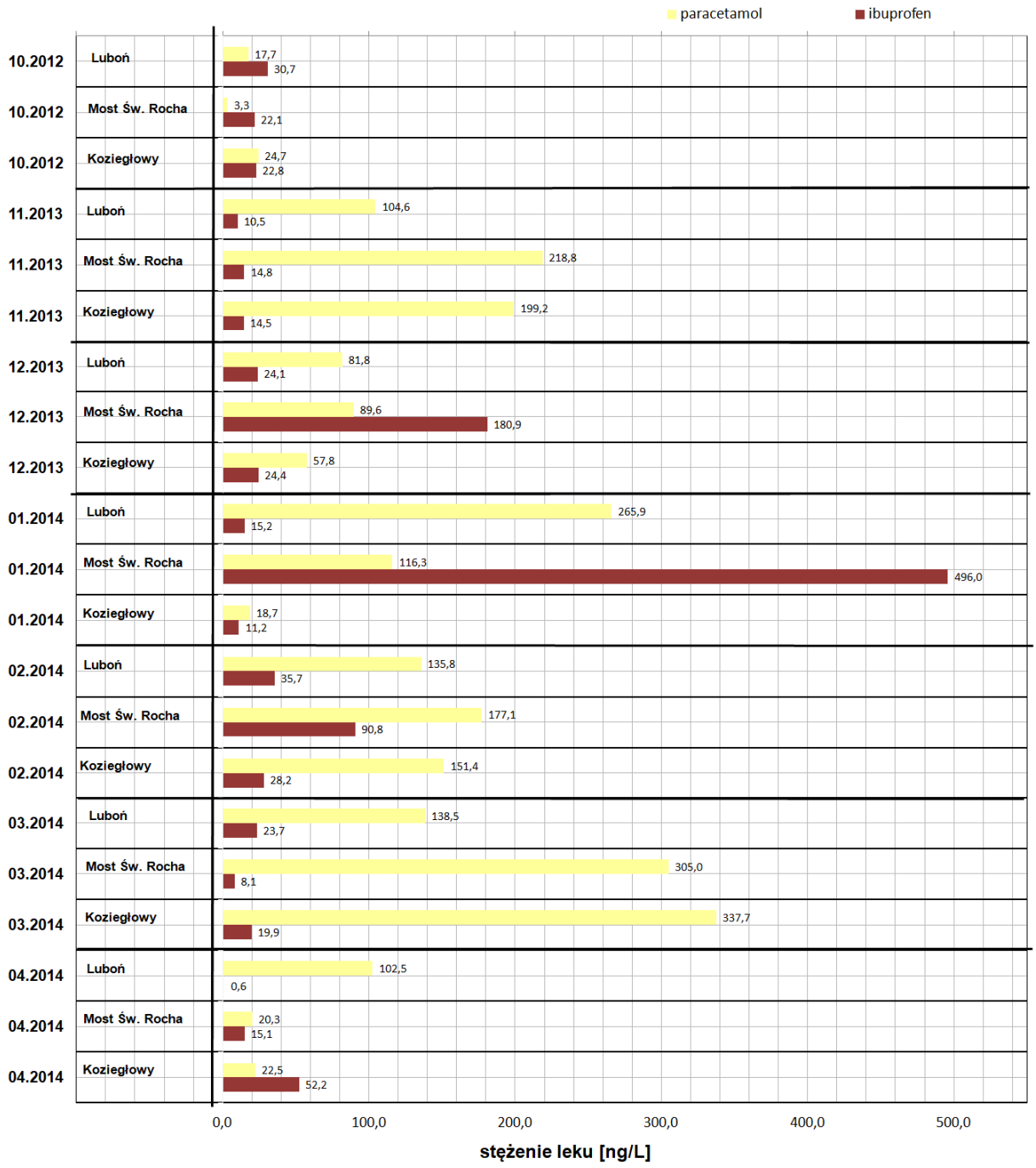
Podaczas całego okresu badań, spośród wszystkich analizowanych związków z grupy NLPZ odnotowano najniższe wartości fenoprofenu w rzece Warcie, w każdym z analizowanych punktów poboru. Najwyższe stężenie tego leku wystąpiło w październiku 2012r. w odcinku miasta Luboń (rysunki 22 i 23), najdalszym spośród badanych punktem mierzonym wzdłuż biegu rzeki (ok 250 km biegu rzeki, 16 km dalej w stosunku do gminy Czerwonak i ok. 6,5 km od Mostu Św. Rocha). Średnia wartość stężenia tego leku, we wszystkich analizowanych okresach wynosi ok. 10 ng/L (rysunek 21).

Średnie stężenie ibuprofenu, we wszystkich odcinkach pomiarowych wynosi 54,35 ng/L. Największa wartość leku została zarejestrowana w styczniu 2014r. w punkcie poboru próbek na odcinku Mostu Św. Rocha. W grudniu 2013r. wystąpiła tu druga najwyższa wartość tego leku oznaczoonego w analizowanym okresie czasu (180,90 ng/L). Najniższe natomiast stężenie o wartości 0,61 ng/L zaobserwowano w kwietniu 2014r., w odcinku miasta Luboń. W pozostałych punktach poboru próbek, niezależnie od punktu pomiarowego stężenie wahało się w przedziale od 10 do 30 ng/L.

We wszystkich punktach pomiarowo-kontrolnych, średnie stężenie ketoprofenu wynosio ponad 18 ng/L. Najwyższe wartości stężeń leku wystąpiły w listopadzie 2013r. w Koziegłowach, styczniu 2014r. na odcinku Mostu Św. Rocha, oraz w lutym 2014r. w okolicach Mosty Św. Rocha. W pozostałych przypadkach stężenie leku w rzece wahało się między 1,85 a 37,65 ng/L.

Naproksen zajął trzecią pozycję pod względem stężenia w rzece Warcie w analizowanym przedziale czasu poboru próbek. Najwyższa koncentracja leku wystąpiła w lutym 2014r. na wysokości Mostu Św. Rocha 103,8 ng/L). W grudniu 2012r., listopadzie 2013r. oraz lutym 2014r. na odcinku gminy Czerwonak naproksen trzykrotnie przekroczył stężenie 70 ng/L. Najmniejsze stężenie o wartości 2,55 ng/L w odcinku miasta Luboń, wykryto w kwietniu 2014r.

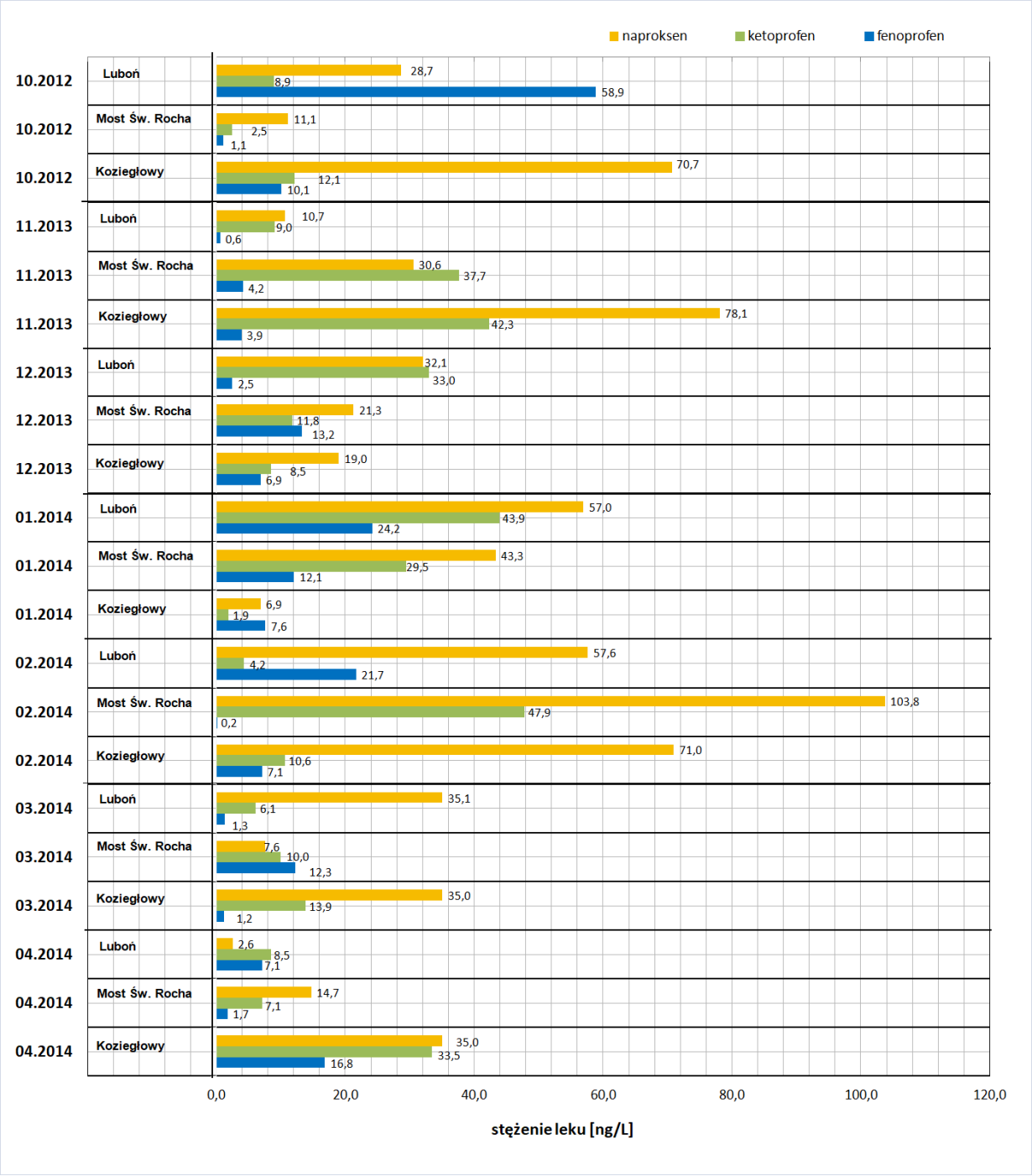
Paracetamol uzyskał najwyższe spośród analizowanych leków z grupy NLPZ wyniki stężeń w rzece Warcie, w każdym z analizowanych okresów pomiarowych. Średnia wartość tego leku występująca w rzece wynosi 123,29 ng/L. Najwyższą wartość odnotowano w marcu 2014r. w odcinku gminy Czerwonak (337,66 ng/L) i Mostu Św. Rocha (305,00 ng/L), najmniejszą natomiast w odcinku Mostu Św. Rocha w październiku 2012r. (3,30 ng/L). Pozostałe wartości stężenia wahały się na poziomie 17,7 – 265,93 ng/L.



Rysunek 22. Stężenia analizowanych leków z grupy NLPZ w wybranych odcinkach rzeki Warty na terenie m. Poznania w okresie od 10.2012 do 04.2014

Na rysunkach 22 i 23 przedstawiono stężenia wszystkich badanych leków z grupy NLPZ. W wyznaczonym czasie prowadzenia eksperymentu , od października 2012 do kwietnia 2014r. Analizując uzyskane wyniki, można zauważyć, że stężenia wybranych leków nie zawsze maleją, jak się spodziewano wraz z kierunkiem biegu rzeki Warty. W okresie grudnia 2013r., na odcinku m. Luboń zaobserwowano najwyższe wśród badanych punktów stężenia ibuprofenu, naproksenu oraz ketoprofenu. Podobna tendencja zachwała się w styczniu 2014r.

dla paracetamolu, naproksenu, ketoprofenu fenoprofenu. W kwietniu 2014r. zaobserwowano najwyższe wartości stężeń paracetamolu na odcinku w Luboniu. W marcu 2013r. odnotowano



Rysunek 23. Stężenia analizowanych leków z grupy NLPZ w wybranych odcinkach rzeki Warty na terenie m. Poznania w okresie od 10.2012 do 04.2014

zbliżoną wartość naproksenu na pierwszym i trzecim odcinku poboru prób, z widocznym spadkiem stężenia w punkcie centralnym. Spośród 3 analizowanych punktów poboru, na odcinku Mostu Św. Rocha, oznaczono także najwyższe wartości naproksenu w lutym 2014r. oraz ibuprofenu w grudniu 2013r., styczniu i lutym 2014r. W górnym odcinku biegu rzeki,

przed COŚ w Koziegłowach zaobserwowano większe stężenia leków niż w miejscu odprowadzenia ścieków do odbiornika (rysunki 22 i 23). Stąd, przypuszcza się, wyższe wartości leków w odcinkach Lubonia i Mostu Św. Rocha mogą pochodzić z nielegalnych zrzutów ścieków a także w wyniku dopływu ścieków przez przelewy burzowe. Przypuszcza się, że badane substancje farmaceutyczne, ze względu na niski współczynnik sorpcji [Selgado R. i in., 2011, Martín J. i in., 2012, Kim M. i in., 2014] mogą w sposób nietrwały adsorbować się na osadach dennych, z których są wymywane np. w wyniku turbulencji czy wzrostu prędkości przepływu. Rzeka Warta to prawy największy dopływ Odry. Jej źródło (odcinek górny) rozpoczyna się w Kromłowie, dzielnicy Zawiercia zlokalizowanego na Wyżynie Krakowsko-Częstochowskiej. Środkowy bieg rzeki stanowi odcinek od Poznańskiego Przełomu Warty do Pradoliny Toruńsko-Eberswaldzkiej. Dolny bieg natomiast występuje od okolic Santku do Parku Narodowego Ujście Warty w Kostrzynie nad Odrą. Całkowita długość rzeki liczy 808 km długości [http://www.rzekipolski.info/warta.html, odczyt 08.2017]. Na odcinku biegnącym od źródła rzeki Warty do Poznania znajdują się koncerny farmaceutyczne. Do największych z nich należą: Novichem, zlokalizowany w Częstochowie, Aflofarm oraz Polfa mieszczące się w Pabianicach czy SENSILAB Polska Sp z o.o. – S.K.A. w Łodzi. Na terenie miasta Poznania, największe koncerny farmaceutyczne stanowią: GlaxoSmithKline, Biofarm, Farmapol [https://www.gif.gov.pl/bip/rejestry/106,Rejestry.html, odczyt 08.2017] Oprócz zakładów i hurtowni farmaceutycznych na terenie Częstochowy, Łodzi, Kalisza i Poznania znajdują się duże ośrodki medyczne, m.in. szpitale wojewódzkie, szpitale kliniczne uniwersytetu medycznego, szpitale kliniczne, onkologiczne, chorób serca, ortopedii chirurgii urazowej [http://rynekmedyczny.polki.pl, odczyt 08.2017]. Argumentem potwierdzającym obecność związków farmaceutycznych w odcinku miasta Poznania może być odprowadzenie ścieków z nieformalnych źródeł znajdujących się powyżej analizowanego odcinka rzeki Warty, które z nurtem rzeki transportowane są w kierunku ujścia.

Kolejną przyczyną wzrostu stężeń analizowanych substancji farmaceutycznych mogą być trudne do zlokalizowania, nieformalne źródła zanieczyszczeń, nielegalne zrzuty a także dopływ ścieków przez przelewy burzowe, odgrywające istotną rolę w kształtowaniu zależności między wartościami stężeń farmaceutyków w poszczególnych punktach poboru prób w wybranych okresach prowadzonych badań. Ponadto wzrost stężenia farmaceutyków może być spowodowany zbyt dużą ilością dostarczanych związków organicznych, przyczyniających się do zwiększenia deficytu tlenowego.

Zmienne wartości stężeń analizowanych leków z grupy NLPZ w poszczególnych odcinkach pomiarowo-kontrolnych, wykazału, że związki farmaceutyczne są podatne

na degradację. Istotnym elementem określającym mechanizm rozkładu leków są właściwości sorpcyjne oraz podatność na biodegradację, o której przebiegu decydują masa cząsteczkowa, wartości hydrofilowe/hydrofobowe, struktura związku powierzchnia związku, typ wiązań. Przebieg procesów degradacji jest zależny od wielu parametrów m.in. temperatury, pH wody, zawartości tlenu rozpuszczonego w wodzie, natężenie promieniowania słonecznego, czy prędkość przepływu rzeki jak również budowa i właściwości danego rodzaju leku a także dodatkowe źródła zanieczyszczeń. [Guzik U. i in. 2013, Karpińska J. i in., 2013].

Jednym z głównych mechanizmów przyczyniających się do redukcji związków farmaceutycznych w środowisku jest proces rozkładu biologicznego. Ze względu jednak na niekompletną ilość danych na temat mikroorganizmów przyczyniających się do mineralizacji określonych grup leków, nie można jednoznacznie stwierdzić, które z nich i w jakim stopniu wpływały na zmienne wartości stężeń analizowanych substancji farmaceutycznych.

Ważną rolę w rozkładzie danego rodzaju leku mają właściwości hydrofilowe analizowanej substancji. Można je oszacować na podstawie stałej dysocjacji pK_a. Parametr ten jest definiowany jako ujemny logarytm stałej dysocjacji K_a. Wielkość ta pozwla oszacować pH, które zapewnia maksymalną rozpuszczalność leku w wodzie o której decyduje forma zjonizowana forma leku [Wandzik I., 2013]. Paracetamol, wraz ze wzrostem pH zwiększa swoje zdolności do łączenia z wodą. Przy naturalnym odczynie pH rzeki Warty na poziomie 8-9 [WIOŚ, 2011], stała dysocjacji paracetamolu pK_a wynosi 9,46 [https://chemicalize.com, odczyt 09.2017], co wskazuje niskie zdolności dysocjacji (zdolności hydrofilowe paracetamol osiąga przy pH>12,0) oraz niski stopień adsorpcji na materiale osadu. Badania przeprowadzone przez Lin A.Y. i in., 2010 wskazują, że w warunkach laboratoryjnych czas połowicznego rozpadu paracetamolu poddanego procesom biologicznego rozkładu i sorpcji wynosi około 2 dób. W wyniku procesu sorpcji redukcja paracetamolu w wodzie wynosiła 30% wartości wyjściowej po 15 dniach [Lin A.Y, 2010]. Ibuprofen, przy wartości odczynu pH>8,0 występuje w wodzie w postaci zdysocjowanej, która umożliwia mikroorganizmom jego rozkład biologiczny. Przy wartości pH poniżej 8 ibuprofen obniża swoje zdolności hydrofilowe, łatwo ulegając sorpcji na powierzchni materiału dennego rzeki. W wyniku jednak wzrostu prędkości przepływu rzeki istnieje niebezpieczeństwo wymycia leku z powierzchni dna do cieczy. Ze względu na fakt, że odczyn pH rzeki Warty stanowi wartość graniczną dla właściwości hydrofilowych ibuprofenu, stąd trudno jednoznacznie określić jego zachowanie w środowisku wodnym. Przypuszczalnie dominującymi procesami odpowiedzialnymi za rozkład ibuprofenu są sorpcja oraz rozkład biologiczny. Spośród wszystkich analizowanych substancji lekowych,

naproksen charakteryzuje się najlepszymi właściwościami hydrofilowymi, co sugeruje wysoki stopień podatności na biodegradację. Fenoprofen i ketoprofen, których stałe dysocjacji wynoszą odpowiednio 3,96 oraz 3,88, posiadają zbliżone zdolności sorpcyjne. Analizując wyniki badań, można zauważyć wyższą skuteczność usuwania fenoprofenu. Niska podatność naproksenu na procesy biodegradacji może być wynikiem zróżnicowanej struktury między obiema substancjami [Almeida B. i in., 2013]. Prowadzi to do wniosku, że środowisko o charakterze kwasowym zwiększa podatność oznaczonych leków na procesy sorpcji, co obniża skuteczność rozkładu mikrobiologicznego. Procesy adsorpcji, powodujące zatrzymywanie leków na powierzchni materiału dennego zmniejsza wartość stężenia analizowanych substancji w wodzie. Jest to jednak proces nietrwały, który w wyniku zwiększenia prędkości przepływu może doprowadzić do ponownego uwalniania się farmaceutyku do fazy cieczy.

Do przeprowadzenia efektywnego procesu biodegradacji istotną rolę spełnia tlen rozpuszczony w wodzie. Wraz ze spadkiem temperatury, rośnie ilość tlenu niezbędna mikroorganizmom, zwłaszcza bakteriom tlenowym do przeprowadzenia procesów rozkładu związków organicznych (w tym także analizowanych substancji farmaceutycznych). Wyniki raportów WIOŚ wskazują, że najniższa temperatura wody w rzece Warcie nie jest równoznaczna z uzyskaniem najwyższego stężenia tlenu rozpuszczonego. W grudniu, do powierzchni ziemi dociera mniej promieniowania słonecznego, co osłabia proces fotosyntezy, prowadzony przez organizmy autotroficzne i tym samym ogranicza ilość produkowanego tlenu.

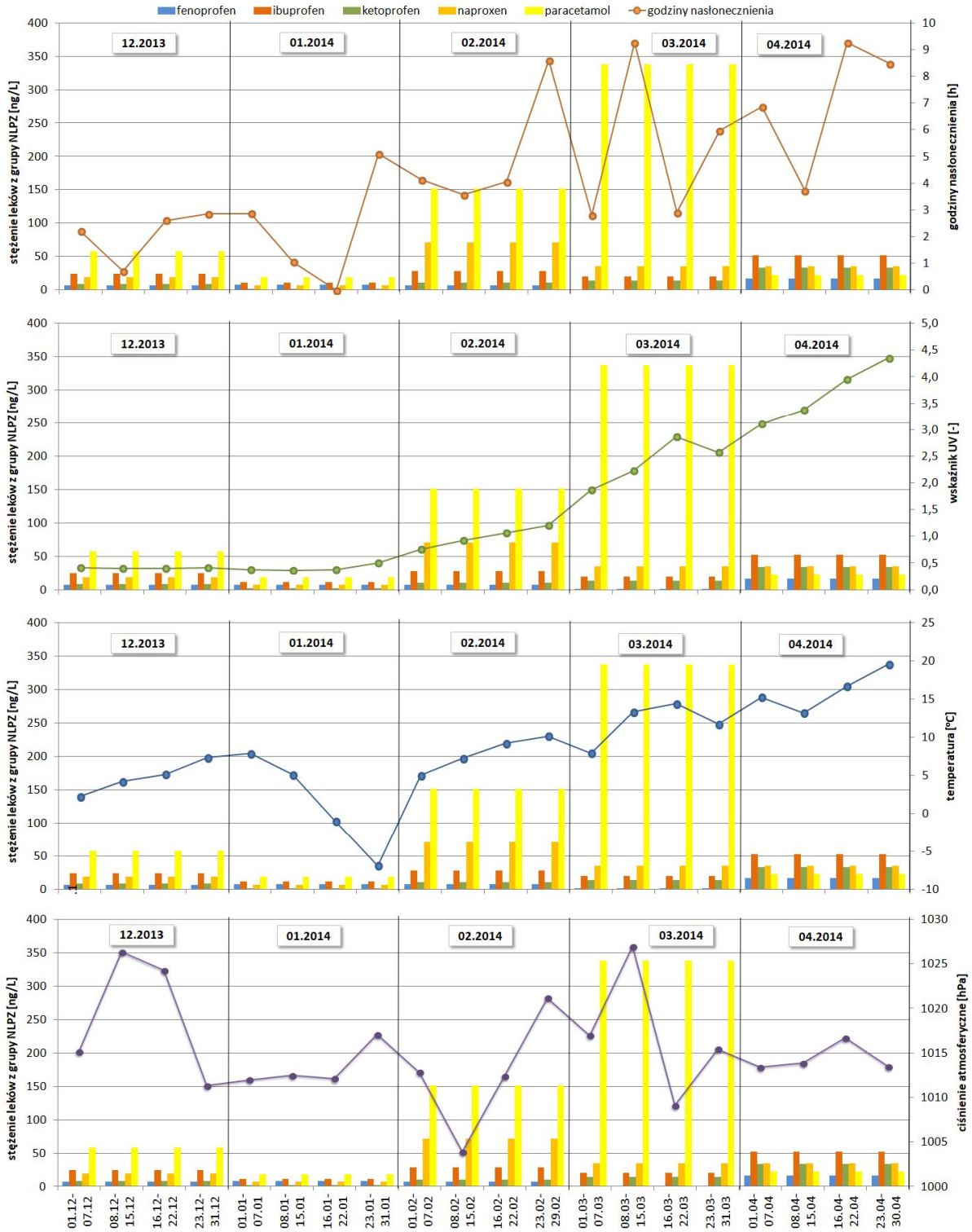
Temperatura otoczenia jest również kluczowa w procesach biodegradacji, i znacząco wpływa na usuwanie ibuprofenu [Żabczyński i in., 2009] jak i pozostałych analizowanych związków lekowych. Podobnie, jak proces sorpcji, kinetyka rozkładu biologicznego zależy od szeregu czynników, m.in. od tempa wzrostu biomasy czy stężenia początkowego leku, stąd trudno jednoznacznie stwierdzić udział wymienionych mechanizmów w usuwaniu badanych związków lekowych. Literatura [, Langenhoff A. i in., 2013, Kruglova A. i in., 2014,2016] wskazuje, że wzrost temperatury stymuluje proces rozkładu biologicznego wielu substancji farmaceutycznych, w tym również z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Rosnąca temperatura powoduje spadek ilości tlenu rozpuszczonego w wodzie, co może spowolnić lub zahamować procesy biodegradacji.

Na podstawie opracowania własnego wykonano analizę zależności stężenia leków w rzece Warcie oraz zmiany ich rozkładu, w zależności od wskaźnika UV, nasłonecznienia, temperatury, ciśnienia atmosferycznego (rysunek 24).

Przypuszczalnie najbardziej podatny na rozkład pod wpływem światła jest fenoprofen, co mogą potwierdzać bardzo małe wartości stężenia tego leku w listopadzie i grudniu 2013r w wyniki stężenia tego leku w grudniu 2013r. w okolicach Mostu Św. Rocha sugerują wolniejszy przebieg rozkładu biologicznego. Ponadto, spadek temperatury wpływa na mniejszą aktywność i rozwój mikroorganizmów. Ibuprofen wykazuje małą podatność na fotodegradację. Duża podatność wybranych farmaceutyków na rozkład pod wpływem promieniowania słonecznego prowadzi do redukcji ich zawartości w wodzie, stąd trudno jednoznacznie ocenić efektywność procesu biodegradacji. Uwzględnienie jednak parametru natężenia światła słonecznego jako dodatkowego czynnika odpowiadającego za redukcję zanieczyszczeń, był pomocny w uzasadnieniu zmieniających się w kolejnych okresach poboru prób wartości stężeń, a także uzyskanie pełniejszego obrazu wpływu czynników ograniczających i przyczyniających się usuwania farmaceutyków.

W celu oszacowania wartości pH wody w rzece Warcie, stężenia tlenu czy temperatury otoczenia, skorzystano z ogólnych danych Wojewódzkiego Inspektora Ochrony Środowiska w Poznaniu dla punktu pomiarowo-kontrolnego w okolicach Mostu Św. Rocha oraz wartości natężenia promieniowania opracowanych przez Ministerstwo Infrastruktury i Rozwoju. Wartości te jednak mogą odbiegać od rzeczywistych, które wystąpiły w poszczególnych punktach pomiarowych w określonych okresach badawczych.

W ogólnej analizie czynników wpływających na rozkład biologiczny pominięto oddziaływanie ciśnienia atmosferycznego oraz wpływu opadów atmosferycznych, ze względu na trudności w precyzyjnym określeniu wartości tych parametrów. Nie uwzględniono także obecnych w rzece Warcie innych makro i mikroelementów wpływających na rozwój i aktywność mikroorganizmów decydujących o przebiegu procesu biodegradacji. Ze względu na szereg zależności i czynników wpływających na przebieg usuwania zanieczyszczeń w środowisku wodnym, przeprowadzona analiza stopnia degradacji aktywnych form wybranych leków z grupy NLPZ w funkcji czasu jest jednym z możliwych scenariuszy obrazujących zachowanie farmaceutyków w rzece Warcie.



Rysunek 24. Zależność godzin nasłonecznienia (a), wskaźnika UV (b), temperatury (c) oraz ciśnienia atmosferycznego (d) od stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w analizowanych okresach poboru próbek w rzece Warcie na wysokości odpływu ścieków oczyszczonych z COŚ w Koziegłowach

5.1.2. Przebieg degradacji wybranych leków przeciwbólowych w Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach

Pierwszy etap badań w zakresie analizy poziomu stężeń wybranych rodzajów leków z grupy NLPZ rozpoczęto od Centralnej Oczyszczalni Ścieków (COŚ) zlokalizowanej w północno-wschodniej części powiatu poznańskiego, w miejscowości Koziegłowy, w gminie Czerwonak. Oczyszczalnia składa się z części mechanicznej (kraty, piaskowniki, osadniki wstępne), biologicznej z podwyższonym usuwaniem związków biogennych w procesie osadu czynnego oraz osadowej, z pełną przeróbką wytwarzanych osadów ściekowych. Oczyszczalnia jest głównym odbiorcą ścieków komunalnych i bytowo-gospodarczych z m. Poznania i okolicznych gmin takich jak Swarzędz, Luboń, Tarnowo Podgórne, Suchy Las oraz południowa część Gminy Czerwonak. Dobowy przepływ ścieków wynosi ok. 200 tys. m^3. Odbiornikiem ścieków oczyszczonych jest rzeka Warta.

Próbki do analiz były pobierane z czterech wybranych punktów ciągu technologicznego Centralnej Oczyszczalni Ścieków tj.: 1) przepompowni ścieków surowych, 2) komory denitryfikacji, 3) komory nitryfikacji, 4) odbiornika ścieków oczyszczonych (tuż po zrzucie ścieków oczyszczonych do rzeki Warty).

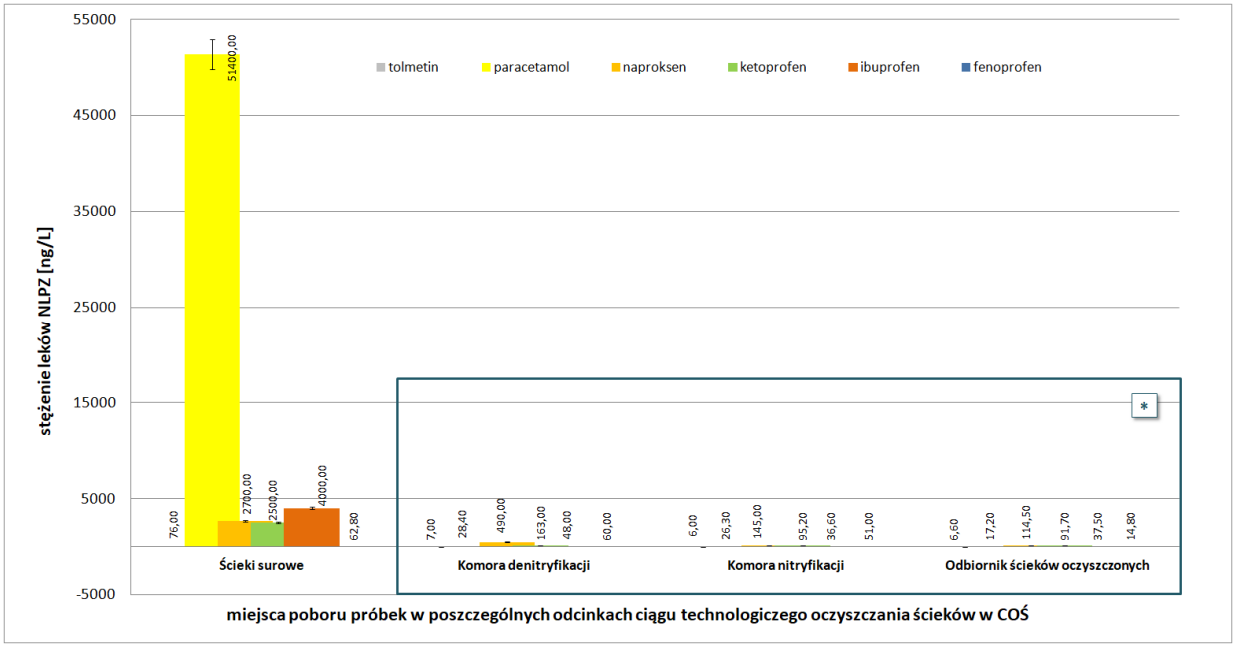
Uzyskane wyniki wskazują, że wszystkie analizowane rodzaje leków z grupy NLPZ dopływają wraz ze ściekami komunalnymi do COŚ w Koziegłowach, co zaprezentowano na rysunku 25. Wskazują również na brak całkowitego rozkładu związków farmaceutycznych za pomocą tradycyjnych metod z wykorzystaniem osadu czynnego, przeznaczonych do oczyszczania głównie ścieków komunalnych.

Najwyższe stężenie na dopływie do oczyszczalni osiągnął paracetamol (51400 ng/L), natomiast na odpływie z oczyszczalni zanotowano wartość 17,20 ng/L. paracetamol (rysunki 25 i 26). Najwyższe stężenie tego leku może wynikać m.in. z faktu, że substancja czynna paracetamolu- acetaminofen, jest jedną z najczęściej dodawanych do szerokiej gamy preparatów przeciwbólowych i przeciwgorączkowych dostępnych bez recepty. Drugim farmaceutykiem osiagającym na wejściu do oczyszczalni stężenie prawie trzynastokrotnie niższe od paracetamolu był ibuprofen (4000 ng/L). Na odływie z oczyszczalni osiągnął on wartość 37,50 ng/L. Naproksen i ketoprofen na wlocie do oczyszczalni osiągnęły stężenia 2700 ng/L oraz 2500 ng/L, na wylocie zaś 114,50 oraz 91,70 ng/L. Wysoka wartość tych farmaceutyków może być związana z faktem, że substancje czynne tych związków są zawarte w licznych produktach farmaceutycznych dostępnych bez recepty, przez co sprzedaż i dostępność do tych produktów jest bardzo wysoka [http://www.poradnikzdrowie.pl, odczyt 08.2017]. Paracetamol, ibuprofen oraz naproksen, w rankingach z 2013 r. zostały wymienione,

jako najczęściej stosowane substancje aktywne w preparatach dostępnych bez recepty [http://mowimyjak.se.pl, 04.2017]. Najmniejsze stężenia odnotowane na odcinku przepompowni ścieków w Koziegłowach osiągnęły tolmetin 76 ng/L oraz fenoprofen 62,80 ng/L, natomiast na odpływie 6,60 oraz 14,80 ng/L. Wzdłuż kolejnych odcinków ciągu technologicznego oczyszczalni ścieków widać spadek stężeń poszczególnych leków zidentyfikowanych na wlocie do oczyszczalni. Mimo to, każdy z tych leków został oznaczony również w ściekach oczyszczonych, odprowadzanych do odbiornika - rzeki Warty.

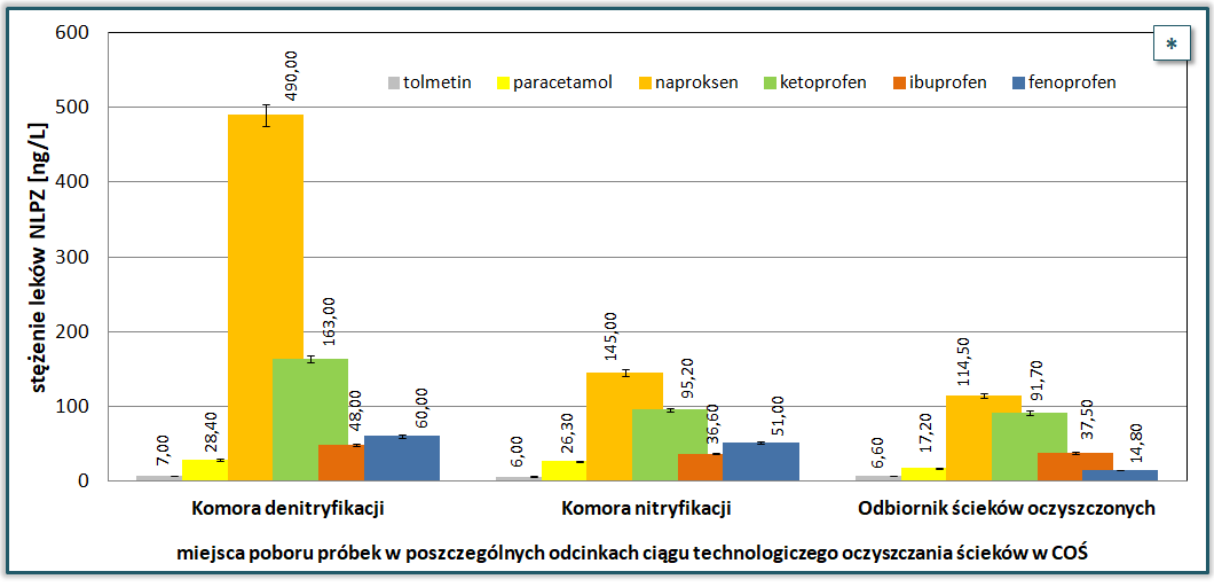
Na rysunkach 25i 26 przedstawiono stężenia analizowanych na wlocie do oczyszczalni leków z grupy NLPZ w odcinku biologicznej cześci oczyszczalni ścieków, w komorze denitryfikacji, nitryfikacji oraz na wylocie z oczyszczalni ścieków do odbiornika. Zaobserwowano odwrotną proporcję pomiędzy wielkością stężeń poszczególnych związków farmaceutycznych na dopływie do oczyszczalni a wartościami zanotowanymi w komorze denitryfikacji i nitryfikacji. Przykładem są paracetamol i ibuprofen, które w odcinku przepompowni ścieków osiągnęły najwyższe stężenia spośród wszystkich analizowanych związków, podczas gdy, w bioreaktorze najwyższe watości osiągnęły naproksen, ketoprofen oraz fenoprofen. Zmiana w obrębie uzyskanych wyników może być spowodowana zróżnicowaniem w obrębie właściwości fizykochemicznych każdego z analizowanych związków oraz różnym składem ścieków w poszczególnych odcinkach oczyszczalni ścieków, które mają wpływ przebieg procesu sorpcji.

Oprócz oznaczenia stężenia wybranych rodzajów leków z grupy NLPZ zawartych w ściekach dopływających do oczyszczalni, oceniono, jaki stopień redukcji osiągają one w wytypowanych odcinkach ciągu technologicznego w COŚ w Koziegłowach (rysunki 27 i 28). Głównymi mechanizmami odpowiadającymi za usuwanie substancji farmaceutycznych w ściekach są biodegradacja oraz sorpcja na kłaczkach. Najwyższy stopień redukcji na odcinku od przepompowni ścieków surowych do odcinka zrzutu ścieków oczyszczonych osiągnął paracetamol (99,97%). Wysoką skuteczność usuwania tego związku potwierdzili również Kasprzyk-Hordern B. i in., (2009), Verlicchi P. i in., (2013) oraz Al Qarni H. i in. (2016). Skuteczność usuwania powyżej 90% zaobserwowano także dla ibuprofenu (99,06%), ketoprofenu (96,33%), naproksenu (95,76%) oraz tolmetinu (91,31%). Wszystkie te substancje posiadają niski współczynnik mocy kwasu pKa (odpowiednio 4,85, 3,88, 4,19 oraz 3,93 [https://chemicalize.com/, odczyt 09.2017]), co może sugerować, że znajdują się głównie w fazie wodnej. Stąd przypuszczalnie ich redukcja nastąpiła w większym stopniu na drodze biodegradacji niż sorpcji [Nakada N. i in., 2006, Jones O.A. H. i in., 2007, Martín J. i in., 2012]. Mimo, że współczynnik pKa fenoprofenu wynosi 3,96 skuteczność usuwania tego leku



Rysunek 25. Stężenie wybranych leków z grupy NLPZ w różnych miejscach ciągu technologicznego COŚ w Koziegłowach k. Poznania

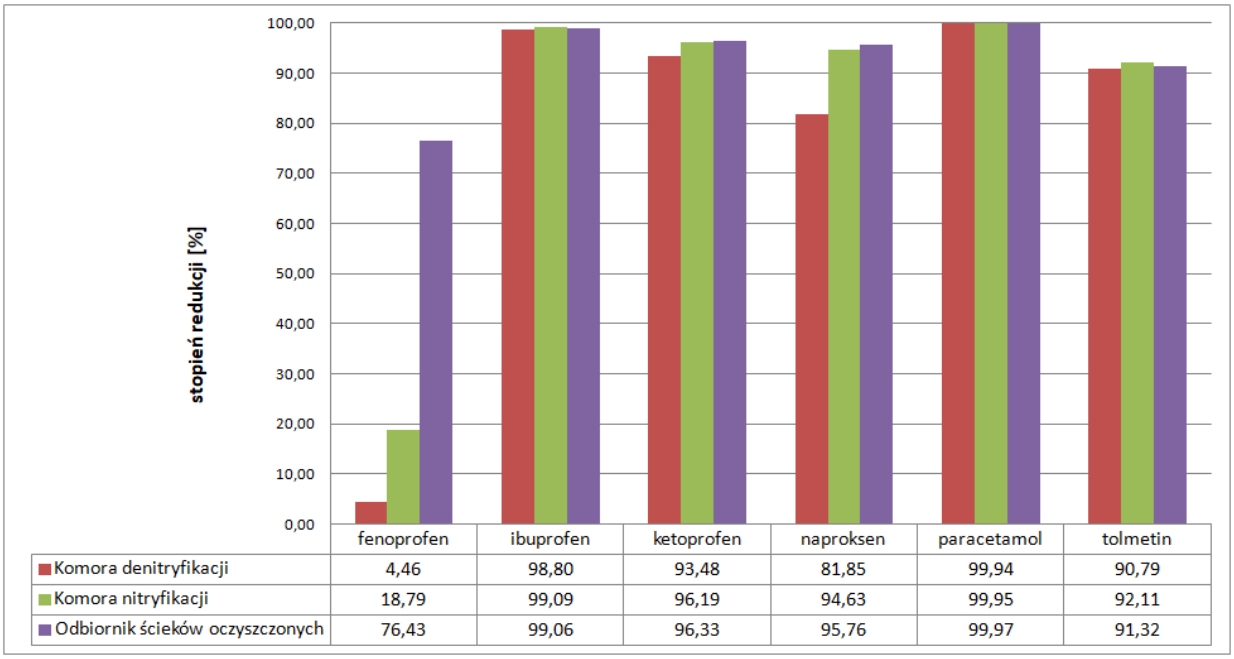
* wartości stężenia leków w dalszych punktach ciągu technologicznego szczegółowo przedstawiono na rysunku 26



Rysunek 26. Stężenie wybranych leków z grupy NLPZ w dalszych punktach ciągu technologicznego COŚ w Koziegłowach k. Poznania

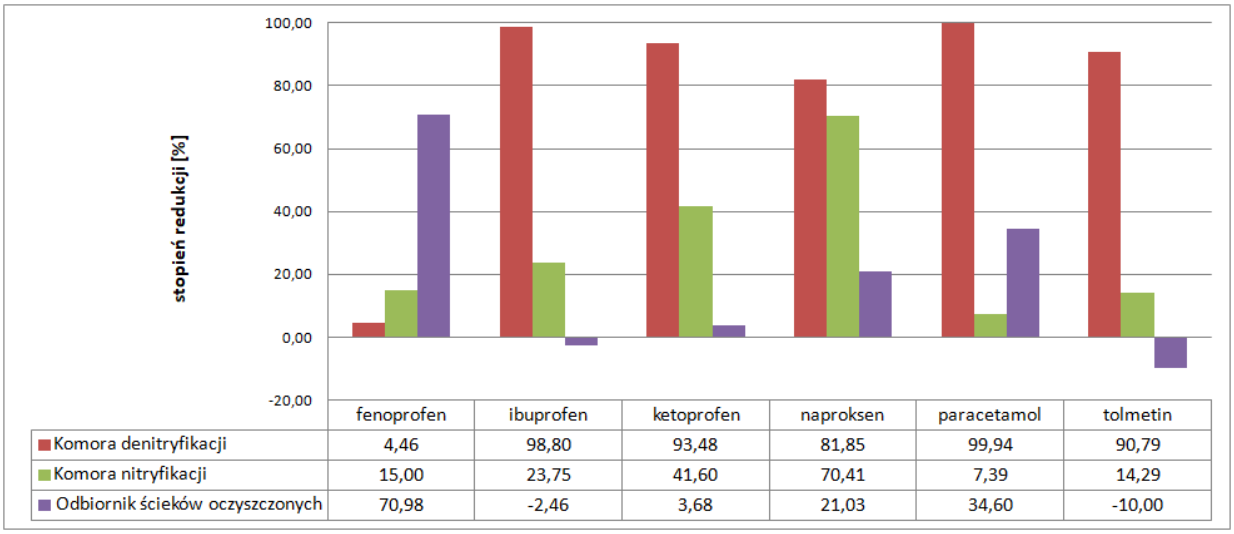
osiągnęła wartość 76,43%. Redukcja tego związku, w przeciwieństwie do pozostałych badanych leków NLPZ w ponad 70% została usunięta na odcinku między komorą nitryfikacji a przewodem odprowadzającym ścieki oczyszczone do rzeki Warty (rysunek 27). Może to sugerować usuwanie tego związku na drodze sorpcji na kłaczkach osadu czynnego. Stężenie tolmetinu, podobnie jak w przypadku ibuprofenu wzrosło w stosunku do wartości odnotowanej

w komorze nitryfikacji, w związku z czym może być on uwalniany przez kłaczki osadu czynnego w osadniku wtórnym.



	fenoprofen	ibuprofen	ketoprofen	naproksen	paracetamol	tolmetin
Komora denitryfikacji	4,46	98,80	93,48	81,85	99,94	90,79
Komora nitryfikacji	18,79	99,09	96,19	94,63	99,95	92,11
Odbiornik ścieków oczyszczonych	76,43	99,06	96,33	95,76	99,97	91,32

Rysunek 27. Stopień redukcji wybranych leków z grupy NLPZ w poszczególnych odcinkach ciągu technologicznego COŚ w Koziegłowach względem ich zawartości w ściekach surowych



	fenoprofen	ibuprofen	ketoprofen	naproksen	paracetamol	tolmetin
Komora denitryfikacji	4,46	98,80	93,48	81,85	99,94	90,79
Komora nitryfikacji	15,00	23,75	41,60	70,41	7,39	14,29
Odbiornik ścieków oczyszczonych	70,98	-2,46	3,68	21,03	34,60	-10,00

Rysunek 28. Stopień redukcji analizowanych leków z grupy NLPZ w poszczególnych odcinkach ciągu technologicznego COŚ

Największy stopień redukcji analizowanych leków: ibuporofenu, ketoprofenu, naproxenu, paracetamolu oraz tolmentinu zaobserwowano między przepompownią ścieków a komorą denitryfikacji. Fenoprofen natomiast uzyskuje największy stopień redukcji w odcinku za osadnikiem wtórnym. Prowadzi to do wniosku, że leki są podatne na rozkład nie tylko w warunkach tlenowych ale w także w warunkach beztlenowych [Suarez S. i in., 2010]. Wysoki stopień redukcji ibuprofenu, ketoprofenu, paracetamolu, tolmetinu, powyżej 90%,

obserwowany jest na odcinku od dopływu ścieków surowych do COŚ w Koziegłowach do komory denitryfikacji. Kwaśny charakter tych związków oraz wysoka wartość stałej biodegradacji k_{biol} sugerują, że związki te są eliminowane głównie na drodze biodegradacji [Urase T i in., 2005, Clara M i in., 2005, Suarez S. i in., 2010, Selgado R. i in., 2011]. Nie określono jednoznacznie, jaki procent usunięcia leków następuje w wyniku biodegradacji. Wzrost stężenia ibuprofenu oraz tolmentinu na odpływie z oczyszczalni może sugerować, że leki te ulegają częściowej adsorpcji na kłaczkach, które w wyniku długiego czasu zatrzymania ścieków bądź długiego wieku osadu zostają ponownie uwalniane do cieczy nadosadowej.

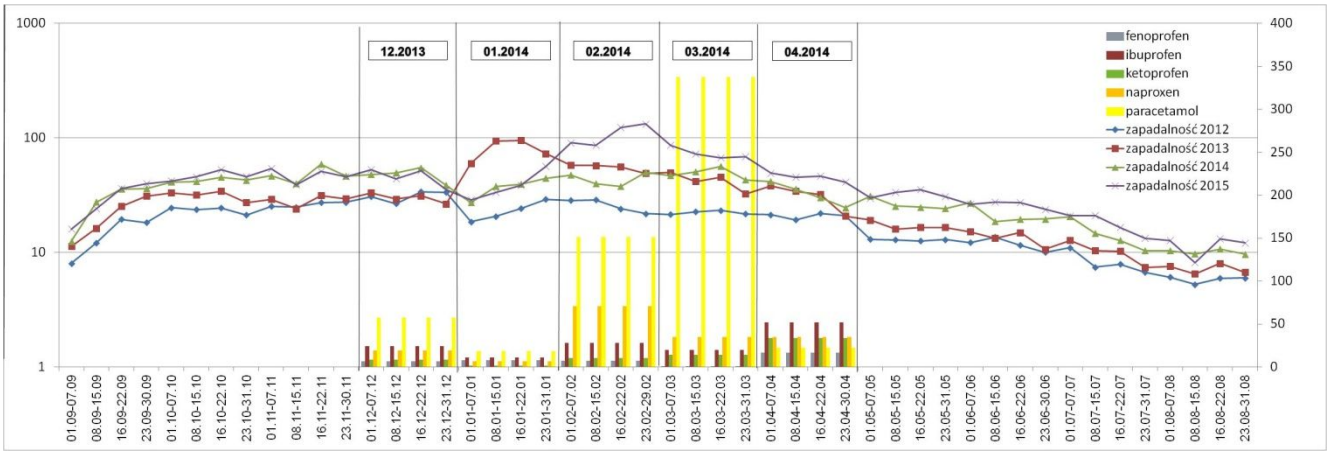
5.1.3. Źródła zanieczyszczeń farmaceutycznych pochodzących z wybranych zakładów farmaceutycznych w obszarze powiatu poznańskiego

Potwierdzeniem zwiększenia ładunku zanieczyszczeń lekami z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych dopływających do Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach są badania ścieków poprodukcyjnych, odprowadzanych z wybranych zakładów farmaceutycznych zlokalizowanych na obszarze powiatu poznańskiego (rysunki 31 i 32) [Metzger M., 2013, Szymczak, 2015, Zając A. i in., 2016]. Próbki do analiz były pobierane w okresie 2012/2013 oraz 2014/2015, na przełomie pory zimowej i wiosennej. Według danych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny [NIZP-PZH], okres od września do końca marca stanowił czas wzmożonych zachorowań na grypę [GIS, 2015] (rysunki 29 i 30).

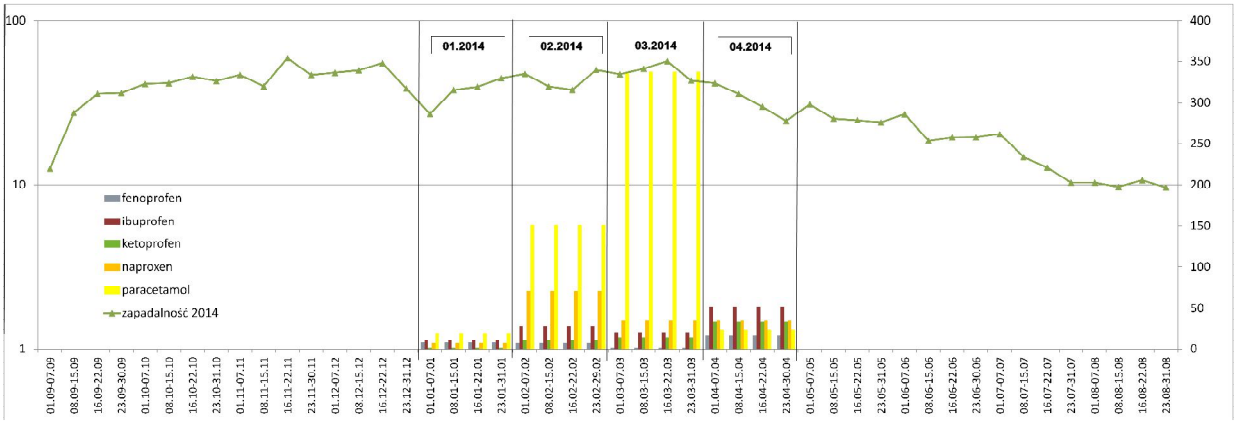
W obszarze badawczym na przełomie lat 2012/2013, spośród sześciu zakładów przemysłowych, z których pobrano do analiz próbki ścieków odprowadzanych do kanalizacji miejskiej, w dwóch z nich został zidentyfikowany fenoprofen. Tylko w jednym, zakładzie Z3 oznaczono ketoprofen. We wszystkich natomiast zakładach odnotowano obecność paracetamolu, ibuprofenu oraz naproksenu (rysunek 31). Substancje aktywne tych leków stanowią główny składnik produktów farmaceutycznych dostępnych bez recepty, znajdujących się na liście najczęściej kupowanych przez konsumentów [http://www.poradnikzdrowie.pl, odczyt 08.2017].

W próbkach ścieków odprowadzanych przez zakłady przemysłowe do kanalizacji miejskiej, pobranych na przełomie 2014 i 2015 roku (rysunek 32), można dostrzec obecność wszystkich analizowanych substancji aktywnych leków, w zakładach Z1, Z4, Z6. W przeciwieństwie do zakładów analizowanych w okresie 2012/2013, wartości stężenia fenoprofenu oraz ketoprofenu uzyskały wysokie wartości. Wśród analizowanych leków, widać znaczy wzrost ibuprofenu w marcu 2013r. w stosunku ilości tego związku produkowanego

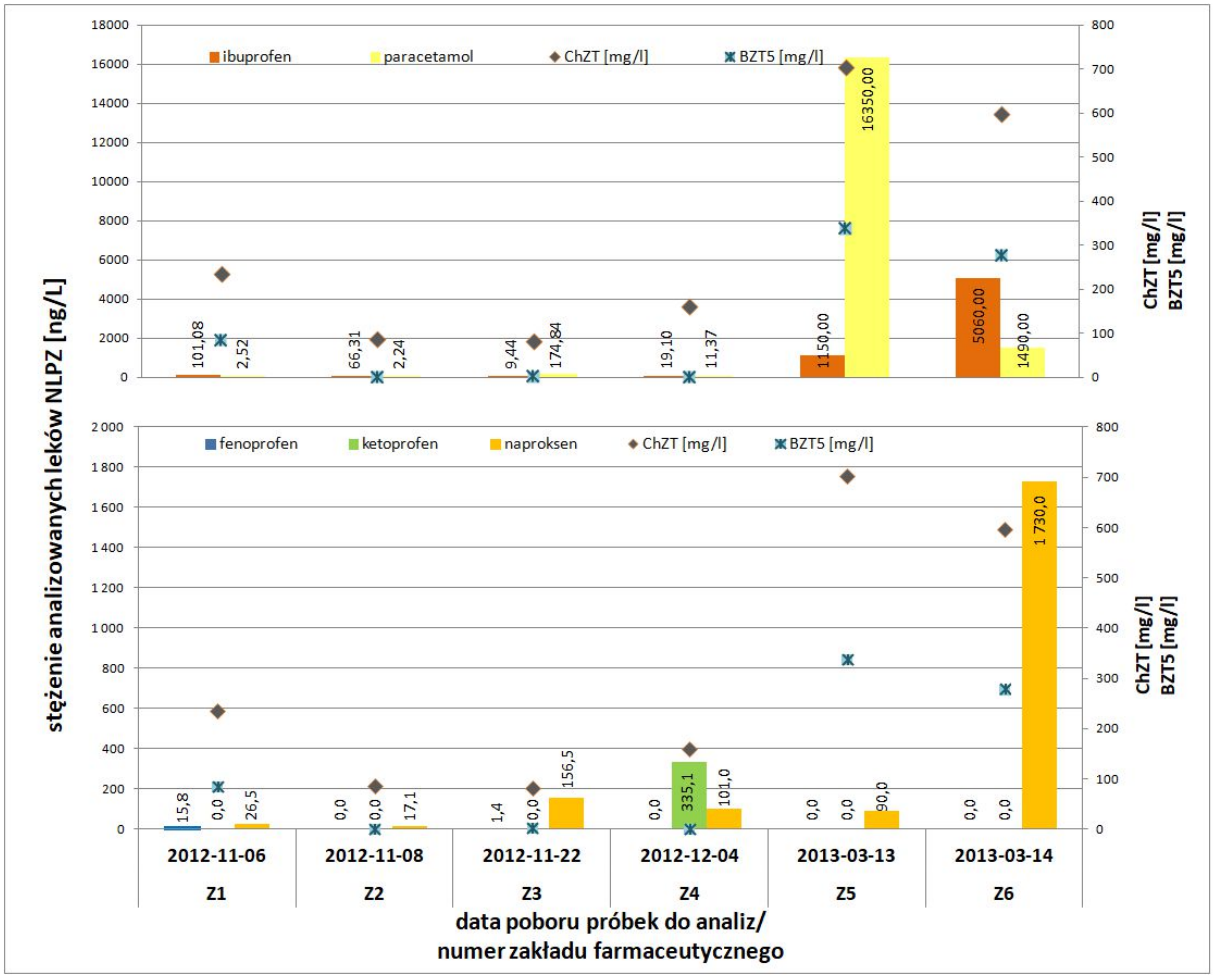
przez zakład Z1 w styczniu i grudniu. Zakres stężeń badanych leków (z wyjątkiem wartości ibuprofenu oznaczonej w marcu 2013r.) jest jednak znacznie niższy w stosunku do ich zawartości w ściekach zakładów analizowanych w latach 2012/2013r. Ich stężenie jest zbliżone do poziomu leków występujących w rzece Warcie, badanych w okresie od października 2012 do kwietnia 2014r. (rysunek 31).



Rysunek 29. Zapadalność na grypę i podejrzenia grypy w Polsce w okresie 2012-2015 w porównaniu z poprzednimi sezonami [GIS, 2015]



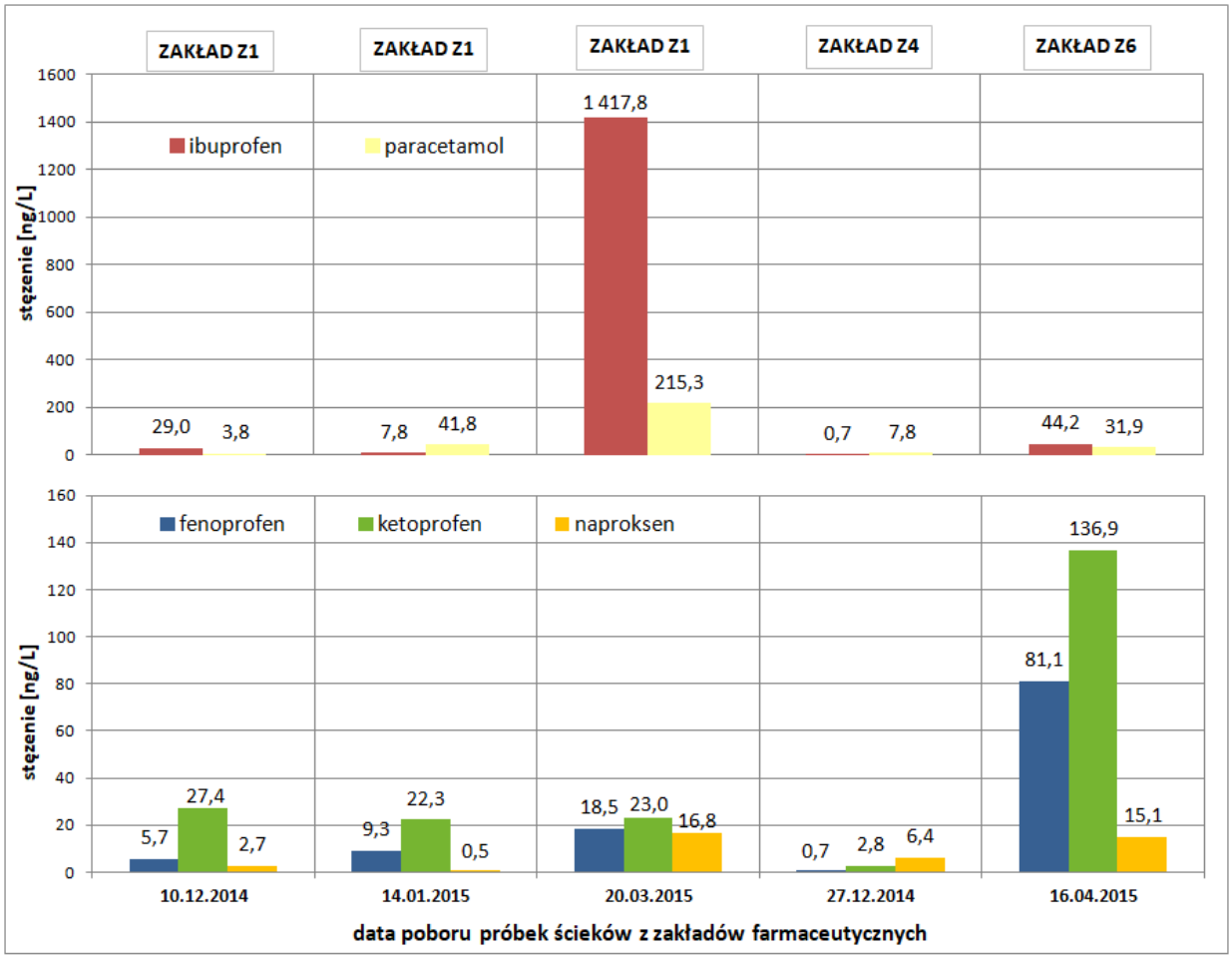
Rysunek 30. Zapadalność na grypę i podejrzenia grypy w Polsce w roku 2014 w porównaniu z poprzednimi sezonami [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/grypa/index.htm]



Rysunek 31. Stężenia wybranych farmaceutyków z grupy leków NLPZ zawartych w ściekach poprodukcyjnych wybranych zakładów farmaceutycznych działających na obszarze powiatu poznańskiego latach 2012 - 2013

Wzrastająca wartość stężeń wybranych leków w odpływach ze ścieków analizowanych firm farmaceutycznych pokrywa się prezentowanymi statystykami zachorowań na grypę w miesiącach od grudnia do kwietnia. W okresie badawczym od listopada 2012 r. do marca 2013r. najwyższe stężenie osiągnął paracetamol (16 350 ng/L) oraz ibuprofen (5 060 ng/L w marcu 2013r.). W ściekach odpływających z wybranych koncernów farmaceutycznych w okresie poboru prób od grudnia 2014 r. do kwietnia 2015 r. natomiast, odnotowano najwyższe stężenie ibuprofenu (1417,79 ng/L w marcu 2014r.). Na drugiej i trzeciej pozycji znalazł się paracetamol (215,30 ng/L) oraz ketoprofen (136,87 ng/L). Najwyższe ilości tych trzech substancji czynnych leków w ściekach odpływających z oczyszczalni, w obu analizowanych okresach badawczych wykazano w marcu i kwietniu (rysunek 32). Zawartość substancji farmaceutycznych w ściekach wypływających z wytypowanych koncernów przemysłowych była zależna od wielkości produkcyjnej danego zakładu, jak również od rodzaju produkowanych leków. Zakłady, w których stwierdzono największe ilości paracetamolu i ibuprofenu produkują leki zarówno na receptę jak i bez recepty oraz suplementy

diety. Dodatkowo koncerny te zajmują się produkcją preparatów stomatologicznych oraz kosmetyków w postaci tabletek, maści, kremów, płynów i aerozoli. Mimo wyższych stężeń wybranych lekarstw w latach 2012/2013 w stosunku do lat 2014/2015 można dostrzec wzrastającą tendencję konsumpcji leków. Wpływ na kształtujący się wzrost popytu na leki może być podyktowany porą roku sprzyjającą przeziębieniom i różnego rodzaju chorobom, jak również wielkością produkcyjną danego zakładu farmaceutycznego [Zając A. i in., 2016] oraz większą ogólnodostępnością i korzystną ceną leków dostępnych bez recepty.



Rysunek 32. Stężenia wybranych farmaceutyków z grupy leków NLPZ zawartych w ściekach poprodukcyjnych wybranych zakładów farmaceutycznych działających na obszarze powiatu poznańskiego w latach 2014 – 2015

5.2. Degradacja ibuprofenu w teście statycznym

W drugim etapie badawczym, ze względu na dużą popularność i ogólnodostępność aktywnej formy ibuprofenu w produktach lekowych z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, przeprowadzono analizę zachowania tego leku w warunkach laboratoryjnych. Za pomocą testów statycznych określono szybkość biodegradacji tego związku w funkcji czasu oraz efektywność jego usuwania przy zmiennych wartościach temperatury i jednoczesnej obserwacji zmian wartości pH i ChZT w funkcji czasu. Prowadzone badania pozwoliły również przeanalizować, jak zmienia się struktura i skład mikroorganizmów osadu czynnego w obecności analizowanej substancji czynnej.

5.2.1. Analiza rozkładu ibuprofenu w czasie przy założonym stężeniu leku

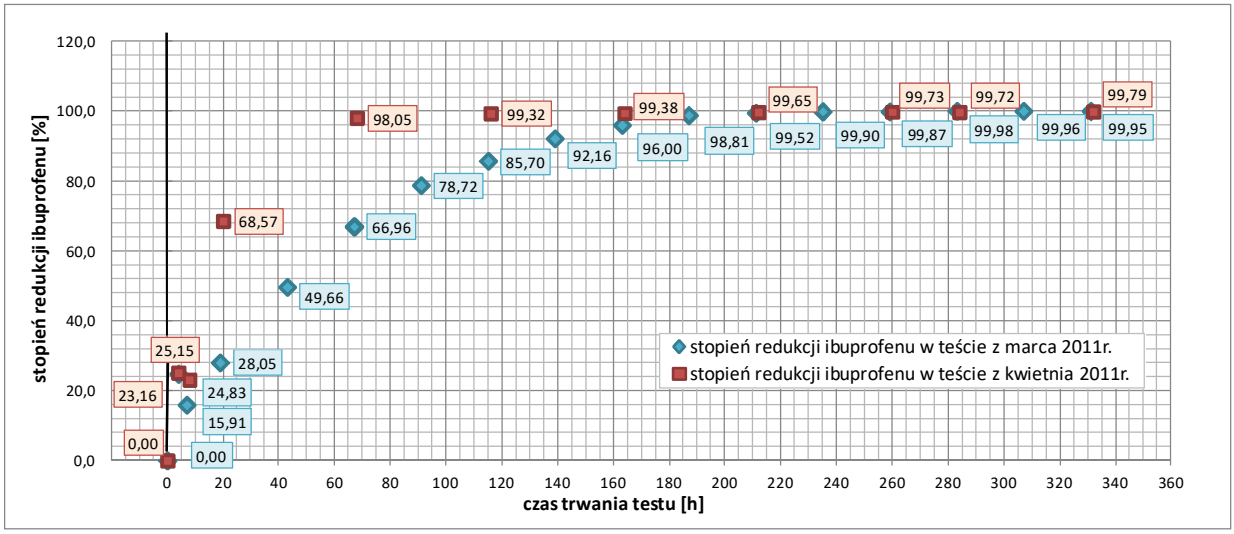
Dwie serie badawcze testów statycznych z wykorzystaniem osadu czynnego przeprowadzono w marcu i kwietniu 2011r. Uzyskane wyniki dowodzą, że analizowany farmaceutyk - ibuprofen, uległ degradacji.

Osad czynny, pobierany do badań, w marcu i kwietniu miał podobne parametry. Zawiesina ogólna osadu kształtował się na podobnym, równomiernym poziomie 10 g/L. W ściekach zawartość zawiesiny organicznej była prawie pięciokrotnie wyższa od zawiesiny mineralnej. Indeks osadu utrzymywał się na poziomie 100 mL/g, zatem wykazywał dobre właściwości sedymentacyjne. Temperatura osadu zarówno w marcu jak i kwietniu wynosiła średnio 15 ÷ 16^{o}C. Mimo podobnych parametrów osadu pobranego do badań w marcu i kwietniu, uzyskane wyniki kształtowały się odmiennie. Najbardziej zauważalną różnicą jest szybkość biodegradacji ibuprofenu. W pierwszym teście, wykonanym w marcu przebiegała ona wolniej w porównaniu z analizą przeprowadzoną w kwietniu. Jedną z przyczyn spowolnienia procesu degradacji leku w teście z marca może być wyższa od założonej w badaniach wartość stężenia ibuprofenu, przekraczająca 90 µg/ 200 mL (przyjęta w badaniach dawka ibuprofenu wynosiła 80 µg/ 200mL). Wysokie stężenie początkowe może sugerować, że lek był obecny w osadzie czynnym, pobranym z bioreaktora Centralnej Oczyszczalni Ścieków. Nie można również wykluczyć, że w zastosowanym do badań osadzie znajdowały się również inne substancje toksyczne, które mogłyby hamować przebieg procesu degradacji ibuprofenu.

Ośmiogodzinny okres adaptacji osadu czynnego, w próbkach z ibuprofenem, obserwowany w pierwszym dniu obu testów wykazał spadek stężenia ibuprofenu o 15% (rysunek 33). Po dobie, widać znaczną rozbieżność w szybkości usuwania leku. W 20 h testu zaobserwowano największą różnicę w efektywności usuwania leku między oboma testami, która wyniosła 40%. Nieznacznie mniejsza, 30% różnica w szybkości degradacji leku między

eksperymentami widoczna jest w 68 h testów, a w 116 h zmniejszyła się ona do niecałych 15%. Zbliżony stopień redukcji ibuprofenu w obu testach zanotowano w 160 h trwania badań (w teście z marca wyniósł on 96%, natomiast w teście z kwietnia ponad 99%). W 211 h trwania testu, efektywność usuwania badanego leku wyniosła ponad 99,5% w obu testach. Porównując redukcję ibuprofenu w ostatnim dniu trwania eksperymentu, ostatecznie, mimo początkowo większej zawartości w badanej próbce, test marcowy uzyskał niższą wartość stężenia analizowanego leku.

W rozpatrywanych próbkach, oprócz osadu czynnego i ibuprofenu znajdowały się komponenty w postaci pożywki zapewniające mikroorganizmom prowadzenie niezbędnych procesów życiowych [rozdział 4, pkt 4.3]. Uzyskane wyniki w początkowej fazie testu sugerują, że bakterie osadu czynnego wykorzystują węgiel wchodzący w skład struktury ibuprofenu, do podtrzymania funkcji życiowych.



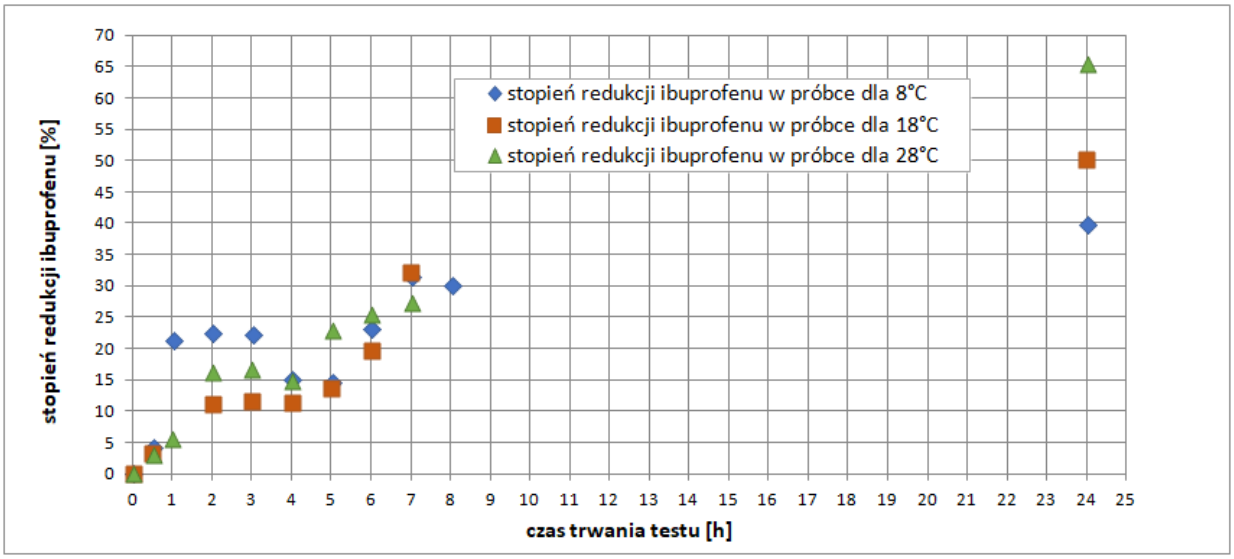
Rysunek 33. Stopień redukcji ibuprofenu dla testów statycznych przeprowadzonych w marcu i kwietniu 2011r.

Przeprowadzone badania z wykorzystaniem osadu czynnego pobranego z Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach dowodzą, że ibuprofen ulega procesom degradacyjnym. Analiza wyników, pokazuje, że redukcja stężenia farmaceutyku następuje już w ciągu pierwszych godzin kontaktu z mikroorganizmami osadu czynnego. Podobne wnioski na drodze badań laboratoryjnych uzyskał Subramanya [Subramanya N. T., 2007]. Zgodnie z jego analizą, stężenie ibuprofenu zostało zredukowane przez osad czynny w 95% w ciągu 2, 3 dni pomiaru (przy stężeniu ibuprofenu 0,5 mg/L). Kosjek, Heath i Kompare w przeprowadzonych badaniach, dowiedli wysoką skuteczność usuwania analizowanego leku, sięgającą ponad 87% [Kosjek T. i inni, 2007]. Trwają także badania nad analizą, które szczepy osadu czynnego mają największy udział w rozkładzie substancji lekowych. Wstępne hipotezy

sugerują, że ibuprofen jest rozkładany przez bakterie nieutleniające amoniaku [Hyungkeun R., i in., 2009].

5.2.2. Analiza rozkładu ibuprofenu w czasie dla zmiennych wartości temperatury otoczenia

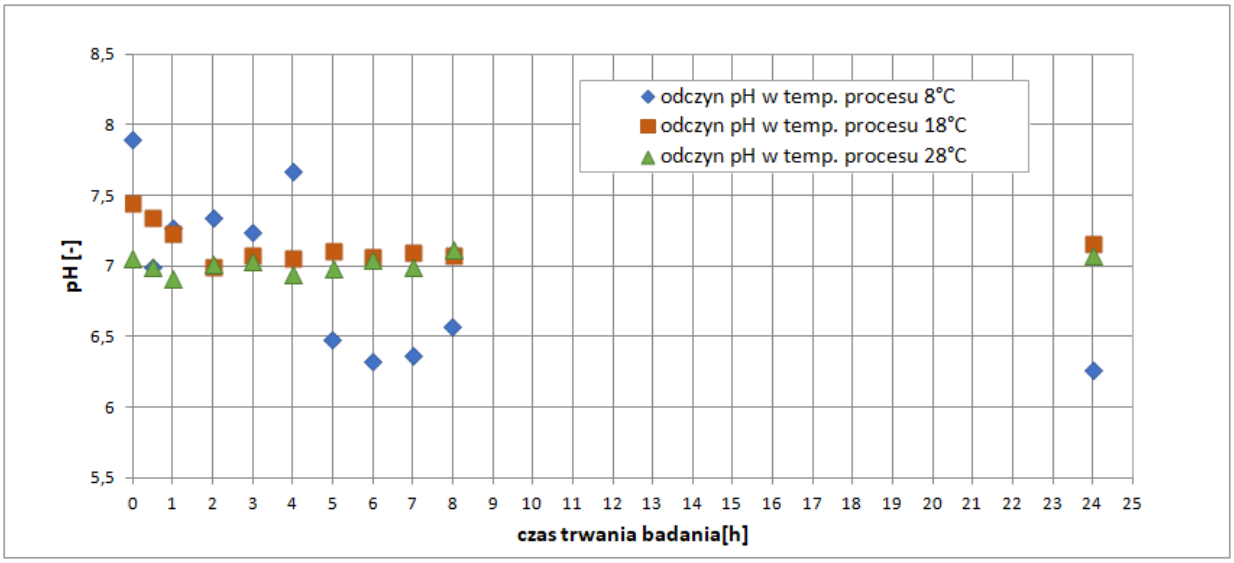
Analiza szybkości degradacji ibuprofenu dla trzech ustalonych wartości temperatury (tj. 8, 18 oraz 28°C) została przeprowadzona za pomocą testu statycznego. Miał on na celu zweryfikowanie, czy założona koncepcja badawcza oddaje ogólną tendencję do degradacji tego leku poddanego działaniu różnych czynników fizykochemicznych. Uzyskane wyniki pozwoliły wyciągnąć wnioski pomocne w dalszym planowaniu badań w układzie dynamicznym, zaprezentowane w rozdziale 5.3.



Rysunek 34. Wartości stopnia redukcji ibuprofenu uzyskane dla trzech serii badawczych prowadzonego testu statycznego w zależności od temperatury

W trwającym 24h teście statycznym przeprowadzonym w trzech seriach, uzyskane wyniki wskazują na spadek stężenia ibuprofenu dla każdej analizowanej wartości temperatury. Najniższy stopień redukcji ibuprofenu, na poziomie 40% został zanotowany przy prowadzeniu testu w temperaturze 8°C. Zwiększenie temperatury w analizowanym układzie do 18°C spowodowało wzrost redukcji do 50%. Największy spadek stężenia ibuprofenu w ciągu doby zaobserwowano w temperaturze 28°C, wyniosł on 65% (rysunek 34). W pierwszych 3 godzinach testu, tuż po zadozowaniu leku, najwyższy stopień redukcji, powyżej 20% uzyskano w próbkach, w których temperatura wynosiła 8°C. W teście statycznym prowadzonym w temperaturze 28°C zanotowano redukcję na poziomie 15%. Najsłabiej natomiast usuwanie ibuprofenu przebiegało przy 18°C, gdzie redukcja wyniosła nieco powyżej 10%. Od czwartej godziny trwania testu zaobserwowano spowolnienie rozkładu przez mikroorganizmy analizowanego leku w temp. 8°C i wzrost degradacji dla pozostałych

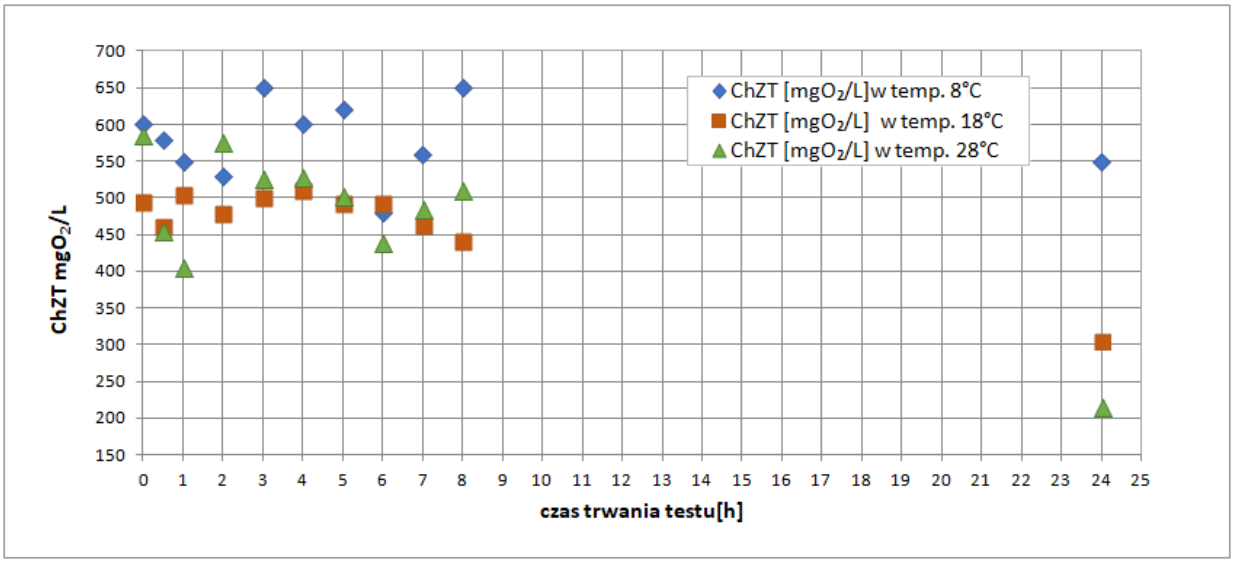
temperatur. Ostatecznie, po 24h testu, wyniki wykazały, że wzrost temperatury dynamizuje proces usuwania ibuprofenu przez mikroorganizmy osadu czynnego, co potwierdzają także badania [Kruglova A. i in., 2014].



Rysunek 35. Wartości średniego odczynu pH uzyskane dla trzech serii badawczych prowadzonego testu statycznego w zależności od zmiennej temperatury

W temperaturze 8°C wraz z wydłużającym się czasem retencji ibuprofenu zaobserwowano spadek wartości pH z 7,52 w próbce zerowej („0") do 6,27 po 24h, podczas gdy dla 18°C i 28°C średnia wartość pH podczas całej serii badawczej wynosiła średnio ok. 7,0 (rysunek 35). Według danych literaturowych, stała dysocjacji ibuprofenu pKa wynosi 4,85 [https://chemicalize.com, odczyt 09.2017]. Analizowana substancja osiąga właściwości hydrofilowe, ułatwiające dysocjację i łączenie się z wodą dla wartości pH powyżej 8. Środowisko kwaśne sprzyja zjawisku sorpcji na powierzchni materiału, który w tym przypadku stanowi osad czynny. Proces ten jest nietrwały, przez co lek może uwalniać się z powrotem do ośrodka wodnego, powodując powtórny wzrost stężenia. Wyższa temperatura zapewniła utrzymanie pH na poziomie 7,0. Dla wartości temperatury 8°C, pH wahało się między 6,0 a 6,5.

W każdej serii pomiarowej, dla każdej analizowanej temperatury, wraz z upływem czasu następował spadek ChZT (rysunek 36), co może świadczyć, że ibuprofen ulega biodegradacji. Wraz ze wzrostem temperatury wartość ChZT w analizowanej próbie malała, co potwierdza rozkład badanej substancji aktywnej przez mikroorganizmy. Brak innego źródła węgla organicznego wymusił na mikroorganizmach zmianę w prowadzonych dotychczas procesach metabolicznych, przystosowując je do jego pobierania z bardziej złożonych związków, np. ibuprofenu.



Rysunek 36. Wartości ChZT uzyskane dla trzech serii badawczych prowadzonego testu statycznego w zależności od zmiennej temperatury

Dla każdej z trzech serii pomiarowych, wykonanych dla różnych wartości temperatury wykonano analizę mikrobiologiczną próbki. Analizy te były wykonane w próbce wyjściowej osadu czynnego z ibuprofenem („W") w chwili rozpoczęcia testu oraz po 24h (próbka nr „10"). W próbkach wyjściowych osadu czynnego („W") stwierdzono obecność następujących mikroorganizmów: korzenionóżek (*Rhizopoda*): *Arcella vulgaris*, *Amoeba proteus,* wiciowców (*Flagellata*): *Peranema sp.,* orzęski (*Ciliata*): *Aspidisca costata, Paramecium caudatum, Paramecium bursaria, Glaucoma scintillans, Litonotus sp., Spirostomum sp*., *Stylonychia sp., Opercularia coarctata, Carchesium polypinum, Epistylis lacustris, Epistylis plicatilis, Vorticella convallaria,* niesporczaków (*Tardigrada*): *Tardigrada* n.det., nicieni (*Nematoda*): *Nematoda* n.det., wrotek (*Rotatoria*): *Lecane sp.,* bakterii i grzybów nitkowatych n.det., bakterii swobodnie pływających n.det. W osadzie dominowały orzęski osiadłe, natomiast liczne były także bakterie i grzyby nitkowate. Kłaczki osadu były małe, ale dość liczne. Wszystkie organizmy były bardzo aktywne życiowo, przy czym w próbce umieszczonej w temperaturze 8^{o}C ich aktywność była najmniejsza. W próbkach osadu czynnego po 24 h (próbka „10") stwierdzono, że skład jakościowy, ilościowy oraz aktywność życiowa mikroorganizmów były bardzo podobne, jak w próbce wyjściowej („W"), bezpośrednio po dodaniu ibuprofenu. Zaważono zatem, że ibuprofen w dawce 10 mg/L nie przyczynił się w czasie 24 h do zmiany składu i aktywności życiowej mikroorganizmów osadu czynnego. Podczas obserwacji mikroskopowych zarówno na początku testów (w próbie wyjściowej „W") jak i po 24h dla każdej serii pomiarowej, stwierdzono obecność orzęsek osiadłych, pełzających i swobodnie pływających, wrotków, a także ameb. Drobny kształt kłaczków oraz obecność licznych bakterii nitkowatych i pojedynczych nicieni, mogły być przyczyną złej kondycji osadu (dla każdej

z trzech serii pomiarowych oznaczono indeks osadu >900 mL). Udział mikroorganizmów w aktywnym rozkładzie ibuprofenu może potwierdzać fakt, że redukcji stężenia ibuprofenu towarzyszył spadek ChZT, szczególnie dla wyższych wartości temperatur.

5.3. Degradacja diklofenaku w układzie dynamicznym

Ostatni, trzeci etap badań zakładał przeprowadzenie analiz w układzie dynamicznym składającym się z dwórch bioreaktorów tlenowych o objętości czynnej 50 L. Czas trwania testu obejmował 150 dni podzielonych na dwie części. Pierwsza z nich obejmowała 61-dniowy okres wpracowania materiału biologicznego w postaci osadu czynnego pobranego z Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach, koło Poznania. Druga część testu natomiast obejmowała analizę rozkładu diklofenaku dozowanego do reaktora R2. Okres od 62 do ostatniego, 150 dnia został podzielony na VI cykli (serii) badawczych. Cykle od I do V trwały 12 dni, natomiast ostatni, VI cykl badań 4dni. Między każdą z serii występowały 4 dniowe przerwy w dozowaniu diklofenaku. Pierwsze cztery serie zakładały sprawdzenie skuteczności rozkładu diklofenaku dla zmiennych wartości pH, przy jednakowym dozowaniu 3 dawek leku (tj. 1, 5, 10 mg/L), każdej w ciągu 4 dni. W poniższych podrozdziałach zaprezentowano uzyskane wyniki badań.

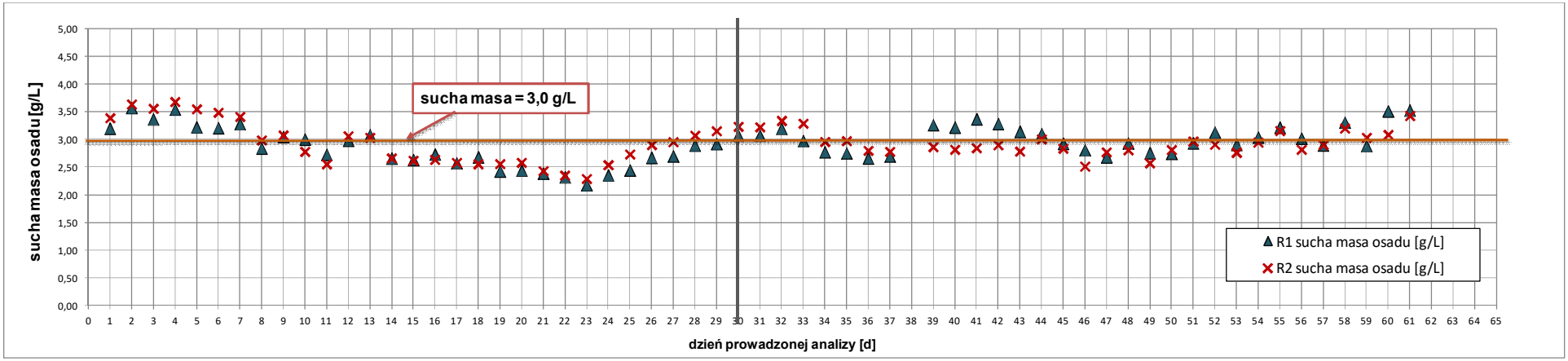
5.3.1. Degradacja w warunkach tlenowych (badania wstępne)

Pierwszy etap badań testu dynamicznego obejmował pobranie osadu czynnego z komory tlenowej Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach do beczki z tworzywa sztucznego o pojemności 100 L. Następnie, po przewiezieniu do laboratorium, w celu utrzymania osadu w stanie zawieszenia oraz utrzymaniu warunków tlenowych, osad był napowietrzany i mieszany. Po ustaleniu stężenia suchej masy osadu, do każdego z reaktorów wlano po 50 L osadu z zachowaniem przyjętego w badaniach stężenia na poziomie 3 g/L. Wartość stężenia osadu została dobrana na podstawie studim literatury [Kosjek T. i in., 2007, Kruglova A., 2014, Kimura K. i in., 2010]. Etap wpracowania osadu czynnego polegał na ustabilizowaniu i zaadaptowaniu osadu czynnego do pracy w określonych warunkach: temperatury na poziomie 20^{o}C, tlenu w granicach 2-3 mg/L, odczynu pH między 7,0 -7,5 oraz stężenia suchej masy osadu w granicach 3 g/L. Jednocześnie, do obu bioreaktorów była dozowana pożywka syntetyczna (szczegółowo opisana w rozdziale 4.3.), zawierająca w swoim składzie związki niezbędne do rozmnażanania i podtrzymywania funkcji życiowych przez mikroorganizmy. Założony czas zatrzymania ścieków syntetycznych w ukadzie, zarówno

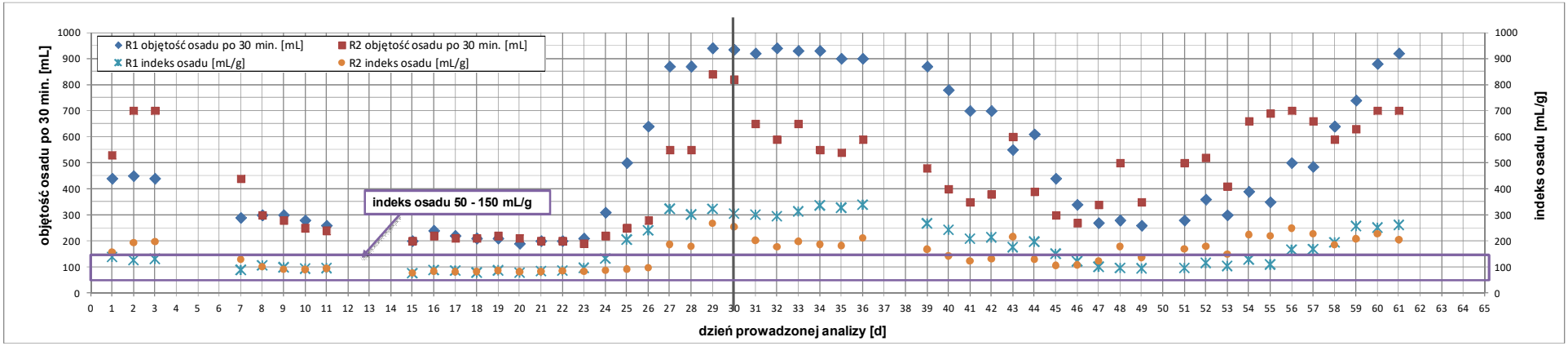
w czasie wpracowania osadu czynnego, jak również w okresie dozowania substancji toksycznej - diklofenaku, wynosił 4 doby, natomiast wiek osadu 12 dni.

Etap wpracowania osadu czynnego obejmował 61 dni. W tym okresie monitorowano oraz badano: temperaturę, odczyn pH, tlen rozpuszczony, objętość osadu po 30 min. zagęszczenia w cylindrze, suchą masę osadu oraz indeks osadu. W czasie pierwszych 30 dni badań, pomimo, że temperatura otoczenia była w granicach 18-20^{o}C, średnia temperatura panująca we wnętrzu bioreaktorów osiągnęła zaledwie 12-13^{o}C (co było wynikiem braku grzałek z termostatem). Odczyn pH w układzie charakteryzował się w tym okresie dużą powtarzalnością. Średnio jego wartość wyniosła 7,3. Mimo podobnej kondycji obu bioreaktorów w zakresie przyrostu biomasy czy indeksu osadu, stężenie tlenu rozpuszczonego było bardzo zmienne. Średnia wartość znajdowała się w przedziale między 4,0 – 5,0 mgO_2/L. Ścisk syntetyczny był dozowany do obu reaktorów w sposób ciągły, z jednakową wartością natężenia przepływu przez całą dobę. Pomiar tlenu natomiast odbywał się dwukrotnie w ciągu doby. Różnica między pomiarami w obrębie jednego dnia wynosiła od 8 do 10 godzin. Mimo niskiej temperatury oraz wysokich wartości stężenia tlenu rozpuszczonego, średnie wartości indeksów osadu kształtowały się w granicach 120- 145 mL/g, co świadczy o dobrej sedymentacji osadu. Biorąc pod uwagę jednak wartość suchej masy osadu, w pierwszym tygodniu badań osad czynny uzyskał przyrost od 0,2 – 0,5g/L. W kolejnych 2 tygodniach zaobserwowano spadek biomasy i brak przyrostu w obu reaktorach. W 23 dniu badań sucha masa w bioreaktorze R1 wyniosła 2,17 g/L, natomiast w bioreaktorze R2 – 2,28 g/L. Nastąpiła zmiana koloru osadu z ciemno na jasnobrązowy. Zaobserwowano liczne bakterie i grzyby nitkowate. Ze względu na pogarszający się stan osadu czynnego, 23 dnia testu zmieniono pożywkę syntetyczną, eliminując z jej składu octan amonu (CH_3COONH_4) oraz chlorek amonu (NH_4Cl) zastępując je mocznikiem ($CO(NH_2)_2$) (opisaną w pkt 4.4.). Zmiana pożywki spowodowała, że osad zregenerował się, co miało bezpośredni wpływ na jego przyrost o około 0,4 g/L. Poprawa nastąpiła również w kolorze osadu czynnego, który zmienił barwę z jasno brązowego na ciemnobrązowy. Mimo widocznej poprawy barwy, zapachu oraz ilości biomasy, od 25 dnia testu odnotowano pogorszenie sedymentacji i tym samym indeksu osadu w bioreaktorze R1.W porównaniu do dnia 24, kiedy objętość osadu po 30 min. zagęszczeniu w cylindrze wynosiła 310 mL (co odpowiada indeksowi osadu 131,97 mL/g), w dniu następnym odnotowano objętość 500 mL (równoważną indeksowi osadu 205,04 mL/g). W reaktorze R2 pogorszenie sedymentacji widoczne było od 27 dnia trwania badań. W najbardziej niekorzystnym momencie, na etapie wpracowania osadu zanotowano objętość po 30 min. zagęszczeniu na poziomie 700mL w 56, 60 i 61 dniu trwania eksperymentu. W tym

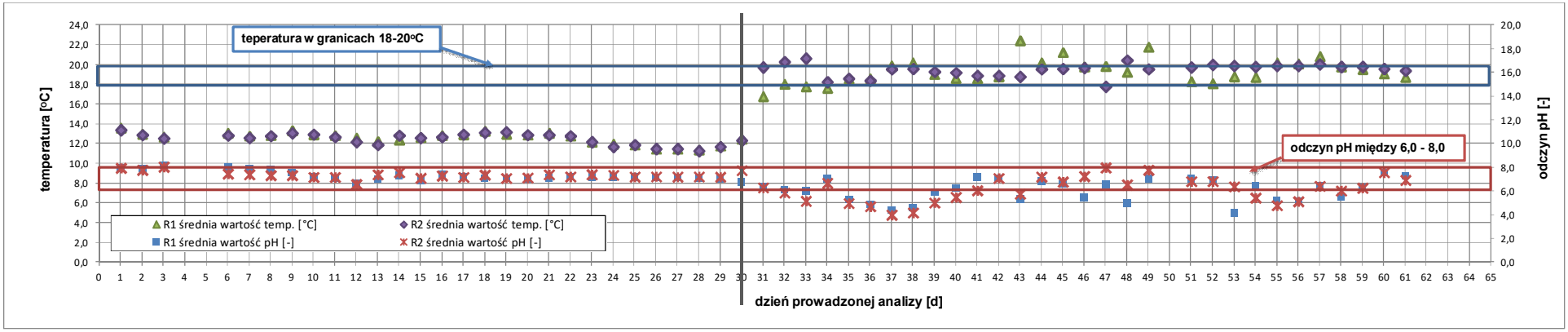
samym czasie zaobserwowanowzrost indeksu osadu w reaktorze R1. W celu zachowania jednakowej, temperatury, zapewniającej mikroorganizmom osadu czynnego optymalne warunki do prowadzenia procesów życiowych w całym okresie trwania badań, w 30 dniu badań zamontowano grzałki z termostatami, które umożliwiły utrzymanie stałej temperatury w bioreaktorach na ustalonym poziomie 20^{o}C (fakt ten został zaznaczony na rysunkach 37-40 w postaci linii pionowej). W pierwszym tygodniu po ustabilizowaniu temperatury na poziomie 20^{o}C nastąpił wzrost stężenia suchej masy osadu oraz indeksu osadu. W reaktorze R1 odnotowano najwyższe wartości indeksu osadu między 29 a 36 dniem trwania testu wstępnego (na poziomie 320 – 340 mL/g). W reaktorze R2, w analogicznym czasie indeks osadu wynosił 250-210 mg/L. W ciągu kolejnego tygodnia, nastąpiła stabilizacja powyższych parametrów w obu reaktorach, osiągając podobne wartości indeksu osadu, na poziomie 100 mL/g. W okresie od 47 do 53 dnia prowadzonych badań zarówno objętość osadu jak i indeks osadu utrzymywały optymalne wartości wskazujące na dobrą sedymentację mikroorganizmów (indeks osadu w granicach 100 – 180 mL/g). Równocześnie można zaobserwować przyrost biomasy utrzymywany na poziomie 3 g/L oraz niezmienne wartości temperatury, odczynu pH oraz stężenia tlenu rozpuszczonego. Dobrą kondycję osadu potwierdzają analizy mikroskopowe. W tym czasie zaobserwowano powstawanie większych skupisk kłaczków osadu czynnego, zróżnicowanie w obrębie mikroorganizmów a także nieliczne ilości grzybów oraz bakterii nitkowatych. Od 54 dnia eksperymentu, mimo stałych wartości tlenu i temperatury, zarówno w reaktorze R1 jak i R2 nastąpiło pogorszenie sedymentacji oraz gwałtowny spadek odczynu pH (do 4,14 w reaktorze R1). Po upływie tygodnia zauważono wzrost odczynu pH do 6,5 a także powtarzalność i stałe wartości pozostałych parametrów suchej masy, indeksu osadu oraz temperatury. Dodatkowo różnorodność gatunkowa wśród mikroorganizmów, ciemny kolor i świeży zapach osadu a także wysoki przyrost biomasy zadecydował o rozpoczęciu badań właściwych, mających na celu rozpoczęcie dozowania diklofenaku do układu R2.



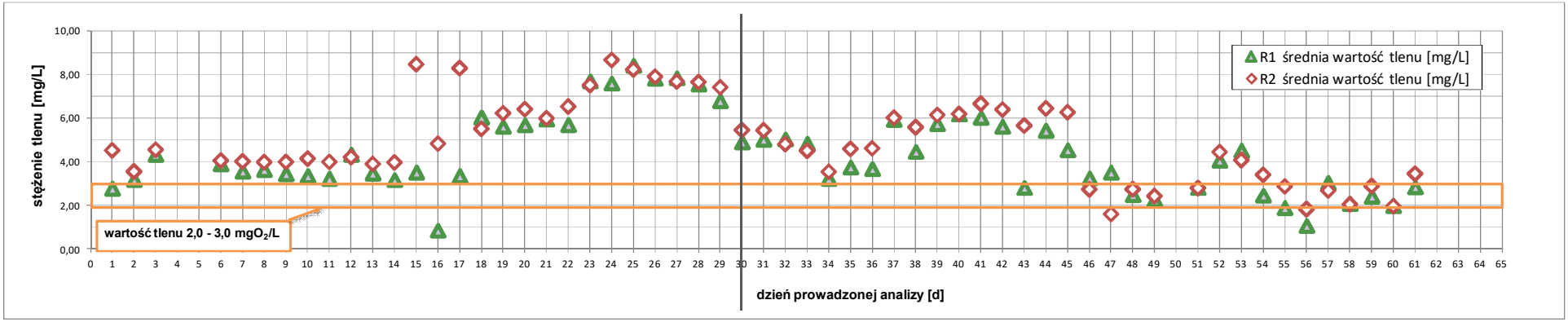
Rysunek 37. Sucha masa osadu w bioreaktorach R1 i R2 w okresie wpracowania osadu czynnego (od 1 do 61 dnia)



Rysunek 38. Objętość osadu po 30 min. zagęszczaniu w cylindrze oraz obliczona wartość indeksu osadu czynnego w bioreaktorach R1 i R2 w okresie wpracowania osadu czynnego (od 1 do 61 dnia)



Rysunek 39. Średnia temperatura oraz średnia wartość odczynu pH w bioreaktorach R1 i R2 w okresie wpracowania osadu czynnego (od 1 do 61 dnia)



Rysunek 40. Średnie stężenie tlenu w bioreaktorach R1 i R2 w okresie wpracowania osadu czynnego (od 1 do 61 dnia)

5.3.2. Degradacja w warunkach tlenowych przy zmiennych parametrach fizyko-chemicznych (pH, stężeniu leku, stopniu natlenienia)

Moment rozpoczęcia dozowania do bioreaktora R2 postaci aktywnej diklofenaku będącego przedmiotem analiz, przyjęto, jako drugi etap badań. Składał się on z 6 cykli (serii) badawczych. Każda z pięciu pierwszych serii badawczych trwała 12 dni, zgodnie z założonym wiekiem osadu. Między poszczególnymi eksperymentami zaplanowano przerwy 4 dniowe, odpowiadające czasowi zatrzymania. Diklofenak był dozowany do układu w dawkach o stężeniu 1, 5 oraz 10 mg/L. Z powodu braku danych dotyczących wielkości produkcji analizowanego leku w zakładach farmaceutycznych, wybór dawki został określony w oparciu o przegląd literatury na temat monitoringu ścieków dopływających i odpływających z miejskich oczyszczalni ścieków działających w obszarze kraju, jak i zagranicą. Dodatkowo, pomocne były informacje wynikające z badań własnych określające ilości substancji farmaceutycznych oznaczonych w próbkach pobranych z rzeki Warty, jak i COŚ.

W 62 dniu trwania testu, do bioreaktora R2 zadozowano diklofenak, co rozpoczęło pierwszy cykl badań. Zakładał on analizę usuwania diklofenaku w układzie o stabilnych parametrach, tj. temperatury, tlenu, suchej masy osadu oraz odczynu pH ustabilizowanego w wyniku zachodzących przemian w układzie przez mikroorganizmy osadu czynnego (definiowany na rysunkach 41 - 55 jako „naturalny") w okresie wpracowania. Na rysunkach 40-56, zamieszczonych na stronach 134-248, przedstawiono wykresy obrazujące zmiany zachodzące w obu reeaktorach, podczas dozowania analizowanej substancji czynnej do układu R2.

Już w pierwszych czterech dniach dozowania najmniejszej dawki leku, zaobserwowano dwukrotnie wyższą w stosunku do reaktora wzorcowego R1 wartość ChZT (rysunek 45), azotu amonowego (rysunek 48) oraz fosforu ogólnego (rysunek 52). Zarówno w reaktorze R1 jak i R2 azot ogólny (rysunek 50) oraz ortofosforany były na podobnym poziomie. Indeksy osadu w obu reaktorach wynosiły w granicach 250 – 350 mL/g (rysunek 40) i kształtowały się bardzo podobnie przez cały I cykl badawczy. W ciągu czterech dni, w trakcie których do reaktora R2 zadozowano diklofenak w ilości 1,0 mg/L zaobserwowano redukcję leku na poziomie 95,9%. Niska wartość ChZT oraz BZT_5 pozwalają przypuszczać, że degradacja diklofenaku nastąpiła w procesie rozkładu mikrobiologicznego. Najniższą efektywność usuwania analizowanego związku oznaczono po 4 dobach dozowania leku w stężeniu 5 mg/L, wyniosła ona 62,5%. Po zakończeniu dozowania 10 mg/L diklofenaku, kończącym I serię badań, uzyskany stopień redukcji był na poziomie 73%. Od 74 dnia testu rozpoczęto 4 dniową przerwę w dawkowaniu leku do reaktora R2. Po jej upływie, przed rozpoczęciem dozowania

diklofenaku w II serii badań, odnotowano 59,4% redukcję diklofenaku w stosunku do wartości występującej w ostatnim dniu trwania serii I.

Od 78 dnia prowadzonego testu rozpoczęto II cykl badań. W stosunku do poprzedniego eksperymentu, seria ta charakteryzowała się stałym odczynem pH, utrzymywanym na poziomie 7,5. Po zakończeniu dozowania dilkofenaku w stężeniu 1,0 mg/L redukcja leku wynosiła 62,6%. Po upływie kolejnych 4 dni dozowania farmaceutyku w dawce 5 mg/L usunięcie leku było na poziomie 54,3%. Sytuacja ta może być spowodowana faktem, że w dniu rozpoczęcia II serii badań, w reaktorze R2 stężenie diklofenaku wynosiło 1,3 mg/L, którego obecność mogła ograniczyć rozkład kolejnej porcji dozowanego związku. Po zakończeniu dozowania 5 mg/L, nastąpiła pięciodniowa przerwa w dozowaniu leku do układu. W pierwszym dniu rozpoczęcia dozowania 10 mg/L diklofenaku, zaobserwowano, że stężenie leku w reaktorze R2 uzyskało tę samą wartość, co w analogicznym czasie w cyklu I (wyniosło 1,89 mg/L). Po zakończeniu dozowania substancji czynnej w najwyższym stężeniu, stopień redukcji był na poziomie 56,6%. Mimo niewielkiej zmiany odczynu pH, w porównaniu z pierwszym cyklem badań redukcja diklofenaku zmniejszyła się o ponad 16%. Może to sugerować, że nawet niewielki wzrost pH (niecałe 0,5) hamuje degradację diklofenaku , co potwierdził w badaniach Kimura i in. [Kimura i in., 2010]. Indeks osadu w ciągu pierwszych ośmiu dni II cyklu badań zachował zbliżone wartości, jak w serii I badań. W okresie dozowania najwyższego stężenia zaobserwowano zmniejszenie wartości indeksu osadu z ponad 320 mL/g (85 dzień analiz) do 237 mL/g (95 dzień analiz), w stosunku do reaktora R1. Może to sugerować, że obecność diklofenaku nie działa na mikroorganizmy osadu czynnego toksycznie. W analizie mikrobiologicznej (tabele 17-20) stwierdzono dość licznie występujące orzęski *Paramecium bursaria* oraz wrotek *Rotaria rotatora* (rysunki 56 i 57). Zmniejszyła się natomiast ilość wrotek *Cephalodella sp.*, *Lecane sp.*. W reaktorze R2 dość licznie również występowały bakterie nitkowate. W pierwszych 8 dniach testów, podczas dozowania 1 i 5 mg/L diklofenaku, w reaktorze R2 zauważono podobne jak w cyklu pierwszym wartości ChZT i BZT_5. Stężenie azotu ogólnego było o 10 mgN_{og}/L mniejsze niż w czasie cyklu I. W stosunku do pierwszej serii badań, w tym samym czasie, nieznacznie wzrosła średnia wartość fosforu ogólnego o około 0,4 mg/L. Stężenie fosforu podczas dozowania diklofenaku w ilości 1 i 5 mg/L wzrosło o połowę w stosunku do reaktora wzorcowego R1. Jego wartość była zbliżona do reaktora R1 poczas aplikacji stężenia leku na poziomie 10 mg/L. Podczas dozowania najwyższej dawki obniżyła się wartość ChZT (poniżej 50 mg/L) w stosunku do reaktora bez obecności diklofenaku. Po zakończeniu drugiego cyklu, w dniach od 95 do o 98 nastąpiła przerwa w dozowaniu diklofenaku. W tym czasie przygotowywano reaktor R2 do kolejnej serii badań, stabilizując

odczyn w układzie na poziomie 6,5. Odnotowano redukcję pozostałości leku na poziomie 41,7% w stosunku do wartości z ostatniego dnia drugiej serii badań.

W serii III badań, mimo bardzo wysokiej pozostałości diklofenaku na początku cyklu (ok. 3 mg/L), całkowita redukcja leku, po zakończeniu dozowania stężenia 1 mg/L wyniosła 87,9%, co stanowi o ponad 25% więcej, niż przy wartości uzyskanej przy pH = 7,5. Na podobnym poziomie w obu cyklach zanotowano redukcję substancji czynnej po wprowadzeniu do układu dawek 5 mg/L i 10 mg/L z uwzględnieniem zbliżonych wartości pozostałości leku. Analiza mikrobiologiczna wskazała także na dobrą kondycję osadu czynnego z licznymi formami orzęsek oraz wiciowców (tabela 20). Stwierdzono nieznaczną ilość bakterii nitkowatych. W osadzie dominowały drobne i średniej wielkości kłaczki w kolorze jasnobrązowym. Osad w tej serii badań miał dobre właściwości sedymentacyjne, co potwierdza indeks osadu w granicach 50-150 mL/g. Wyższą wartość indeksu zanotowano w dniach od 101 do 103 (okres dozowania diklofenaku w stężeniu 1 mg/L) oraz w 108, po pierwszej dobie dozowania diklofenaku w dawce 10 mg/L. W tym okresie badań zaobserwowano wyższy niż w pozostałych cyklach przyrost osadu czynnego, średnio o około 0,2 g/L. Wartości ChZT oraz BZT_5 nie przekroczyły dopuszczalnych norm dotyczących wskaźników zanieczyszczeń dla ścieków przemysłowych (tabela 15) [RMŚ, Dz.U. z 2014r. poz. 1800]. Wraz ze zwiększeniem dawki leku zmalały wartości obu parametrów. Po pierwszej dobie dozowania diklofenaku w każdym z trzech stężeń widoczny był wzrost ChZT i BZT_5. Przyczyną tego mogła być większa dawka zadozowanego leku. Azot ogólny, w odniesieniu do wartości wskazanych w RMŚ z dnia 18.11.2014r. był przekroczony po pierwszej i ostatniej dobie dozowania analizowanej substancji w stężeniu 5 mg/L, kolejno o 7 i 16 mg/L. W tym czasie również uzyskano najniższy stopień redukcji diklofenaku, wynoszący 53,7%. Powyżej wskazanej w wyżej wymienionym rozporządzeniu wartości, jak i wyniku uzyskanego w stosunku do reaktora wzorcowego R1, znalzał się również parametr fosforu ogólnego, którego wartość rosła wraz ze zwiększającą się dawką leku.

Po zakończeniu III serii badań, w którym eksperyment miał na celu analizę przebiegu redukcji diklofenaku dla odczynu pH ścieków o wartości 6,5, rozpoczęto 4 dniową przerwę w dozowaniu leku. W trakcie jej trwania, obniżono pH w reaktorach do 6,0. Wartość tego parametru była utrzymywana przez cały okres trwania IV cyklu badań. Zmniejsznie odczynu pH o 0,5, według uzyskanych wyników wskazuje na mniejszą redukcję diklofenaku w dawce 1 mg/L o 69,21%. Skuteczność usuwania jest o ponad 18% mniejsza niż przy eksperymencie prowadzonym przy odczynie pH=6,5, mimo, że pozostałość leku była podobnej wielkości. Efektywność degradacji substancji aktywnej dla dawek 5 i 10 mg/L wyniosła kolejno 53%

i 59%. Wartości te były bardzo zbliżone do cyklu poprzedniego w analogicznym czasie i wynosiły odpowiednio 53,7 oraz 56% (rysunek 53). Analiza mikroskopowa przeprowadzona w ostatnim dniu tej serii wskazała, dobre właściwości sedymentacyjne osadu czynnego (tabela 20). Dominowały kłaczki średniej wielkości o jasnobrązowym kolorze. W układzie jednak brak dużego zróżnicowania w obrębie mikroorganizmów. W reaktorze R2 zaobserwowano dwa rodzaje nielicznych orzęsków pełzających i swobodnie pływających: *Aspidisca costata*, *Litonotus sp.* oraz pojedyncze orzęski osiadłe *Opercularia coarctata*. Nielicznie również występowały wiciowce oraz pojedyncze nicienie. Bakterie z grupy nitkowatych oraz wolnopływających również występowały nielicznie. Sucha masa osadu utrzymywała się na średnim poziomie 2,6 – 3,0 g/L. Wartości ChZT i BZT_5 były zgodne z wymaganiami prawnymi, według tabeli II RMŚ Dz.U. z 2014r., poz. 1800 (tabela 15). Zaobserwowano wzrost wartości BZT_5 po pierwszej dobie od zadozowania diklofenaku dla każdego z trzech analizowanych stężeń (ponad dwukrotny wzrost BZT_5 dla stężeń 1 i 10 mg/L oraz 1,5-krotny dla stężenia 5 mg/L). Wartości azotu ogólnego, podczas dozowania dawek 1 i 5 mg/L przekroczyły dopuszczalną przepisami wartość 30 mg/L. Przez okres całej serii badawczej zaobserwowano wysoką wartość fosforu ogólnego. Jego stężenie było 16-krotnie wyższe w stosunku do wartości wskazanej w tabeli II RMŚ. Dz. U. z 2014r., poz. 1800, podczas dozowania diklofenaku w ilości 1,0 mg/L.

Po zakończeniu serii IV, wykonano czterodniową przerwę w dozowaniu diklofenaku. Podczas tego postoju odczyn pH kształtował się naturalnie wobec zachodzących przemian w układzie, bez wykonywania korekty pH. W piątej serii obniżono ilość węgla organicznego w pożywce syntetycznej o 5% w stosunku do ilości węgla w pożywce wyjściowej. Założenie to miało na celu zbadanie czy zredukowana wartość tego pierwiastka, stanowiącego główny składnik pożywki, będzie przez osad czynny rekompensowana przez zawarty w strukturze diklofenaku węgiel organiczny, a tym samym uda się uzyskać większą skuteczność redukcji tego leku. W rezultacie, wyniki skuteczności usuwania substancji czynnej wykazały średnią redukcję związku dla każdej aplikowanej dawki na poziomie około 50%. Z niewielką różnicą procentową, najwyższą skuteczność usuwania diklofenaku uzyskano podczas dozowania najwyższej dawki 10 mg/L. Analiza mikroskopowa wykonana dwa dni przed końcem badań wskazała poprawę w funkcjonowaniu osadu czynnego, w stosunku do cyklu przy pH=6,0 (tabela 20). Odnotowano liczne formy orzęsek pływających *Chilodonella sp.*, a także *Litonotus sp.*, *Spirostomum sp.*, *Stylonychia sp.* oraz liczne orzęski osiadłe *Vorticella convallaria* oraz *Vorticella microstoma*. Ponad do licznie występowały wrotki z gatunków *Cephalodella sp.*, *Lecane sp.*, *Rotaria rotatora* oraz wiciowce *Bodo sp.* i *Peranema sp.*. Dość licznie pojawiły się

także bakterie nitkowate i w niewielkim stopniu bakterie wolnopływające. Struktura kłaczków składała się z drobnych, średnich oraz większych form w kolorze jasnobrązowym. Osad wykazywał dobre zdolności sedymentacyjne. Indeks osadu utrzymywał się na poziomie 100-150mL/g przez cały V cykl badań. Zaobserwowano większy przyrost biomasy o ok. 0,2 g/L po zakończeniu dozowania diklofenaku w stężeniu 10 mg/L w stosunku do stężenia osadu w analogicznym czasie w serii IV (w serii IV- 3,01 g/L, w serii V natomiast – 3,24 g/L) oraz spadek po 4 dobie dozowania leku w stężeniu 1 mg/L (w serii IV stężenie suchej masy wynosiło 2,86 g/L, natomiast w serii V- 2,44 g/L). Wartości ChZT i BZT_5 w odpływie ścieków w tym cyklu badawczym utrzymywały się na podobnym poziomie jak w cyklach III i IV. Odnotowano 20% wzrost wartości BZT_5 po pierwszej dobie od zadozowania diklofenaku w stężeniu 10 mg/L. BZT_5 w dniu startu dozowania leku w stężeniach 1 mg/L oraz 5 mg/L jak i po upływie doby uzyskało zbliżone wartości. Zaobserwowano 50% wzrost wartości ChZT po 4 dobie od zadozowania diklofenaku w stężeniu 5 mg/L oraz wzrost o kolejne 35% po zakończeniu dozowania leku w stężeniu 10 mg/L w stosunku do wartości ChZT uzyskanej po 4-dniowym dozowaniu 1 mg/L analizowanej substancji. Stężenie azotu ogólnego w okresie dozowania diklofenaku o wartości 5 i 10 mg/L przekroczyło dopuszczalny ustawowo próg 30 mg/L (nawet o 20 mg/L w ostatnim dniu analiz). Wartość fosforu ogólnego również znajdowała się powyżej wartości określonych w rozporządzeniu Dz.U. z 2014, poz. 1800 w zakresie wartości związków odprowadzaonych w ściekach z zakładów przemysłowych, w zbliżonych watościach do reaktora wzorcowego R1. Może to prowadzić do wnioski, że wysokie stężenie tego pierwiastka w układzie nie ma związku jedynie z obecnością diklofenaku w reaktorze R2.

W czasie 4 dniowej przerwy, po zakończeniu V serii badań, obniżono stężenie tlenu do wartości w granicach 1,0 mg/L. Ostatnia, szósta seria badawcza została przeprowadzona dodatkowo, jedynie dla wartości stężenia diklofenaku równej 10 mg/L oraz przy obniżonym poziomie stężeniu tlenu 1,0 mgO_2/L. Ze względu na fakt, że intencją przeprowadzonych badań była analiza ścieków z przemysłu farmaceutycznego odprowadzających wraz ze ściekami poprodukcyjnymi wysokie ilości związków lekowych, tę serię badawczą przeprowadzono dla stężenia diklofenaku wynoszącego 10 mg/L. Uzyskane w poprzednich seriach badawczych wyniki, wskazujące na zdolność do rozkładu przez mikroorganizmy osadu czynnego wytypowanego leku, dodatkowo potwierdziły wybór tej dawki stężenia leku. W tym cyklu badań zaobserwowano redukcję diklofenaku na poziomie 61,44%. W ostatnim dniu cyklu badawczego analiza mikroskopowa wskazała liczną obecność orzęsek swobodnie pływających *Colpidium colpoda* oraz *Uronema sp.*a także pojedyncze formy orzęsek pływających

Carchesium polypinum oraz *Vorticella microstoma* (tabela 20). Obecne w osadzie były również wiciowce z dominującym gatunkiem *Rotaria rotatora*. Dość licznie zaobserwowano wiciowce *Bodo sp.* oraz korzenionóżki *Arcella sp.* Wśród bakterii dominowały liczne formy nitkowatych, a także pojawiły się pojedyncze formy niesporczaków i nicieni. W strukturze kłaczków widoczne były drobne, średnie i duże formy w kolorze jasnobrązowym. W zakresie analizowanych parametrów, ChZT i BZT_5 znajdowały się w granicach ustalonych w rozporządzeniu. Przekroczone zostały wartości azotu ogólnego. Stężenie fosforu ogólnego, mimo przekroczonych wartości dopuszczalnych, wahały się na poziomie 4-5 mgP/L (z wyjątkiem pierwszego dnia testu – 11 mg/L) i było najniższe spośród przeprowadzonych serii badawczych, na poziomie podobym, jak w reaktorze R1.

Aktualnie nie ma regulacji prawnych wskazujących dopuszczalne wartości dla określonych rodzajów substancji czynnych leków w ściekach poprodukcyjnych, odprowadzanych z zakładów farmaceutycznych bezpośrednio do miejskiej sieci kanalizacyjnej. W pracy podjęto próbę oceny wartości wybranych wskaźników zanieczyszczeń, takich jak: fosfor ogólny, azot ogólny, ChZT, BZT_5, azot azotynowy, analizowanych w odpływie z bioreaktora R2, do którego dozowano diklofenak w oparciu o tabelę II załącznika nr 4 Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014r. *w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzeniu ścieków do wód lub do ziemi oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego* [Dz.U. z 2014r. poz. 1800], określającą najwyższe dopuszczalne wartości wybranych wskaźników zanieczyszczeń dla różnych sektorów przemysłowych, odprowadzających ścieki bezpośrednio do wód i gleby. W tabeli nr 15 zaprezentowano wybrane do analiz wartości wskaźników zanieczyszczeń oraz odpowiadające im dopuszczalne wartości wskazane w rozporządzeniu [Dz.U. z 2014r., poz. 1800].

Tabela 15. Wartości dopuszczalne wybranych wskaźników zanieczyszczeń na podstawie [Dz.U. z 2014r., poz. 1800]

Nazwa wskaźnika	Jednostka	Najwyższa dopuszczalna wartość
pH	-	6,5 – 9,0
BZT_5	mgO_2/L	25
ChZT	mgO_2/L	125
Azot amonowy	mgN_{NH4}/L	10
Azot azotanowy	mgN_{N03}/L	30
Azot azotynowy	mgN_{NO2}/L	1
Azot ogólny	mgN_{og}/L	30
Fosfor ogólny	mgP_{og}/L	3

W poniższej tabeli 16 przedstawiono wyniki średnich wartości parametrów ChZT, BZT5, Nog, Pog oraz stopnia redukcji diklofenaku oznaczone w bioreaktorze R2, do którego dozowano analizowaną substancję czynną i porównano je z wartościami przedstawionymi w tabeli II obrazującej dopuszczalne wartości wskazanych parametów obowiązujących różne sektory przemysłowe odprowadzające ścieki poprodukcyjne do wód lub gruntów. Przekroczone wartości parametrów zaznaczono poprzez ich pogrubienie.

Tabela 16. Zestawienie przekroczeń dopuszczalnych wskaźników zanieczyszczeń przez osad czynny w obecności diklofenaku wg załącznika 4, tabeli 1 Dz. U. z 2014, poz. 1800

Cykl	Dozowane stężenie diklofenaku [mg/L]	Dzień analizy	średnia wartość ChZT [mgO_2/L]	średnia wartość BZT_5[mgO_2/L]	średnia wartość N_{og} [mg/L]	średnia wartość P_{og} [mg/L]	analiza mikrobiologiczna	stopień redukcji diklofenaku [%]
I	1 mg/L	66	43,75 mgO_2/L	3,3 mgO_2/L	**60,50 mg/L**	**8,55 mg/L**	kłaczki małe i średniej wielkości, kolor jasnobrązowy, wysoki indeks osadu, widoczna flotacja	95,91%
I	5 mg/L	70	30,70 mgO_2/L	b.d.	**60,83 mg/L,**	**10,9 mg/L**		62,51%
I	10 mg/L	74	55,09 mgO_2/L	4,3 mgO_2/L	**51,03 mg/L**	**13,2 mg/L**		72,99%
II	1 mg/L	82	24,56 mgO_2/	2,7 mgO_2/L	**50,25 mg/L**	**11,0 mg/L**	kłaczki średniej wielkości, kolor jasnobrązowy, wysoki indeks osadu	62,64%
II	5 mg/L	86	67,72 mgO_2/L	3,4 mgO_2/L	**50,83 mg/L**	**10,1 mg/L**		54,32%
II	10 mg/L	95	20,09 mgO_2/L	2,5 mgO_2/L	25,00 mg/L	**7,5 mg/L**		56,63%
III	1 mg/L	103	20,0 mgO_2/L	3,3 mgO_2/L	28,50 mg/L	**9,7 mg/L**	kłaczki drobnej i średniej wielkości, nieliczne formy nitkowate, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje	87,92%
III	5 mg/L	107	10,09 mgO_2/L	1,2 mgO_2/L	**46,00 mg/L**	**10,3 mg/L**		53,68%
III	10 mg/L	111	b.d.	4,1 mgO_2/L	**31,25 mg/L**	**11,7 mg/L**		55,86%
IV	1 mg/L	119	14,47 mgO_2/L	6,00 mgO_2/L	**54,75 mg/L**	**11,8 mg/L**	kłaczki głównie średniej wielkości, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje	69,21%
IV	5 mg/L	123	16,23 mgO_2/L	2,5 mgO_2/L	**37,75 mg/L**	**10,9 mg/L**		52,95%
IV	10 mg/L	127	b.d.	b.d.	**30,42 mg/L**	**11,8 mg/L**		59,09%
V	1 mg/L	135	11,05 mgO_2/L	2,9 mgO_2/L	**41,08 mg/L**	**10,7 mg/L**	kłaczki drobne, średnie oraz większe, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje	55,71%
V	5 mg/L	139	20,18 mgO_2/L	2,8 mgO_2/L	**46,83 mg/L**	**10,9 mg/L**		50,27%
V	10 mg/L	142	b.d.	mgO_2/L	b.d.	b.d		58,27%
VI	10 mg/L	150	13,68 mgO_2/L	2,1 mgO_2/L	37,08 mg/L	4,9 mg/L	kłaczki drobne, średnie, duże, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje	61,44%

Oprócz wyżej przywołanego aktu prawnego, obecnie obowiązującym w kwestii określenia składu ścieków przemysłowych, jakie mogą zostać odprowadzone do urządzeń kanalizacyjnych jest Rozporządzenie Ministra Budownictwa z dnia 14 lipca 2006r. *w sprawie sposobu realizacji obowiązków dostawców ścieków przemysłowych oraz warunków wprowadzania ścieków do urządzeń kanalizacyjnych* [Dz. U. z 2016r., poz. 1757]. Przywołany akt prawny nie określa sprecyzowanych wartości dopuszczalnych parametrów ChZT, BZT_5, fosforu ogólnego. Rozporządzenie wskazuje, że po stronie odbiorcy ścieków pozostaje ustalenie konkretnych wartości wskaźników m.in. BZT_5, ChZT, F_{og}, na podstawie dopuszczalnego obciążenia oczyszczalni ładunkiem tych zanieczyszczeń.

Przypuszcza się, że ładunek zanieczyszczeń analizowanych związków farmaceutycznych, szacowany na podstawie rzeczywistych wyników zawartości leków w ściekach odprowadzanych z badanych zakładów farmaceutycznych jest niewielki w stosunku do średniej wartości ładunków tych związków dopływających do COŚ w Koziegłowach. Według jednak doniesień literaturowych, ścieki pochodzące z zakładów farmaceutycznych generują ładunki ChZT na poziomie 1000-1000 mg/L oraz BZT_5 od 500-6000 mg/L [Saleem M., 2007, Melero J.A. i in., 2009, Gadipelly Ch. i in., 2014, Li X. i in., 2015]. Wartości tych parametrów są zbliżone lub nawet przekraczają stężenia ścieków komunalnych docierających do miejskich oczyszczalni ścieków. Może to sugerować, że ścieki pochodzące z dużych zakładów farmaceutycznych stanowią znaczący ładunek zanieczyszczeń lekowych wprowadzanych do miejskich oczyszczalni ścieków. Skład produktu farmaceutycznego zawiera w sobie substancję czynną leku oraz substancje pomocnicze, których głównym celem jest utrwalenie i zachowanie wyjściowej postaci leku do momentu jego spożycia. Oba składniki posiadają określony ładunek ChZT i BZT_5. Nie jest jednak znana proporcja pomiędzy tymi związkami zawarta w wyjściowym produkcie leczniczym (np. w postaci tabletki, czy maści), stąd nie można jednoznacznie określić, jaki procent ładunku zanieczyszczeń stanowi postać wyjściowa leku, która w założeniu badań stanowi trudno rozkładalną substancję toksyczną. Brak również informacji na temat wielkości ładunku substancji pomocniczych, ich podatności na usuwanie za pomocą osadu czynnego. Dostępne więc dane literaturowe nie pozwalają w sposób jednoznaczny określić rzeczywistego ładunku zanieczyszczeń substancji aktywnych leków, pochodzących z zakładów farmaceutycznych, dopływających do miejskich sieci kanalizacyjnej.

Morfologia osadu czynnego

W pierwszych dwóch cyklach badań skład osadu czynnego oraz morfologia kłaczków w reaktorze R2 była zbliżona do układu R1. Najwyższą redukcję diklofenaku, dla każdego z trzech dozowanych stężeń tego leku, zaobserwowano w pierwszym cyklu badań, przy średnim odczynie pH = 6,7 (uzyskany stopień redukcji wynosił 95% i wystąpił po zakończeniu dozowania diklofenaku w stężeniu 1 mg/L). Przyczyną tak wysokiego, niespotykanego dotychczas w literaturze stopnia redukcji tego związku, uzyskanego za pomocą osadu czynnego może być charakter kwasowy diklofenaku (stała kwasowa diklofenaku pK_a wynosi 4 [https://chemicalize.com, odczyt 09.2017]). Sugeruje to, że forma zjonizowana tego związku farmaceutycznego występująca dla odczynu pH > 4 umożliwia mikroorganizmom łatwiejsze przyswajanie badanego farmaceutyku. Wysoki procent usuwania leku w stosunku do pozostałych serii badawczych mógł być spowodowany również brakiem pozostałości

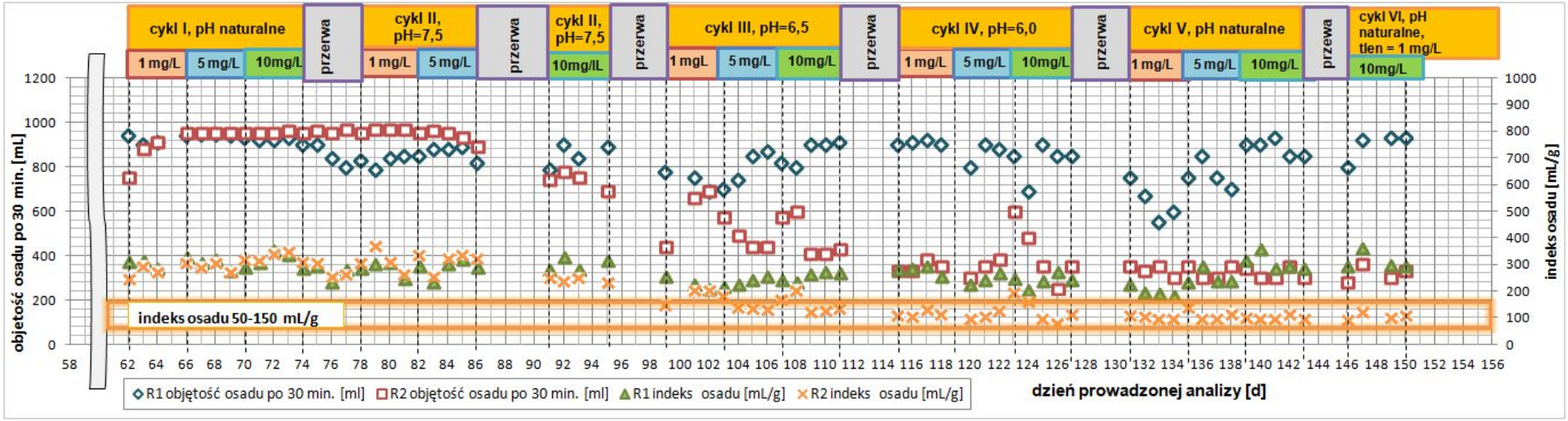
diklofenaku z poprzednich serii badawczych. W II cyklu badań, przy zachowaniu w bioreaktorach odczynu pH na poziomie 7,5, redukcja diklofenaku w układzie R2 osiągnęła niższe w stosunku do cyklu I wartości, w granicach 54-62%. W tej serii badawczej zaobserwowano także wzrost bakterii nitkowatych w stosunku do reaktora R1, które mogły zahamować rozkład analizowanego leku.

Spadek liczby bakterii nitkowatych w reaktorze R2 został zaobserwowany w cyklach III oraz IV, przy niższych wartościach odczynu pH, na poziomie odpowiednio 6,5 oraz 6,0. W obu seriach pomiarowych stopień redukcji diklofenaku był wyższy niż w cyklu II, dla trzech analizowanych stężeń leku. Najwyższa skuteczność usuwania farmaceutyku została osiągnięta dla stężenia 1 mg/L (w cyklu III – 87,9%, natomiast w cyklu IV – 69,2%).

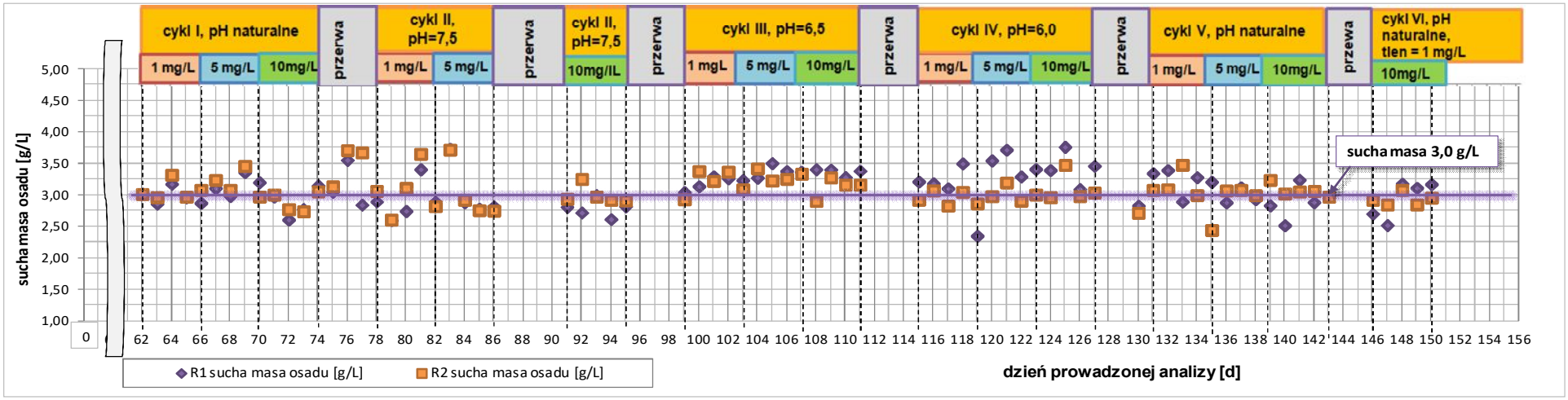
W reaktorze R2, cyklach III, IV oraz V zaobserwowano mniejszą ilość bakterii nitkowatych, w stosunku do reaktora R1, do którego nie dozowano diklofenaku. W tym okresie badań, osad czynny w reatorze R2 charakteryzował się dobrą sedymentacją oraz indeksem osadu w granicach 50-150mL/g. W cyklu III i IV, w których odczyn pH utrzymywany był na poziomie 6,5 oraz 6,0 zaobserwowano wysoką wartość redukcji diklofenaku dozowanego w stężeniu 1,0 mg/L (dla cyklu III – 87,9%, dla cyklu IV – 69,2%).

Mimo, ze stopień redukcji diklofenaku osiągnął najniższą wartość w cyklu V (przeprowadzonym przy naturalnym odczynie pH osadu oraz obniżonej ilości węgla w ściekach syntetycznych), zaobserwowano większą liczbę wrotek i orzęsek, oraz niewielką ilość wiciowców i ameb, w stosunku do reaktora R1. Prowadzi to do wniosku, że diklofenak nie działa toksycznie na osad czynny oraz może stanowić źródło węgla przyczyniające się do wzrostu wybranych rodzajów mikroorganizmów, jednak niecałkowicie przystowowanych do usuwania tego rodzaju substancji lekowej. W obecności diklofenaku kłaczki osadu czynnego tworzyły drobne, średnie oraz większe skupiska umożliwiające dobrą sedymentację osadu czynnego.

W obu reaktorach, podczas całego cyklu badań zaobserwowano nieliczne formy lub brak bakterii zooglealnych, co mogło ograniczać rozkład związków organicznych, w tym także trudno rozkładalnych, zawartych w strukturze dozowanego diklofenaku.

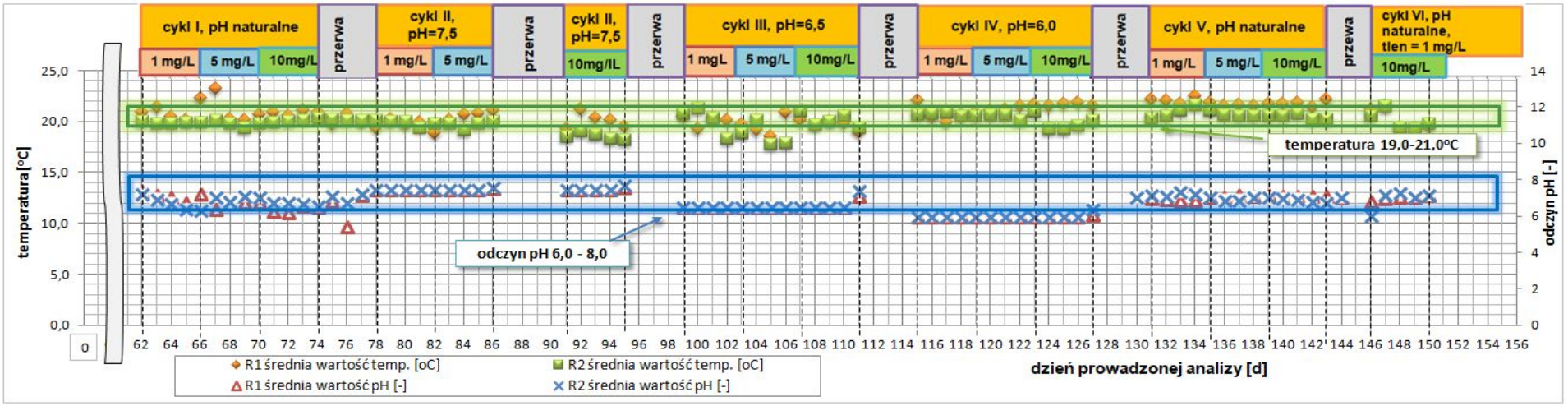


Rysunek 41. Średnia objętość osadu po 30 min. zagęszczaniu w cylindrze oraz obliczonej wartości indeksu osadu w bioreaktorach w okresie dozowania diklofenaku*

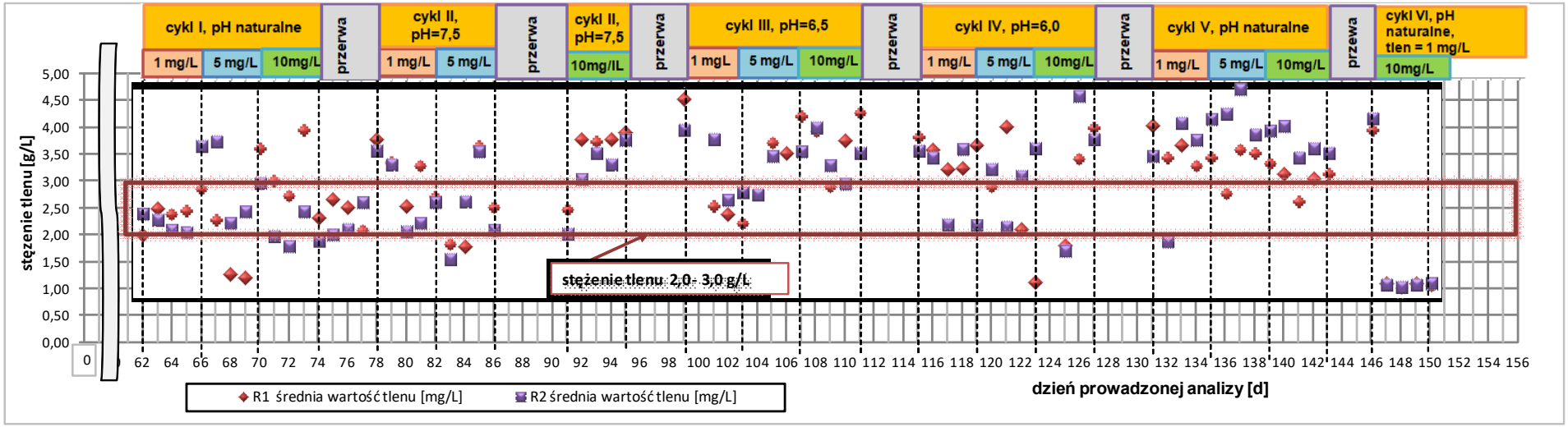


Rysunek 42. Sucha masa osadu w bioreaktorach w okresie dozowania diklofenaku*

*** R1 – bioreaktor wzorcowy, brak dozowania diklofenaku, R2 – bioreaktor, do którego dozowano diklofenak**

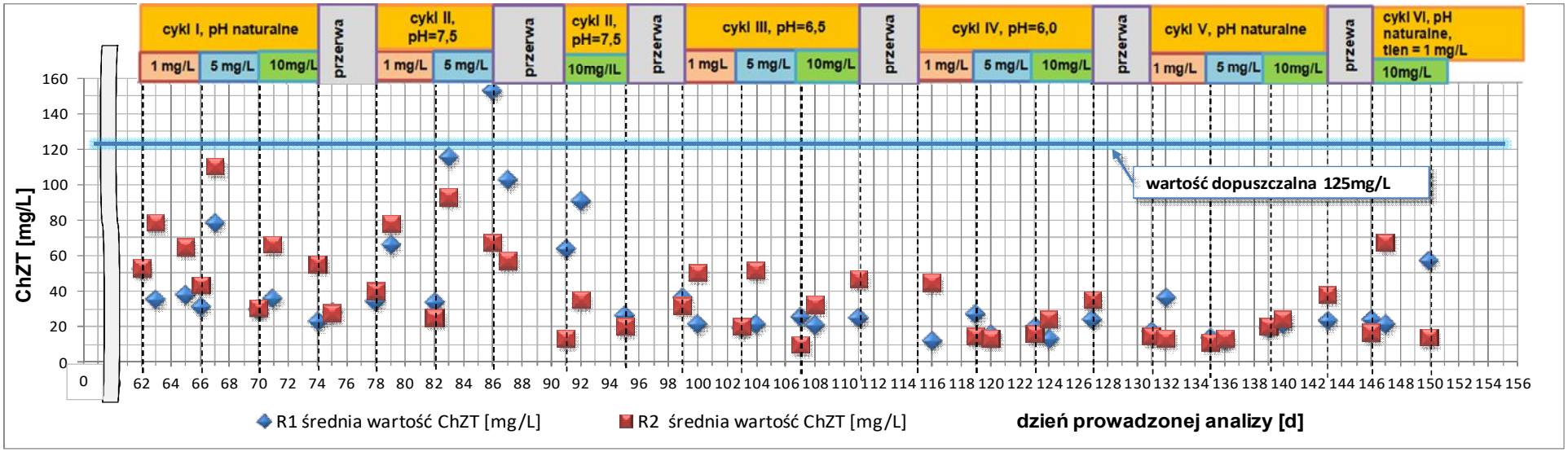


Rysunek 43. Średnia temperatura oraz średnia wartość odczynu pH w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

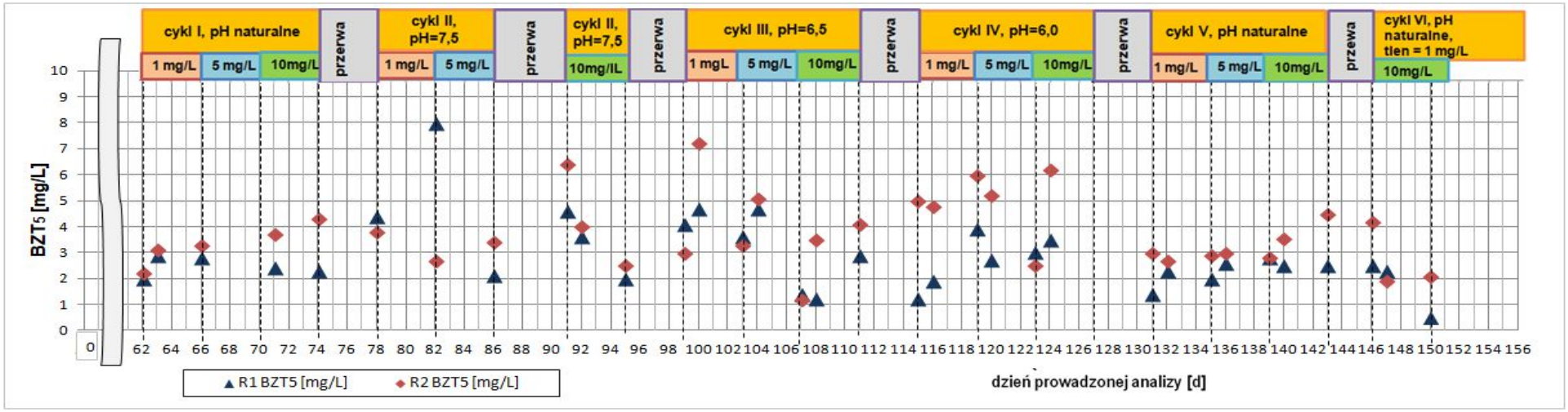


Rysunek 44. Średnia wartość tlenu w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

***R1 – bioreaktor wzorcowy, brak dozowania diklofenaku, R2 – bioreaktor, do którego dozowano diklofenak**

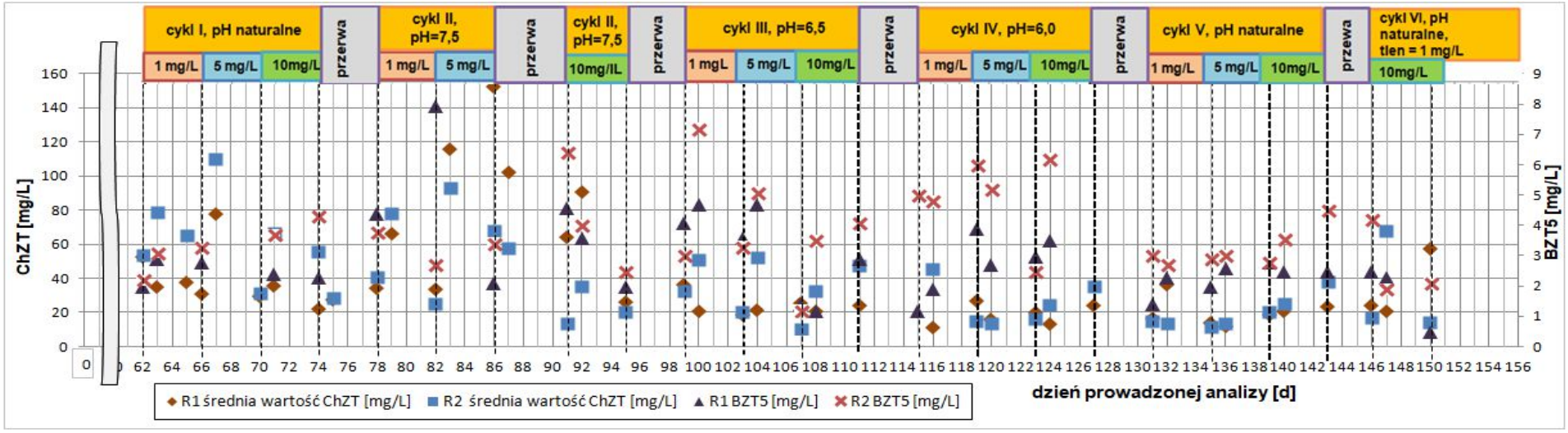


Rysunek 45. Wartość ChZT w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

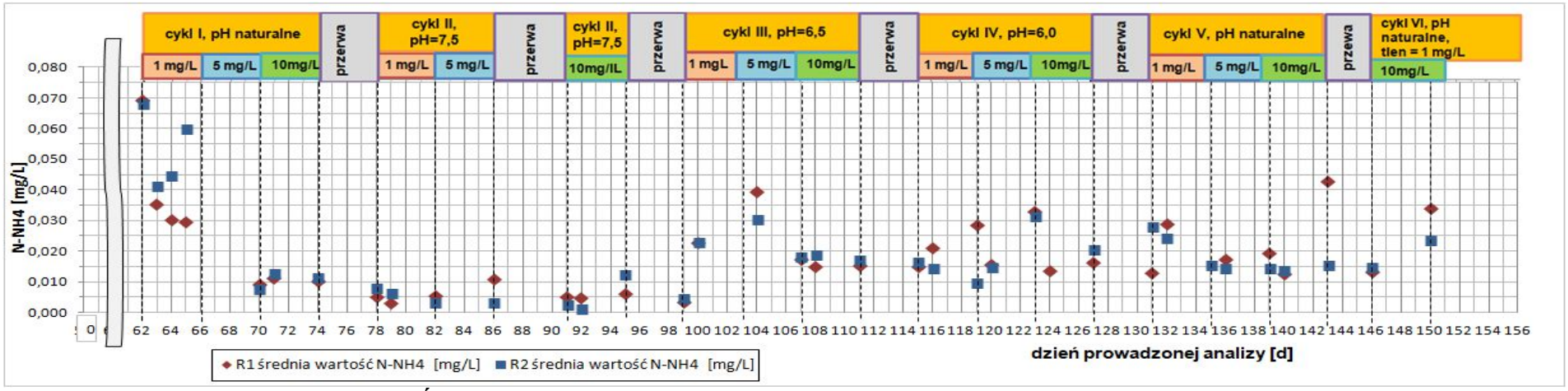


Rysunek 46. Wartość BZT5 w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

***R1 – bioreaktor wzorcowy, brak dozowania diklofenaku, R2 – bioreaktor, do którego dozowano diklofenak**

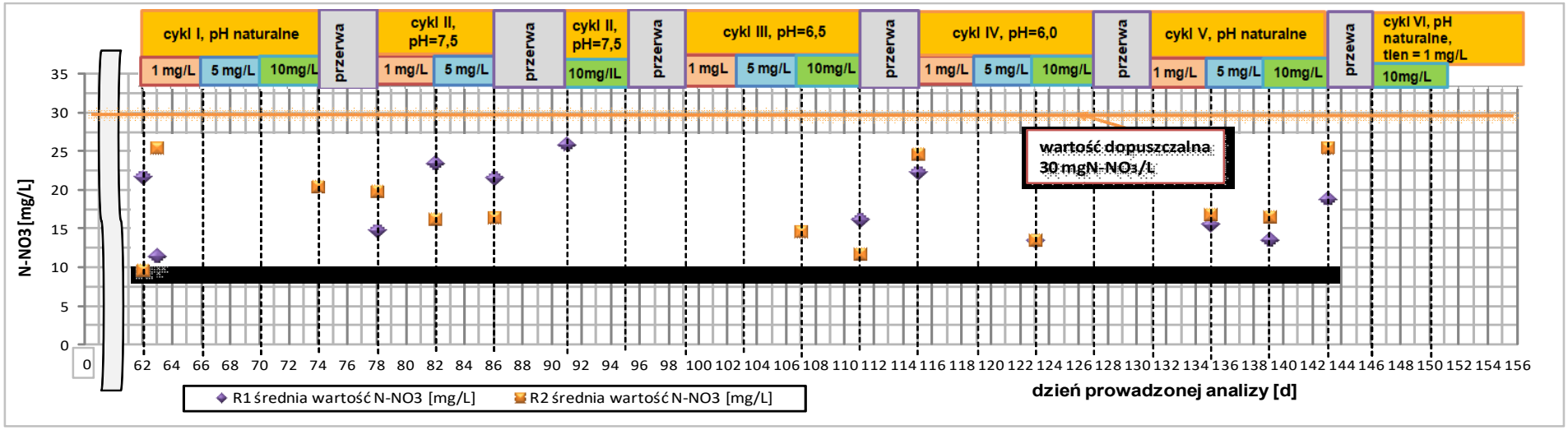


Rysunek 47. Wartość ChZT oraz BZT5 w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

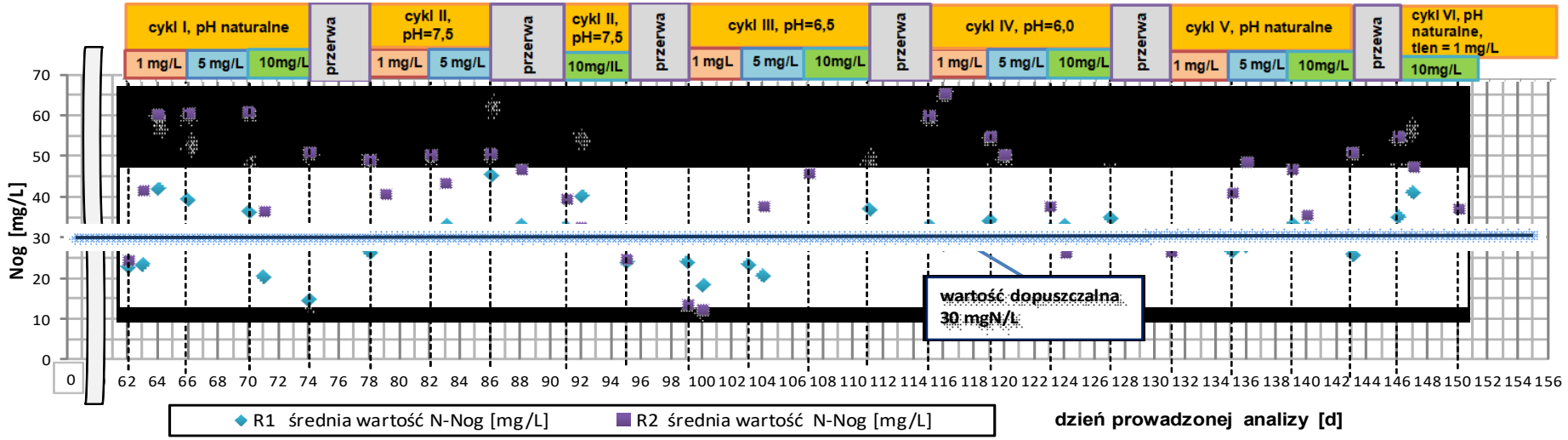


Rysunek 48. Średnie wartości N-NH4 w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

***R1 – bioreaktor wzorcowy, brak dozowania diklofenaku, R2 – bioreaktor, do którego dozowano diklofenak**

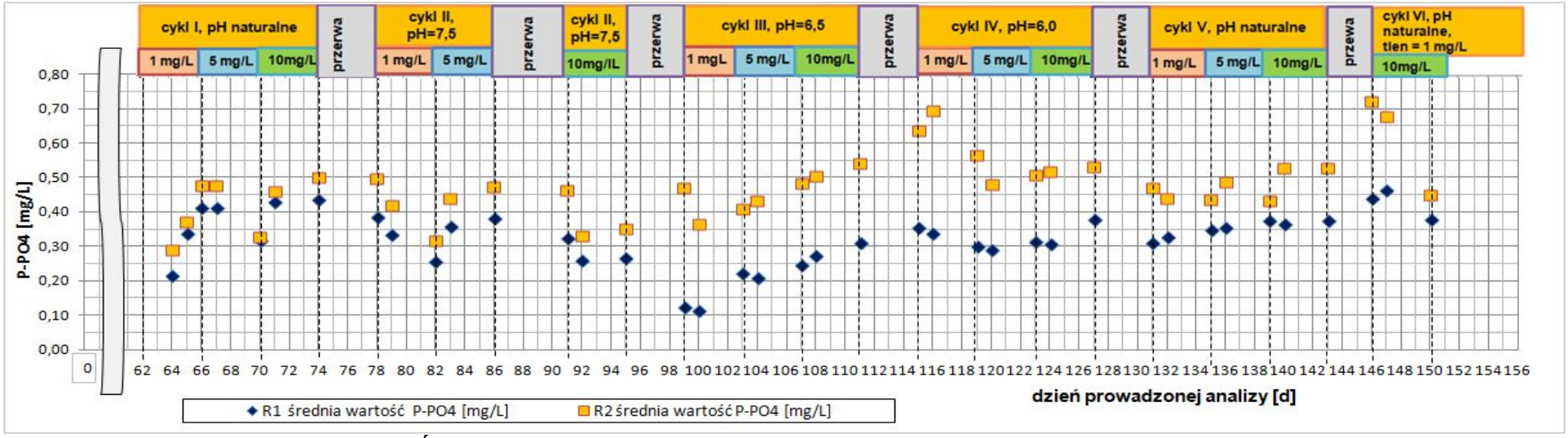


Rysunek 49. Średnie wartości N-NO3 w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

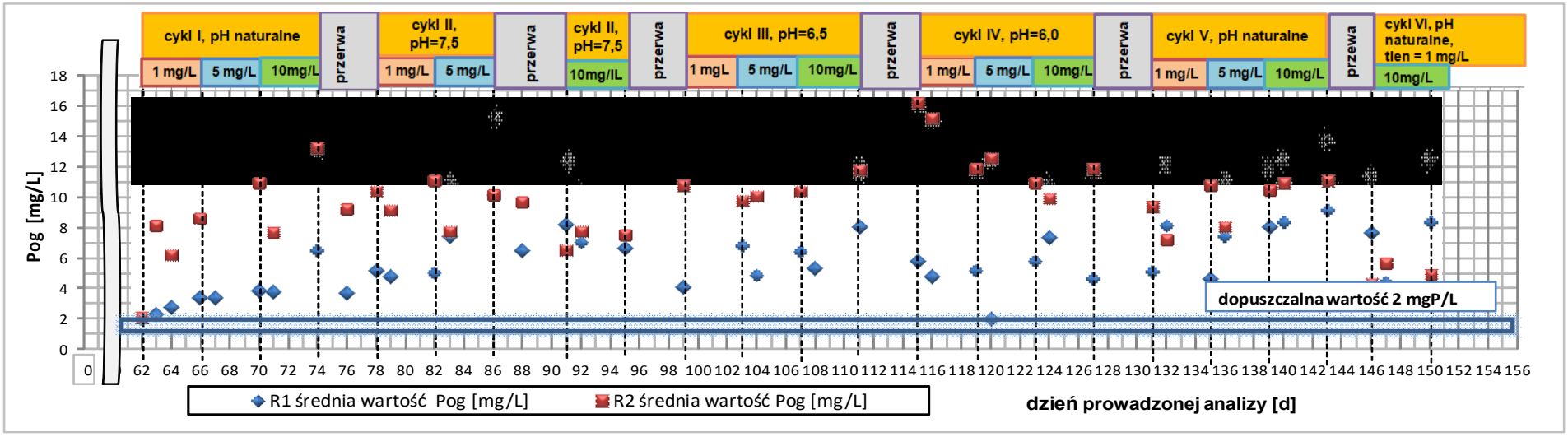


Rysunek 50. Średnie wartości N-Nog w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

***R1 – bioreaktor wzorcowy, brak dozowania diklofenaku, R2 – bioreaktor, do którego dozowano diklofenak**

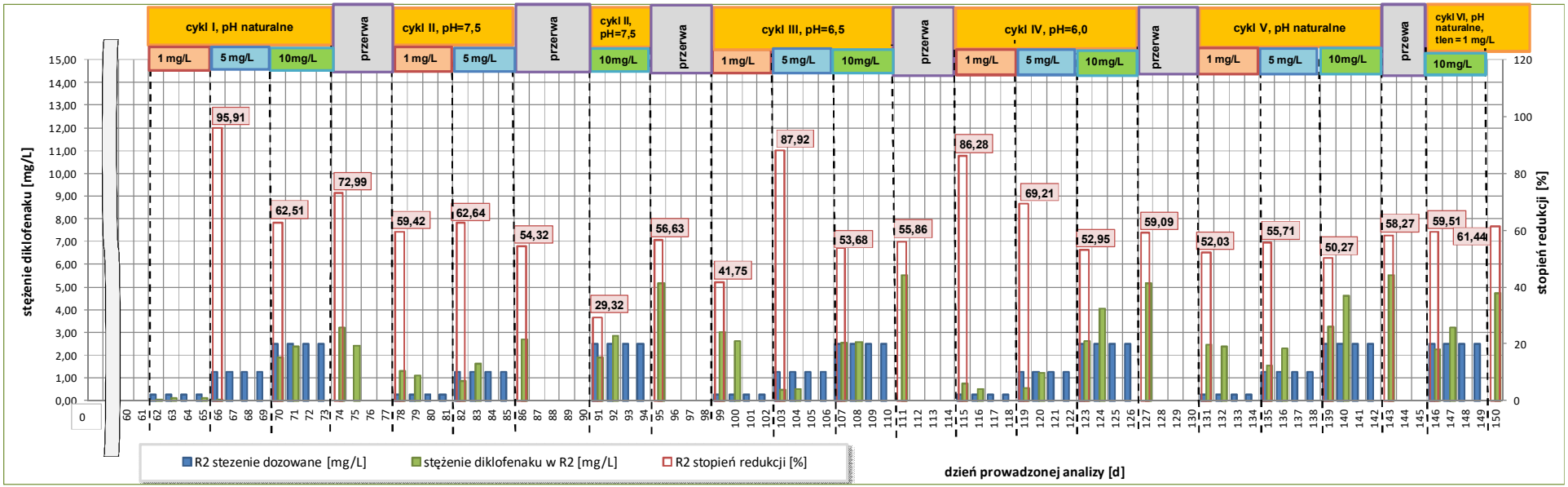


Rysunek 51. Średnie wartości P-PO4 w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

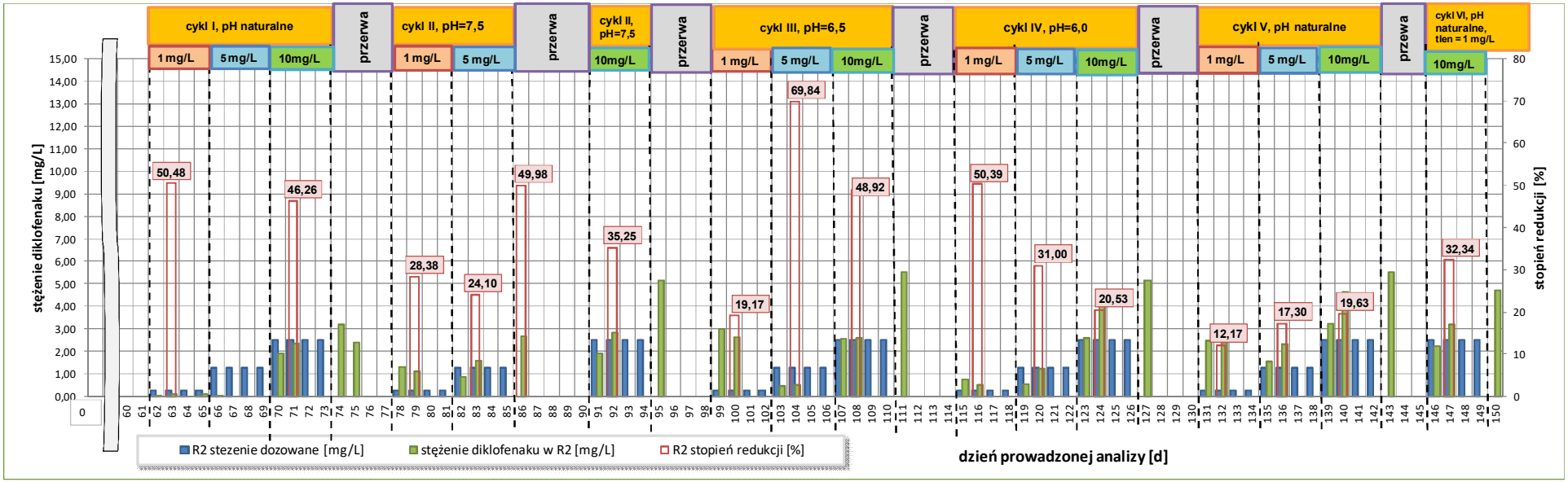


Rysunek 52. Średnie wartości P-Pog w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku*

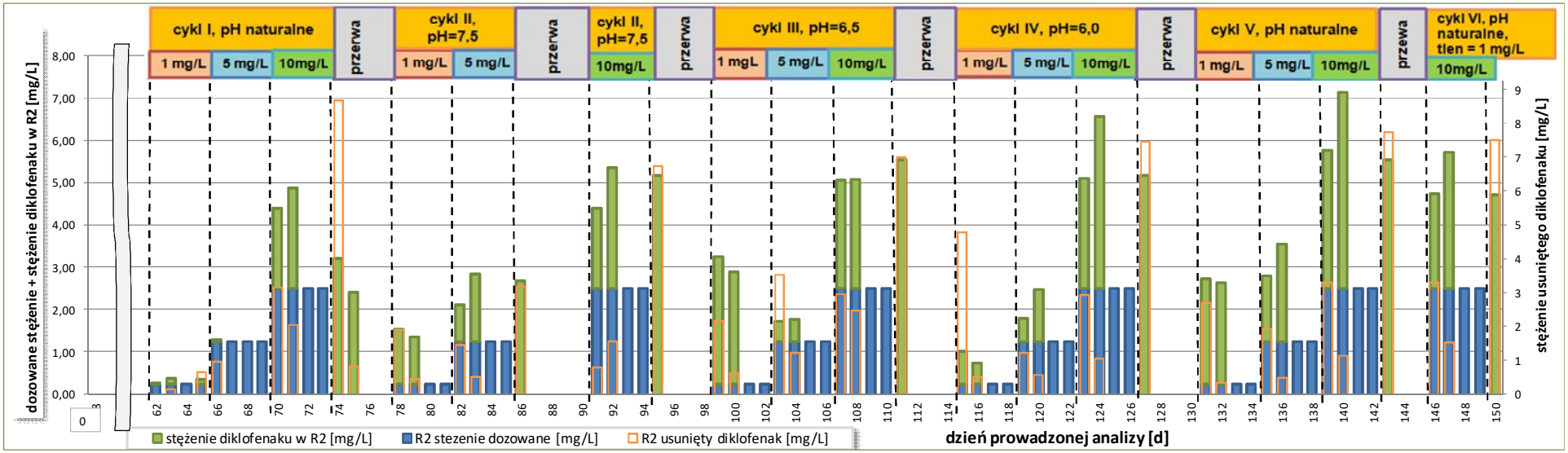
***R1 – bioreaktor wzorcowy, brak dozowania diklofenaku, R2 – bioreaktor, do którego dozowano diklofenak**



Rysunek 53. Stopień redukcji diklofenaku po 4 dobach od zadozowania określonej dawki leku w bioreaktorze R2, we wszystkich analizowanych seriach badawczych



Rysunek 54. Stopień redukcji diklofenaku po 1 dobie od zadozowania określonej dawki leku w bioreaktorze R2 we wszystkich analizowanych seriach badawczych



Rysunek 55. Stężenie usuniętego diklofenaku w stosunku do dozowanej dawki leku wraz z jego pozostałością w reaktorze R2

Tabela 17. Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego w reaktorach R1 i R2 w wybranych dniach prowadzonego testu dynamicznego (okres wpracowania, okres od 1 do 34 dnia testu)

Dzień prowadzonej analizy	Organizmy																																				
	Reaktor	Bakterie			Pierwotniaki																										Robaki				Inne	Uwagi
					wiciowce *Flagellata*		korzenionóżki *Rhizopoda*			orzęski / *Ciliata*																				wrotki *Rotatora*			nicienie *Nematoda*		
		wolnopływające	typu zooglea	nitkowate	*Bodo sp.*	*Peranema sp.*	*Arcella sp.*	*Amoeba proteus*	*Euglypha sp.*	*Aniceta sp.*	*Aspidisca costata*	*Carchesium polypinum*	*Chilodonella sp.*	*Colpidium colpoda*	*Epistylis chrysemydis*	*Epistylis lacustris*	*Epistylis plicatilis*	*Epistylis rotans*	*Glaucoma sp.*	*Litonotus sp.*	*Opercularia coarctata*	*Paramecium bursaria*	*Paramecium caudatum*	*Spirostomum sp.*	*Stylonychia sp.*	*Tokophrya sp.*	*Uronema sp.*	*Vorticella campanula*	*Vorticella convallaria*	*Vorticella microstoma*	*Cephalodella sp.*	*Lecane sp.*	*Rotaria rotatora*		Niesporczaki *Tardigrada*	
1-13	R1	BL		NL			P				L	P				P									P			P	DL		P		P			kłaczki drobne, kolor jasno brązowy, osad dobrze sedymentuje
1-13	R2	DL		NL			P				DL		P			P			P		P							P		P		P			kłaczki drobne, kolor jasno brązowy, osad dobrze sedymentuje
20	R1	NL		P			P				NL	NL				P			P			P	NL	P	P			NL	NL	NL			P			kłaczki drobne, kolor jasno brązowy, osad dobrze sedymentuje
20	R2	NL	NL	P			P				P	P+S				P				P		P						P		P+ S		P	P		P	kłaczki drobne, kolor jasno brązowy z ciemnymi fragmentami, osad dobrze sedymentuje
27	R1	NL	NL	DL			P												P			P	NL	P	DL				P	P		P	P			kłaczki bardzo drobne, kolor lekko ciemny brązowy, osad dobrze sedymentuje
27	R2	NL	NL	DL		P	P													P		P							P				P	P			kłaczki raczej drobne, kolor ciemny brązowy, osad dobrze sedymentuje
34	R1	L	NL	DL			P				P								P										P	P			P	P			większe skupiska kłaczków, kolor jasny brązowy, osad słabo sedymentuje
34	R2	DL	NL	DL			P				P	DL								DL			P		P				DL	P+ S			P	P			kłaczki drobne+ skupiska, kolor ciemny brązowy, dobrze sedymentuje

Oznaczenia: P – pojedyncze, **S** – skupiska, **NL** – niezbyt liczne, **DL** – dość liczne, **SL** –średnio liczne **L** – liczne, **BL** – bardzo liczne

Tabela 18. Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego w reaktorach R1 i R2 w wybranych dniach prowadzonego testu dynamicznego (okres wpracowania i pierwszy dzień po zadozowaniu diklofenaku do reaktora R2)

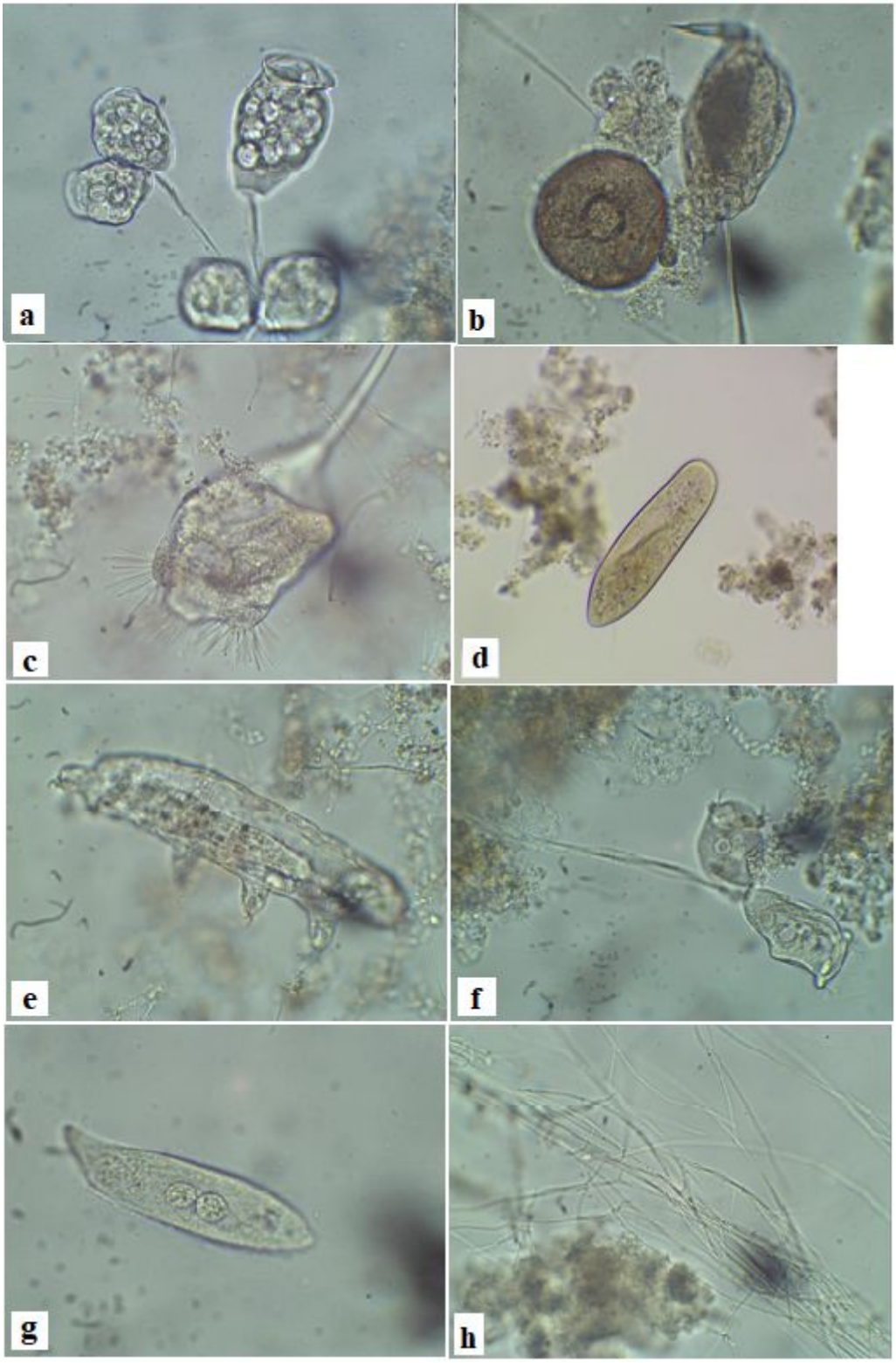
Dzień prowadzonej analizy	Organizmy																																				
	Reaktor	Bakterie			Pierwotniaki																										Robaki				Inne	Uwagi
					wiciowce *Flagellata*		korzenionóżki *Rhizopoda*			orzęski / *Ciliata*																				wrotki *Rotatora*			nicienie *Nematoda*		
		wolnopływające	typu zooglea	nitkowate	*Bodo sp.*	*Peranema sp.*	*Arcella sp.*	*Amoeba proteus*	*Euglypha sp.*	*Aniceta sp.*	*Aspidisca costata*	*Carchesium polypinum*	*Chilodonella sp.*	*Colpidium colpoda*	*Epistylis chrysemydis*	*Epistylis lacustris*	*Epistylis plicatilis*	*Epistylis rotans*	*Glaucoma sp.*	*Litonotus sp.*	*Opercularia coarctata*	*Paramecium bursaria*	*Paramecium caudatum*	*Spirostomum sp.*	*Stylonychia sp.*	*Tokophrya sp.*	*Uronema sp.*	*Vorticella campanula*	*Vorticella convallaria*	*Vorticella microstoma*	*Cephalodella sp.*	*Lecane sp.*	*Rotaria rotatora*		Niesporczaki *Tardigrada*	
42	R1	DL		DL	P		P						P										P		P					P	P	P			większe skupiska kłaczków, dość jasne, osad słabo sedymentuje
42	R2	NL		DL	P		P					P								P	P				P			P	P	P		P					kłaczki drobne + skupiska, nieco ciemniejszy kolor, dobrze sedymentuje
50	R1	NL		NL	P	P	P						P												P			P		P	DL	P			kłaczki drobne, kolor jasno i ciemnobrązowy, osad słabo sedymentuje
50	R2	NL		NL	P		P					P											P		P			P	P	P			P				kłaczki drobne + skupiska, dominuje kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
56	R1	NL		P	P	P	P					P							P				P		P			P	P	P	P	DL	P	P			kłaczki drobne + większe skupiska, kolor ciemnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
56	R2	NL		L			P					P				P							P					P				P	P	P			kłaczki drobne+ większe skupiska, kolor ciemnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
63	R1	NL		NL		P	P					P											P		P			P	P			P	P				kłaczki drobne i średnie, dominuje kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
63	R2	NL		DL		P	P				P	P											P		P				P			P	P				kłaczki średniej wielkości, dominuje kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje

Tabela 19. Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego w reaktorach R1 i R2 w wybranych dniach prowadzonego testu dynamicznego (okres dozowania 10mg/L I serii badawczej oraz cykl II badań)

Dzień prowadzonej analizy	Organizmy																																			Uwagi
	Reaktor	Bakterie			Pierwotniaki																										Robaki				Inne	
		wolnopływające	typu zooglea	nitkowate	wiciowce *Flagellata*		korzenionóżki *Rhizopoda*			orzęski / *Ciliata*																				wrotki *Rotatora*			nicienie *Nematoda*	Niesporczaki *Tardigrada*	
					Bodo sp.	*Peranema sp.*	*Arcella sp.*	*Amoeba proteus*	*Euglypha sp.*	*Aniceta sp.*	*Aspidisca costata*	*Carchesium polypinum*	*Chilodonella sp.*	*Colpidium colpoda*	*Epistylis chrysemydis*	*Epistylis lacustris*	*Epistylis plicatilis*	*Epistylis rotans*	*Glaucoma sp.*	*Litonotus sp.*	*Opercularia coarctata*	*Paramecium bursaria*	*Paramecium caudatum*	*Spirostomum sp.*	*Stylonychia sp.*	*Tokophrya sp.*	*Uronema sp.*	*Vorticella campanula*	*Vorticella convallaria*	*Vorticella microstoma*	*Cephalodella sp.*	*Lecane sp.*	*Rotaria rotatora*			
70	R1	P		DL			P	P	P									P					P		P						P					kłaczki drobne i średnie, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje,
70	R2	NL		DL	P	P	P					P								P				P					P			P	P			kłaczki małe i średniej wielkości, kolor jasnobrązowy, wysoki indeks osadu, widoczna flotacja osadu
77	R1	NL		L	P		P	P	P		P	P												P				P	P	P	P	P	P			kłaczki drobne+średniej wielkości, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
77	R2	NL		DL	P	P	P		P											P				P						P		P	P			kłaczki średniej wielkości, dość jasne, osad dobrze sedymentuje
84	R1	NL		NL	P		P	P			P	P				P						DL							P	DL	DL	DL				kłaczki drobne i średniej wielkości, ciemniejszy kolor brązowy, osad dobrze sedymentuje
84	R2	NL		DL	P		P				P	P										DL							P	NL	NL	NL	P			kłaczki drobne i średniej wielkości, kolor ciemnobrązowy, osad dość dobrze sedymentuje
91	R1	NL		NL	P		P	P	P		P	P		P		P						DL			P				P	P	P	L	P	P		kłaczki drobne i średniej wielkości, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
91	R2	NL		DL	P		P		P		P	P		P		P				P	P	DL						P		P	P	L				kłaczki średniej wielkości, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje

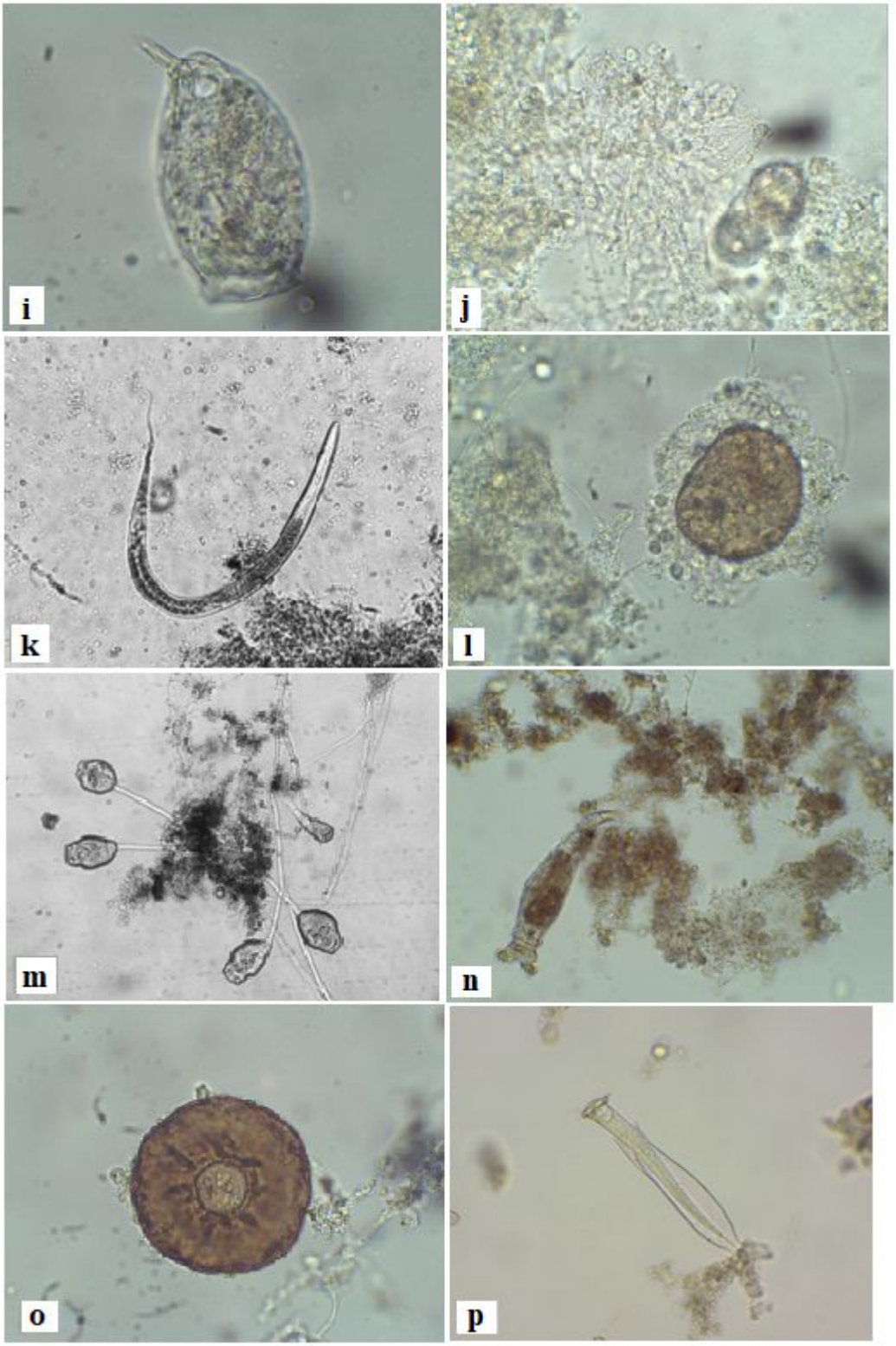
Tabela 20. Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego w reaktorach R1 i R2 w wybranych dniach prowadzonego testu dynamicznego (okres dozowania diklofenaku w cyklach od III do VI)

Dzień prowadzonej analizy	Organizmy																																			Uwagi
	Reaktor	Bakterie			Pierwotniaki																										Robaki				Inne	
					wiciowce *Flagellata*		korzenionóżki *Rhizopoda*			orzęski / *Ciliata*																			wrotki *Rotatora*			nicienie *Nematoda*	Niesporczaki *Tardigrada*	
		wolnopływające	typu zooglea	nitkowate	*Bodo sp.*	*Peranema sp.*	*Arcella sp.*	*Amoeba proteus*	*Euglypha sp.*	*Aniceta sp.*	*Aspidisca costata*	*Carchesium polypinum*	*Chilodonella sp.*	*Colpidium colpoda*	*Epistylis chrysemydis*	*Epistylis lacustris*	*Epistylis plicatilis*	*Epistylis rotans*	*Glaucoma sp.*	*Litonotus sp.*	*Opercularia coarctata*	*Paramecium bursaria*	*Paramecium caudatum*	*Spirostomum sp.*	*Stylonychia sp.*	*Tokophrya sp.*	*Uronema sp.*	*Vorticella campanula*	*Vorticella convallaria*	*Vorticella microstoma*	*Cephalodella sp.*	*Lecane sp.*	*Rotaria rotatora*			
98	R1	NL		DL	P		P		P					P					P			P			P					P	P	NL			klaczki drobne i średnie, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
98	R2	NL		NL	P		P		P													DL	P							P	P	P			klaczki drobne lub średnie, kolor jasno brązowy, osad dobrze sedymentuje
113	R1	NL		SL	P	P	P		P					P						P		P						P	P		P	P		P	klaczki średniej wielkości oraz duże+ liczne formy nitkowate, kolor ciemny brązowy, osad dobrze sedymentuje
113	R2	NL		NL	P		P		P			P				P					P				P			P	P	P	P	P			klaczki drobnej i średniej wielkości, nieliczne formy nitkowate, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
126	R1	NL		DL			P		P		P		P	P															P	P	P					klaczki drobne, średnie i duże, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
126	R2	NL		NL			P		P		NL									NL	P									NL	NL	NL	P			klaczki głównie średniej wielkości, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje
140	R1	NL		DL	P		P		P			P	P	P													DL			P	NL	NL	NL			klaczki drobne, średnie i duże, kolor jasno brązowy, osad nieco gorzej sedymentuje
140	R2	NL		DL	DL	P	NL		P			DL								P			P		P				DL	DL	DL	DL	P	P	klaczki drobne, średnie oraz większe, kolor jasno brązowy, osad dobrze sedymentuje
148	R1	NL		BL	DL		L		P		P	P	P	NL						P					P		DL			P	NL	NL	NL			klaczki małe, średnie i duże oraz duże śluzowate zlepiska, kolor jasnobrązowy, osad słabo sedymentuje
148	R2	NL		L	DL	P	DL		P			P		DL													DL			P	P	P	DL	P	P	klaczki drobne, średnie, duże, kolor jasnobrązowy, osad dobrze sedymentuje



Rysunek 56. Mikroorganizmy osadu czynnego występujące w reaktorach R1 i R2 (a-h)

[Fot. M. Michałkiewicz], a,f- orzęski osiadłe (*Ciliata*) ***Vorticella convallaria*****, b- korzenionóżki (*Rhizopoda*) *Arcella sp.*, wrotki (*Rotatoria*)** *Lecane sp*, **c – orzęski osiadłe** (*Ciliata*) ***Tokophyra sp.*****, d-orzęski swobodnie pływające** (*Ciliata*) *Paramecium caudatum*, **e- niesporczaki** (*Tardigrada*) ***Tardigrada n.det.*****, g – orzęski swobodnie pływające** (*Ciliata*) ***Litonotus sp.*****, h- bakterie nitkowate** (*Eubacteria n.det.*)



Rysunek 57. Mikroorganizmy osadu czynnego występujące w reaktorach R1 i R2 (i-p)

[Fot. M. Michałkiewicz], i – wrotki (*Rotatoria*) *Lecane sp.*, **j- bakterie (*Eubacteria*) *Zooglea ramigera*, k- nicienie** (*Nematoda*) ***Nematoda n. det*, l- orzęski** (*Ciliata*) ***Glaucoma scintillans*, m- orzeski osiadłe** (*Ciliata*) *Epistylis lacustris*, **n- wrotki** (*Rotaria rotatora*)**, o- korzenionóżki (*Rhizopoda*) *Arcella sp.*, p- orzeski** (*Ciliata*) *Thuricola folliculata*

Analiza statystyczna układu dynamicznego

Analizę statystyczną przeprowadzono dla badań wykonanych w układzie dynamicznym. Spośród wszystkich trzynastu badanych parametrów, określających kondycję i skuteczność pracy mikroorganizmów osadu czynnego, wytypowano sześć, których wartości między reaktorami R1 i R2, od momentu rozpoczęcia dozowania diklofenaku w reaktorze R2 wskazywały na istotne zróżnicowanie względem siebie. Należą do nich: indeks osadu, chemiczne zapotrzebowanie na tlen (ChZT), biochemiczne zapotrzebowanie tlenu (BZT_5), azot ogólny (Nog), fosfor ogólny (Pog) oraz redukcja diklofenaku, w zależności od przyjętego odczynu pH w danym cyklu badawczym. W analizie uwzględniono wartości parametrów badanych od pierwszego dnia do ostatniego dnia dozowania diklofenaku (tj. od 62 do 150 dnia prowadzenia badań). Analiza wyników badań nastąpiła dla 3 konfiguracji:

1. porównanie wyników badań wytypowanych parametrów, określanych w całym okresie dozowania diklofenaku (tj. od 62 do 150 dnia) w reaktorze R2, względem wyników wyznaczonych dla tych parametrów w reaktorze R1,
2. porównanie wyników badań wytypowanych parametrów, dla każdego cyklu badawczego, obejmującego dozowanie trzech dawek diklofenaku do reaktora R2 (tj. cykle I-V) względem poszczególnych serii badawczych prowadzonych równolegle w reaktorze R1,
3. porównanie wyników badań, każdego z wytypowanych parametrów analizowanych w I cyklu (przyjętym, jako wzorcowy) względem pozostałych, II-V serii badawczych, w reaktorze R2, w trakcie dozowania diklofenaku.

Program do analiz statystycznych

Wyniki analiz statystycznych zostały przeprowadzone w programie R (R Core Ream, 2017) [https://www.R-project.org/, odczyt 06.2017]. Język R jest językiem interpretowanym, opartym na wskazywaniu szeregu komend – kodów generujących, które mają zostać kolejno wykonane. Komedy są zebrane w formie skryptu.

Program ten wykorzystano do przeprowadzenia analizy, czy uzyskane wyniki podlegają rozkładowi normalnemu. W tym celu, dla każdego zbioru danych wykonano test Shapiro-Wilka. Porównanie natomiast poszczególnych parametrów dla obu reaktorów oraz między cyklami zostały przeprowadzone za pomocą testów:

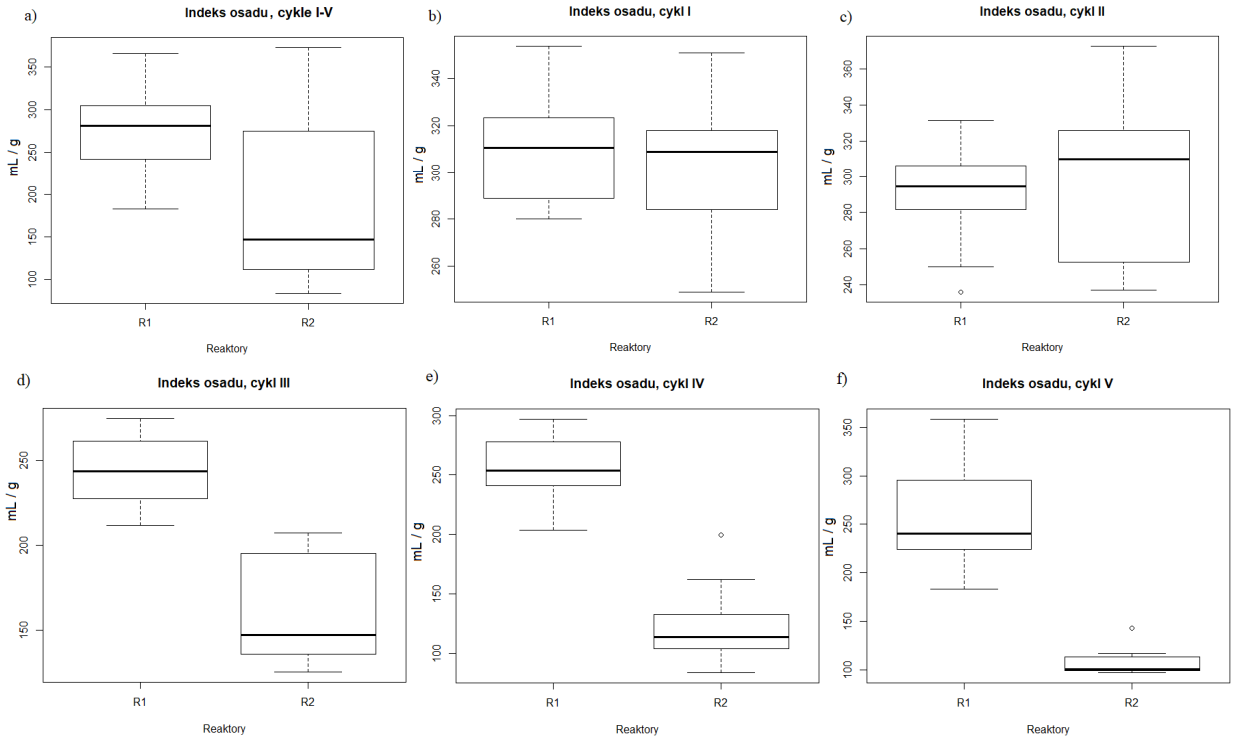
- t-Studenta dla prób niezależnych,
- F-Snedecora
- permutacyjnego opartego o statystykę testową testu t-Studenta dla prób niezależnych,

- bootstrap oparty o statystykę testową testu t-Studenta dla prób niezależnych,
- Welcha dla prób niezależnych,
- permutacyjny oparty o statystykę testową testu Welcha dla prób niezależnych,
- bootstrap oparty o statystykę testową testu Welcha dla prób niezależnych,
- t-Studenta dla prób zależnych,
- permutacyjnego opartego o statystykę testową testu t-Studenta dla prób zależnych,
- bootstrap oparty o statystykę testową testu t-Studenta dla prób zależnych,
- U-Manna-Whitneya,
- permutacyjnego oparty o statystykę testową testy U-Manna-Witneya,
- bootstrap oparty o statystykę testową testu U-Manna-Whitneya
- permutacyjnego opartego o statystykę testową będącą odległością DTW między szeregami czasowymi,
- bootstrap opartego o statystykę testową będącą odległością DTW między szeregami czasowymi.

Interpretację praktyczną wyników testowania przeprowadzono na podstawie uzyskanych p-wartości z poszczególnych testów. Ostateczna ocena wskazująca istotne różnice w średnich wartościach analizowanych parametrów, lub ich brak, była określana na podstawie p-wartości większej liczby testów statycznych. Jeżeli p-wartość testów była niższa niż 0,05, zakładano istotne różnice danego parametru między dwoma reaktorami. W praktyce może to oznaczać, że obecność diklofenaku ma znaczący wpływ na określony parametr. W przypadku uzyskania p-wartości większej niż 0,05 natomiast, nie stwierdzano istotnych różnic między wartościami danego parametru i tym samym wykluczano wpływ diklofenaku na pracę osadu czynnego w reaktorze R2.

W celu graficznego przedstawienia wyników testowania, wykonano wykresy typu ramka-wąsy. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w rozdziałach dotyczących wyników badań w rozdziale 5.3.2.

Dyskusja wyników na podstawie analizy statystycznej

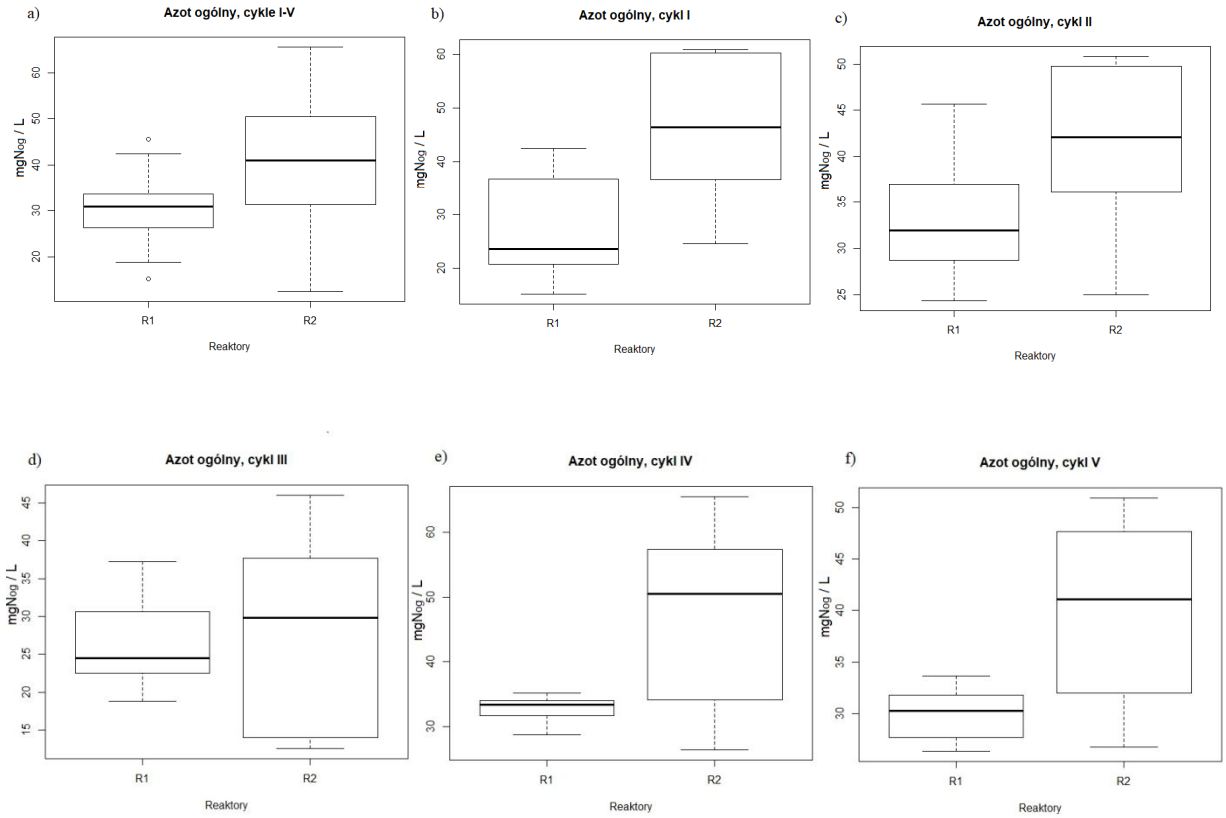


Rysunek 58. Rozkłady wartości indeksu osadu w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a) oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f)

Zarówno testy, jak i rysunek 58 wskazują, że indeks osadu, w reaktorach R1 i R2, podczas całego okresu badań, w czasie którego do reaktora R2 dozowano diklofenak, różni się istotnie. Oznacza to, że analizowany lek może wpływać korzystnie na poprawę sedymentacji osadu. Nieznaczne różnice wartości indeksu osadu zaobserwowano w cyklach I i II. Na wynik mogły wpłynąć podobne w obu seriach badawczych wartości odczynu pH, które wahały się w granicach 7,0 – 7,5.

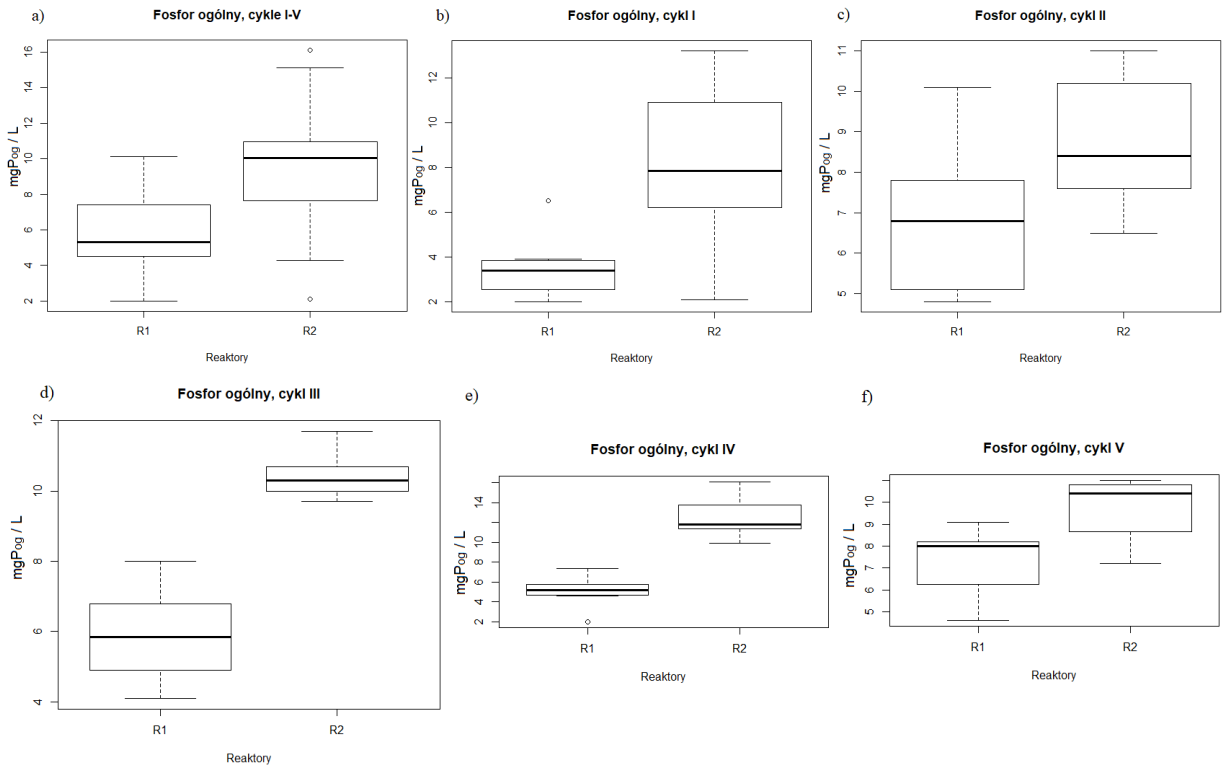
Istotne różnice tego parametru są widoczne dla pH 6,5, 6,0, a także w cyklu V, w którym zmniejszono ilość źródła węgla w pożywce syntetycznej, przy zachowaniu naturalnego pH mikroorganizmów osadu czynnego. Mniejsze wartości indeksu osadu świadczą o poprawie sedymentacji osadu. Analizy mikrobiologiczne natomiast potwierdziły mniejszą ilość bakterii nitkowatych, a także tworzenie się większych aglomeratów kłaczków osadu czynnego,

co znacznie sprzyja poprawie szybkości opadania osadu.



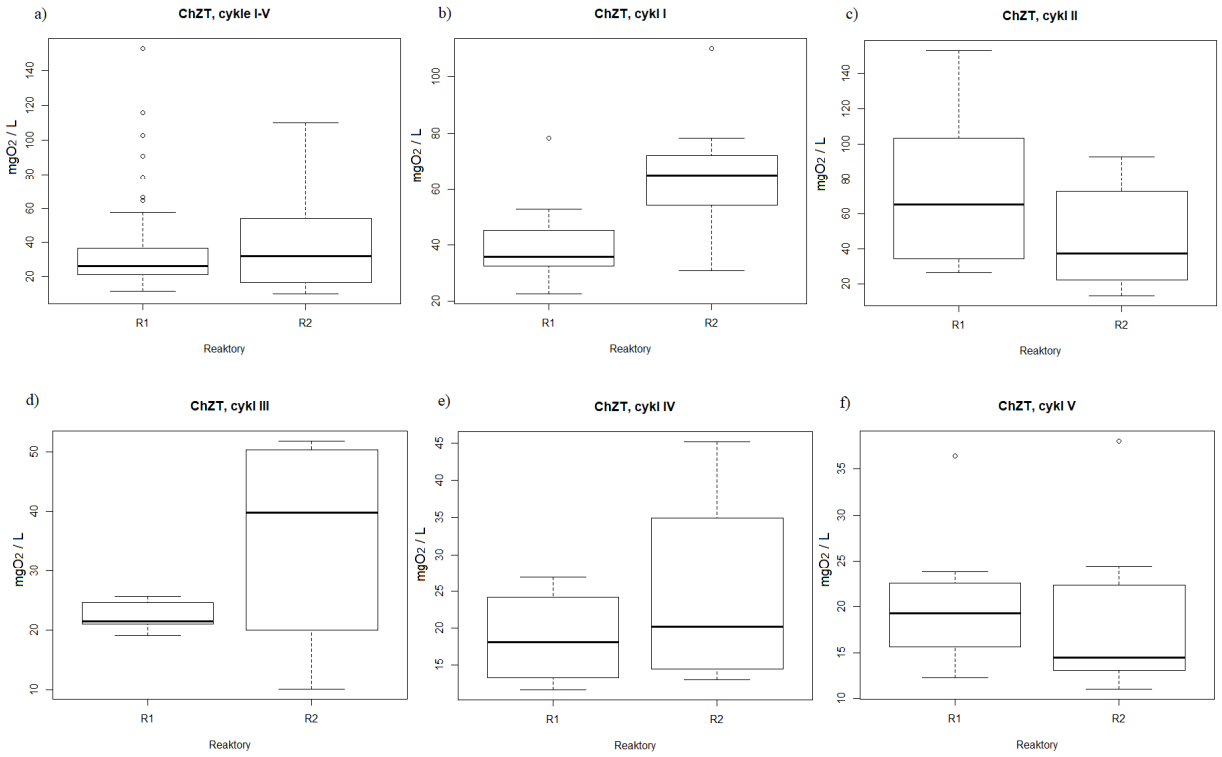
Rysunek 59. Rozkłady stężenia azotu ogólnego w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a) oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f)

Wyniki przeprowadzonych testów oraz przedstawione na rysunku 59 wykresy, prezentują, że azot ogólny, w reaktorach R1 i R2, podczas całego okresu badań, w czasie którego do reaktora R2 dozowano diklofenak, różni się istotnie. Oznacza to, że usuwanie azotu w obecności dikofenaku zachodzi wolniej w reaktorze R2 niż w układzie R1, bez analizowanej substancji czynnej. Najmniejsza różnica w uzyskanych wynikach pomiędzy reaktorem wzorcowym (R1) oraz reaktorem R2, do którego dozowano diklofenak wystąpiła w cyklu III, przy pH=6,5. Na zbliżony wynik stężenia azotu ogólnego w obu reaktorach mogła mieć wpływ wartość odczynu pH korzystna dla przebiegu procesu nitryfikacji. Potwierdzeniem tego może być wysoka wartość azotu azotanowego w układzie (powyżej 10 mg/L) oraz niska wartość azotu amonowego (poniżej 1,0 mg/L). Mimo obecności diklofenaku, wartość azotu ogólnego, w cyklach, w których pH wynosiło minimum 6,5, znajdowała się w granicach wartości dopuszczalnych dla ścieków odprowadzanych z zakładów przemysłowych na podstawie Rozporządzenia Ministra Środowiska z dnia 18 listopada 2014r. (Dz. U. 2014r. poz. 1800). Długi wiek osadu, wynoszący dla każdego cyklu 12 dni, sprzyjał rozwojowi bakterii odpowiedzialnych za nitryfikację.



Rysunek 60. Rozkłady stężenia fosforu ogólnego w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a), oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f)

Na rysunku 60 oraz według przeprowadzonych testów, stwierdzono istotne zróżnicowanie względem reaktorów R1 i R2 pod względem wielkości redukcji fosforu ogólnego. W każdym analizowanym cyklu w reaktorze R2, różniącym się odczynem pH lub ilością związków organicznych, dostarczanych w pożywce syntetycznej, uzyskano wyższe wartości fosforu. Może to stanowić przypuszczenie, że obecność farmakologicznej substancji toksycznej, na przykładzie analizowanego diklofenaku, hamuje skuteczność usuwania tego związku. Niskie wartości ortofosforanów P-PO_4 (<1,0 mg/L) sugerują, że fosfor w warunkach tlenowych jest kumulowany przez bakterie. Wysoka wartość jego parametru może być spowodowana wysokim wiekiem osadu, który sprzyja ponownemu uwalnianiu fosforu do układu.

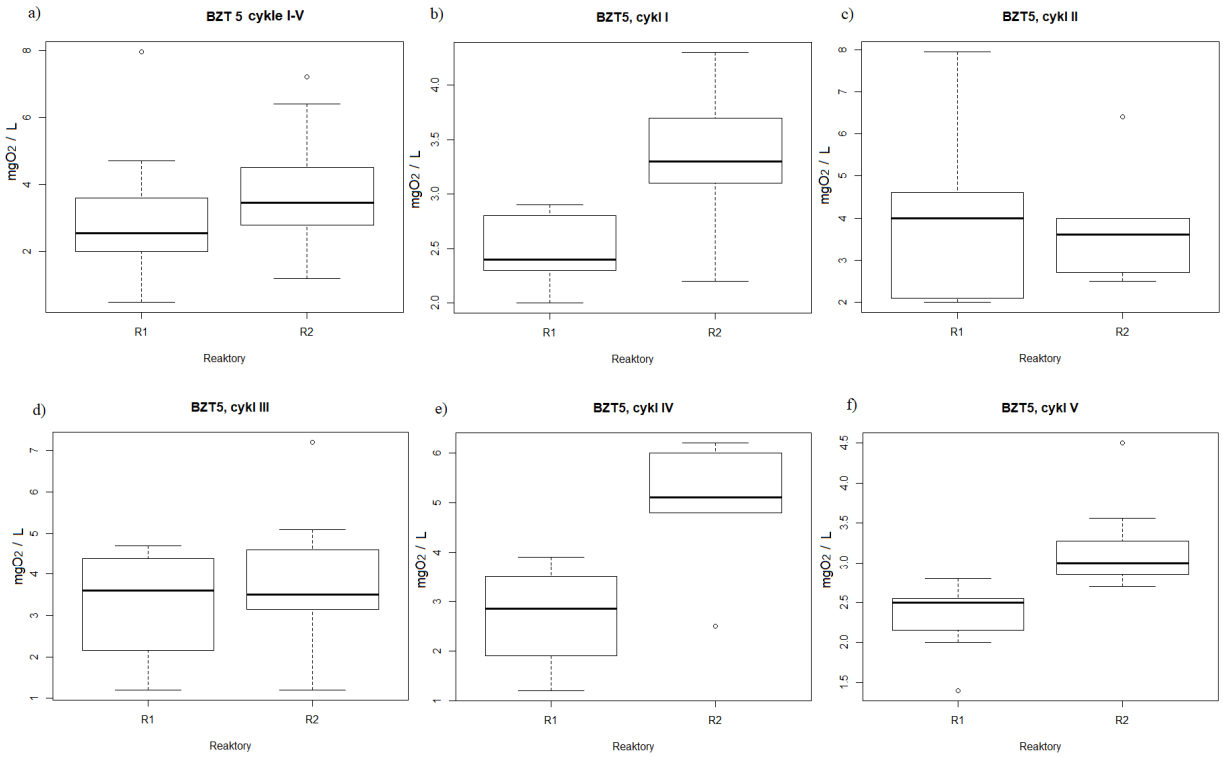


Rysunek 61. Rozkłady stężenia ChZT w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a), oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f)

Przeprowadzone testy, jak i wykonane wykresy ramka-wąsy zaprezentowane na rysunku 61 wskazują, że wartości ChZT, w obu reaktorach R1 i R2, podczas całego okresu badań, w czasie którego do reaktora R2 był dozowany diklofenak, nie odbiegają od siebie istotnie. Biorąc pod uwagę natomiast poszczególne cykle badawcze, wyższe wartości ChZT uzyskano w cyklach I oraz III w reaktorze R2, niż w reaktorze R1. Odwrotną, malejącą tendencję tego parametru, na podstawie prezentowanych wykresów zaobserwowano w cyklach II oraz V. Brak znaczących różnic w wyniku uzyskanego poziomu ChZT odnotowano dla cyklu IV, przy odczynie pH=6,0.

Zróżnicowane wyniki charakteryzujące poziom stężenia ChZT mogą wynikać z niewielkiej ilości obserwacji dla poszczególnych cykli badawczych. Bardziej precyzyjne wyniki wskazujące właściwą tendencję stężenia ChZT w obecności diklofenaku mogłyby zostać zweryfikowane dzięki dodatkowej licznie przeprowadzonych obserwacji.

Wartość ChZT diklofenaku jest niewielka w stosunku do ChZT zawartego w pożywce syntetycznej. Stąd, na podstawie tego parametru bardzo trudno oszacować procent rozkładu poszczególnych związków wchodzących w skład diklofenaku.

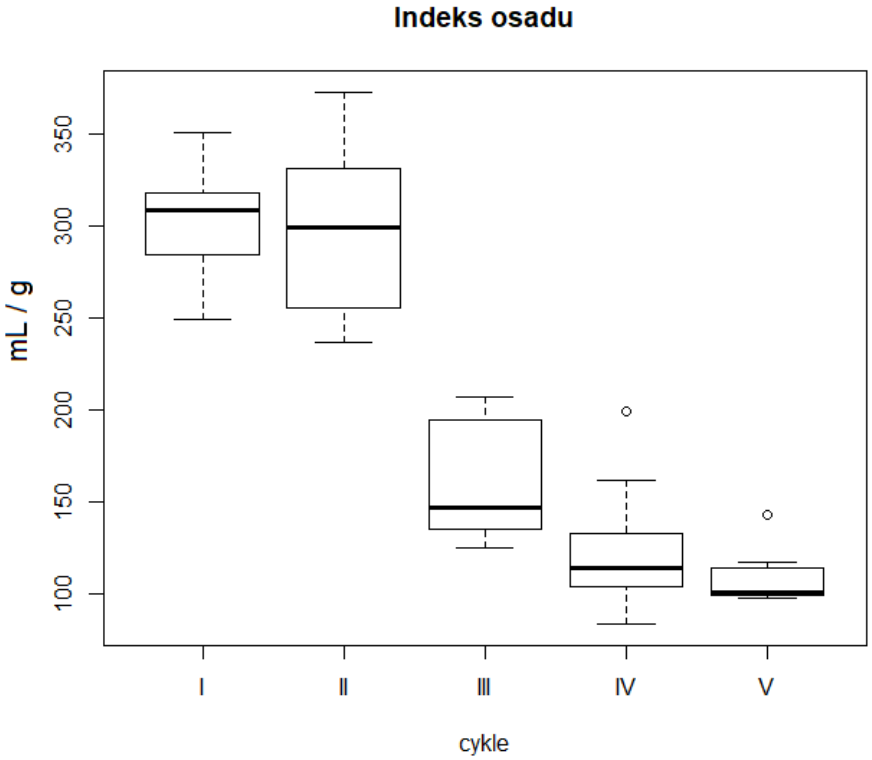


Rysunek 62. Rozkłady stężenia BZT5 w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a), oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f)

Przeprowadzone testy oraz wykresy prezentowane na rysunku 62, przedstawiają, że wartości BZT_5 osiągają podobny rząd wielkości zarówno w reaktorze R1, jak i R2, podczas całego okresu badań, w czasie którego do reaktora R2 dozowano diklofenak. Rozkład wartości tego parametru w obrębie poszczególnych cykli nie jest proporcjonalny do tendencji spadku lub wzrostu wartości ChZT. Brak istotnych różnic między stężeniem BZT_5 odnotowano w cyklach II i III. W pozostałych seriach badawczych, tj. I, IV oraz V uzyskano wyższe wartości BZT_5 w reaktorze R2, do którego dozowano diklofenak.

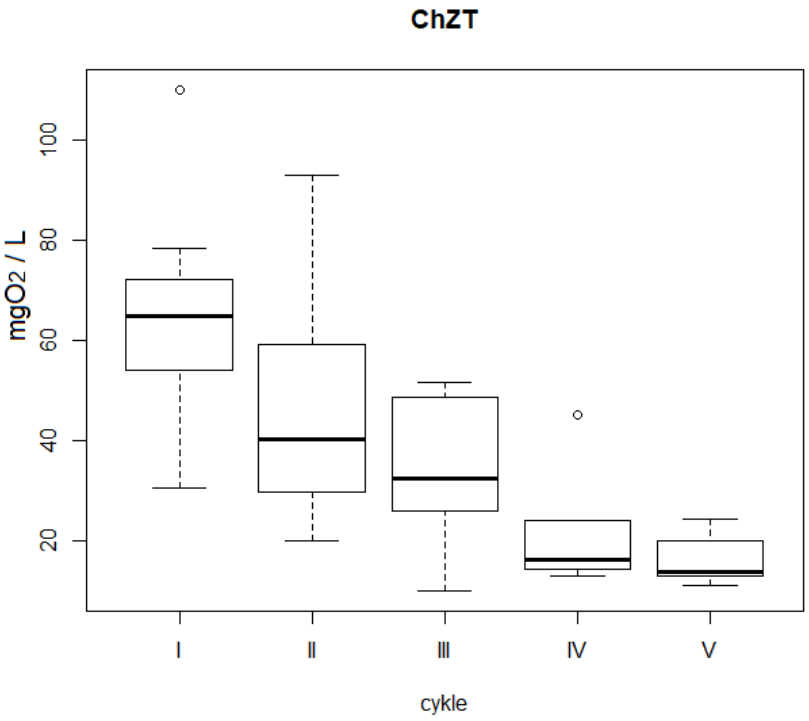
Pojawiająca się dysproporcja pomiędzy wartościami ChZT i BZT_5 w poszczególnych cyklach może wskazywać, że obecność diklofenaku w zależności od dozowanej dawki lub odczynu pH zaburzał rozkład związków organicznych i nieorganicznych. Różnice pomiędzy wartościami BZT_5 uzyskanych w obu reaktorach nie są znaczące. Może to sugerować, że uzyskane tendencje wzrostu lub spadku analizowanego parametru były wynikiem błędu pomiarowego lub ze zbyt małej liczby przeprowadzonych analiz.

Znając rozkład wartości analizowanych parametrów, charakteryzujących jakość ścieków oczyszczonych pomiędzy reaktorem wzorcowym R1 oraz reaktorem R2, przeprowadzono ocenę poszczególnych zmian pozwalające szacować tendencję zmian w obrębie poszczególnych cykli w reaktorze R2. W tym celu założono, że wyjściowym, wzorcowym punktem obserwacji jest cykl I, rozpoczynający dozowanie leku w warunkach naturalnych, jakie zostały ustalone na etapie wpracowania osadu czynnego.

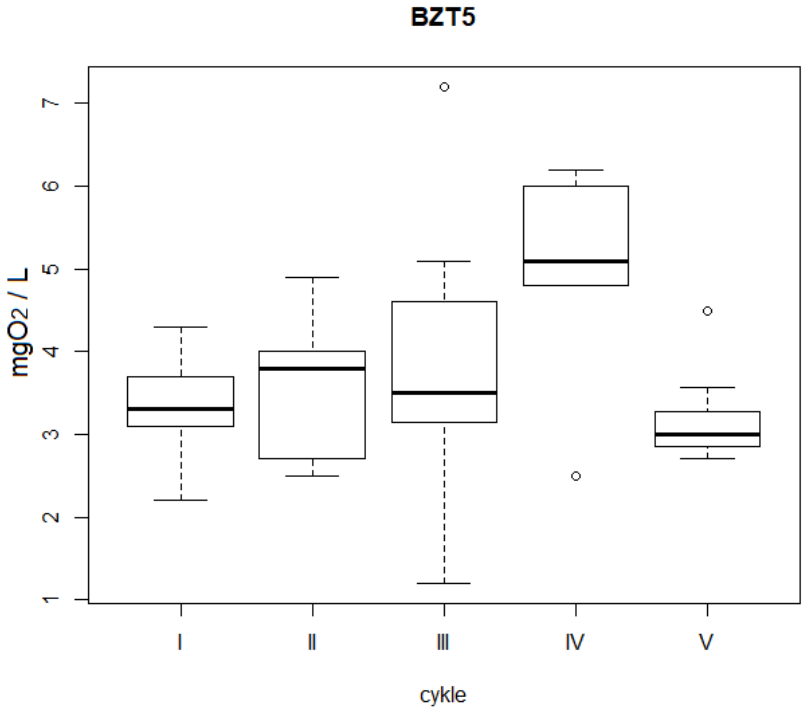


Rysunek 63. Rozkłady wartości indeksu osadu w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych

Analizując rysunek 63 można zauważyć, że indeks osadu w każdym z kolejnych cykli maleje. Wartości w granicach 50-150 mL/g, świadcząca o dobrej sedymentacji nastąpiła w cyklach III, IV, dla odczynu pH = 6,5 oraz 6,0 a także w cyklu V dla pH naturalnego, przy obniżonej ilości węgla organiczneo zawartego w dozowanej pożywce syntetycznej.

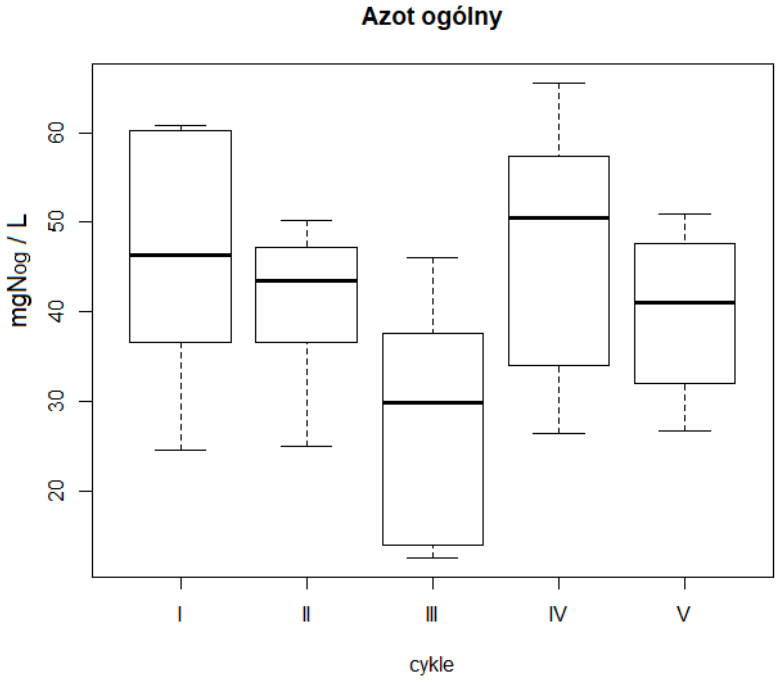


Rysunek 64. Rozkład stężenia ChZT w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych



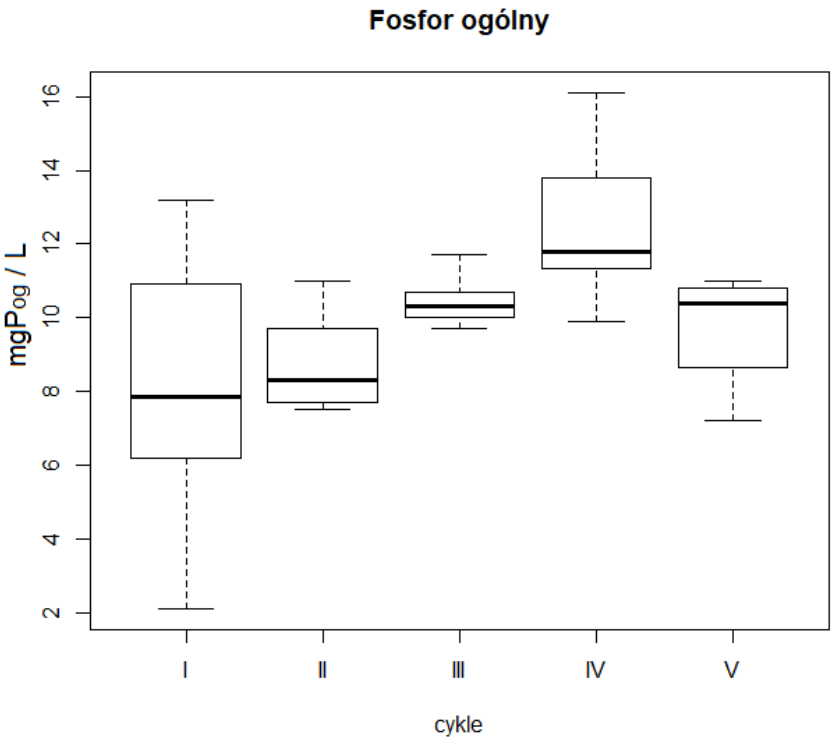
Rysunek 65. Rozkład stężenia BZT_5 w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych

Na wykresach 64 i 65 przedstawiono rozkład wartości parametrów ChZT oraz BZT_5. Uzyskane wyniki wskazują na brak zależności między nimi. Spadek wartości ChZT może sugerować dobre usuwanie związków nieorganicznych. Rosnące wartości BZT_5 natomiast mogą oznaczać, że obecność diklofenaku, stanowiącego dodatkowe źródło węgla organicznego w układzie, nie jest łatwo przyswajalne przez mikroorganizmy osadu czynnego. Można zatem przypuszczać, że dozowana dawka leku oraz pozostałości diklofenaku z poprzedzającego kolejny cykl badań skutkuje wzrostem wartości nierozłożonych związków organicznych w układzie.



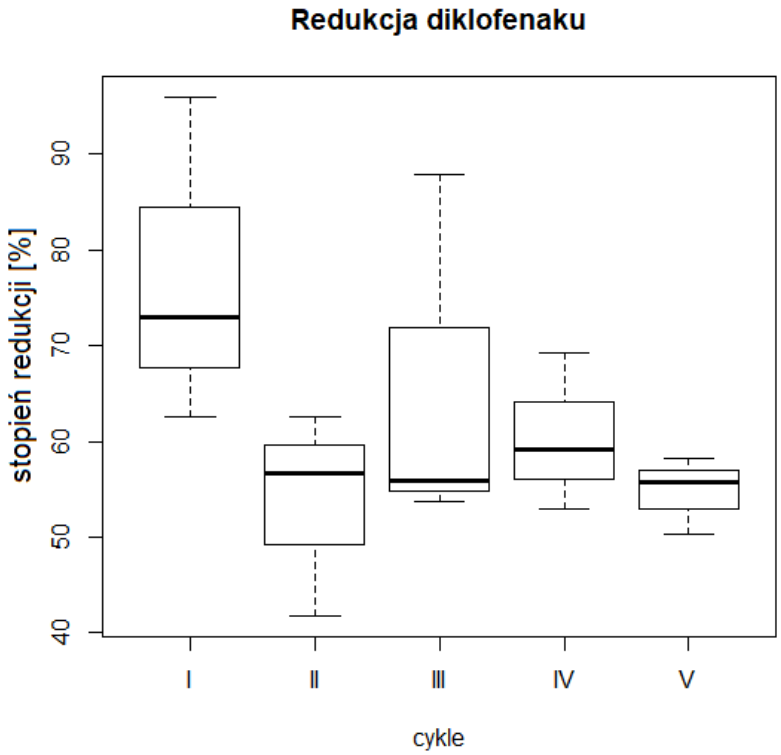
Rysunek 66. Rozkłady stężenia azotu ogólnego w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych

Na podstawie rysunku 66 można zauważyć, że rozkład wartości azotu ogólnego w cyklach I, II oraz V, dla wartości pH w granicach 7,0-7,5 oraz stałych wartościach napowietrzania wskazuje podobne wartości stężenia tego pierwiastka. Najmniejszą wartość tego parametru odnotowano przy pH=6,5, największą natomiast dla pH=6,0. Uzyskane wartości azotu ogólnego znajdują się w granicach dopuszczalnych dla ścieków przemysłowych odprowadzanych do kanalizacji miejskiej, określonych w rozporządzeniu [Dz. U. 2014r. poz. 1800]. Przekroczenia wartości normatywnej odnotowano podczas dozowania diklofenaku w stężeniu 5 mg/L. W ogólnym bilansie azotu uzyskano niskie wartości stężenia azotu amonowego, poniżej 1,0 mg/L oraz wysokie wartości azotu azotanowego $N\text{-}O_3$ (powyżej 10 mg/L), co świadczy o skutecznym przebiegu procesu nitryfikacji w bioreaktorze.



Rysunek 67. Rozkłady stężenia fosforu ogólny w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych

Jak można zauważyć na rysunku 67 stężenie fosforu ogólnego w cyklach od I do IV wzrasta i znacznie przekracza wartości dopuszczalne w RMŚ [Dz. U. z 2014r. poz. 1800]. Wysokie stężenie tego parametru może być wynikiem długiego wieku osadu, powodującego ponowne uwalnianie się fosforu do układu. Niskie wartości odczynu pH, poniżej 7,0 oraz niedostateczna ilość lotnych kwasów tłuszczowych oraz brak warunków beztlenowych nie sprzyjały procesom denitryfikacji, co zaburzyło usuwanie fosforu w zaprojektowanym układzie. Wyższe wartości fosforu ogólnego w reaktorze R2 w stosunku do reaktora R1 sugerują, że obecność substancji toksycznej – diklofenaku może dodatkowo hamować proces usuwania tego pierwiasta.



Rysunek 68. Rozkłady stężenia redukcji diklofenaku w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych

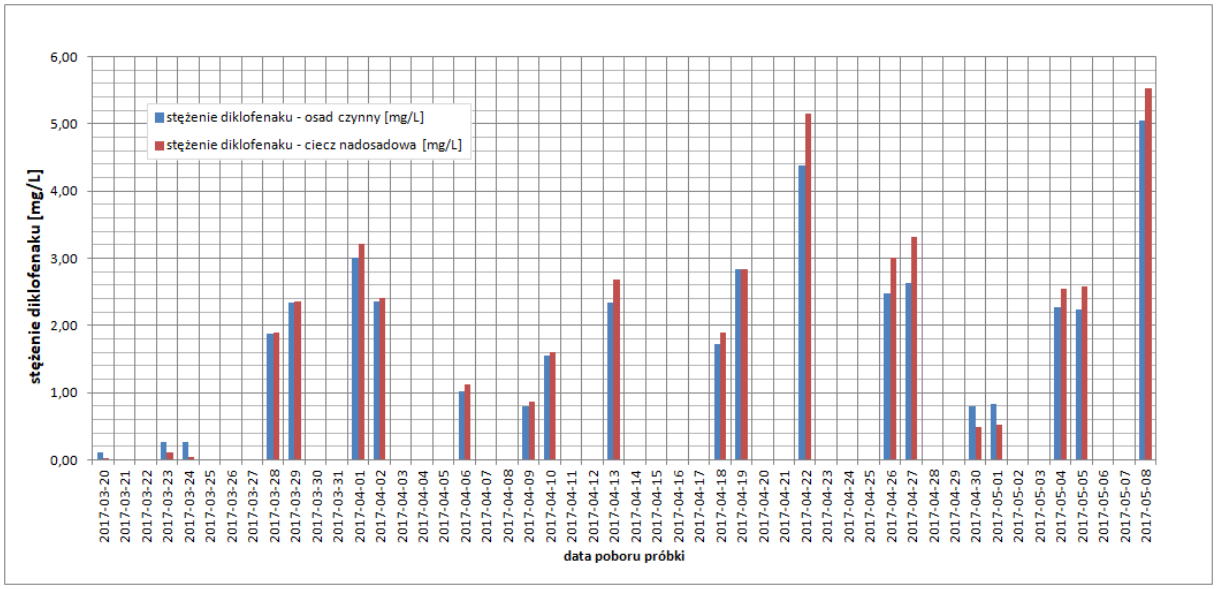
Analizując rysunek 68 zaobserwowano, że w cyklach II-V, średnia redukcja diklofenaku, niezależnie od dozowanej wartości dawki wynosiła 55-60%. Najwyższy procent redukcji uzyskano w pierwszym cyklu badań, dla naturalnego pH panującego w bioreaktorze. Wysoka redukcja w pierwszej serii badań może być wynikiem dobrej kondycji osadu czynnego oraz stabilnych parametrów pracy w układzie, na etapie wpracowania osadu czynnego. W każdym z kolejnych cykli, podczas dozowania ustalonego stężenia diklofenaku, w bioreaktorze R2 obecne były pozostałości analizowanej substancji z serii poprzedzającej kolejny cykl. Zatem występowanie diklofenaku w układzie podczas dozowania kolejnej porcji leku mógł dodatkowo pogarszać skuteczność usuwania leku.

Wyniki badanych parametrów w poszczególnych cyklach nie były wykonywane codziennie, a jedynie w pierwszym i ostatnim dniu dozowania każdego z trzech przyjętych stężeń diklofenaku. Powodem tego był wysoki koszt odczynników pozwalających przeprowadzić pomiary oraz ograniczona ilość czasu na wykonanie wszystkich analizowanych w pracy parametrów. Uzyskane wyniki pozwoliły na oceną ogólnej tendencji zmian jakości osadu czynnego oraz jakości ścieków oczyszczonych w obecności badanej substancji aktywnej. Sumaryczna ilość wyników uzyskana dla wszystkich cykli badawczych potwierdza zgodność z wynikami uzyskanymi w pojedynczych seriach badawczych.

5.3.3. Adsorpcja diklofenaku na kłaczkach osadu czynnego

W celu określenia, czy i w jakim stopniu rozkład diklofenaku nastąpił w wyniku adsorpcji, wykonano dodatkowe badanie chromatograficzne. Do analiz pobrano próbki zawierające ciecz nadosadową (uzyskaną po wyłączeniu napowietrzania w bioreaktorach i sedymentacji osadu czynnego) oraz taką samą objętość próby po wymieszaniu zawartości bioreaktora, przed wyłączeniem napowietrzania i sedymentacją. Obie były przygotowywane techniką ekstrakcji do ciała stałego.

Badania adsorpcji przeprowadzono etapowo. W pierwszej kolejności wykonano ekstrakcję próbki SPE (ciecz-ciało stałe), a następnie oznaczone techniką LC MS-MS. Dodatkowo wykonano badania widm FT-IR z wykorzystaniem spektrofotometru Vertex 70. Oba eksperymenty nie wskazały obecności diklofenaku na kłaczkach osadu czynnego (rysunek 69).



Rysunek 69. Stężenia diklofenaku w próbkach pobranych z cieczy nadosadowej oraz dla próbek z osadem czynnym

Na podstawie powyższego wykresu prezentującego stężenie diklofenaku na kłaczkach osadu czynnego oraz w próbce zawierającej ciecz nadosadową widać, że w większości analizowanych próbek wyższe stężenia dominują ściekach oczyszczonych. Odwrotna zależność wystąpiła w pierwszym, czwartym i piątym dniu I cyklu badań, podczas dozowania do układu diklofenaku w stężeniu 1 mg/L, przy wartości odczynu pH na poziomie 7,0-7,5. Stężenia analizowanego leku na kłaczkach osadu czynnego w tym okresie wyniosły kolejno: 0,11 mg/L, 0,25 mg/L oraz 0,27 mg/L. W analogicznym czasie stężenia diklofenaku oznaczone w cieczy nadosadowej osiągnęły wartości 0,03 mg/L, 0,11 mg/L oraz 0,04 mg/L. Wyższe stężenia diklofenaku w próbkach z osadem czynnym określono także w piątym i szóstym dniu

III cyklu badań, w pierwszych dwóch dobach dozowania 5 mg/L diklofenaku (tj. 0,79 mg/L oraz 0,82 mg/L, odpowiadające im wartości w próbkach ścieków oczyszczonych wyniosły 0,48 mg/L oraz 0,52 mg/L). Odczyn pH w układzie był w tym czasie utrzymywany na poziomie 6,5. Niski procent adsorpcji na kłaczkach osadu czynnego potwierdza literatura [Suarez S. i in., 2010, Martin J. i in., 2012]. Prowadzi to do wniosku, że obserwowana eliminacja diklofenaku w poszczególnych cyklach badawczych, niezależnie od odczynu pH w największym stopniu następuje na drodze biodegradacji.

Analiza literaturowa wskazuje, że adsorpcja na kłaczkach osadu czynnego zachodzi najefektywniej, powyżej 90%, w silnie kwaśnym środowisku, przy pH w granicach 4,3 – 5,0 [Barceló D., Petrovic M., 2008].

6. Podsumowanie i wnioski

Podsumowanie

Teza I: Przeprowadzone badania potwierdzają obecność wybranych rodzajów leków z grupy NLPZ w ściekach bytowo-gospodarczych, transportowanych do COŚ w Koziegłowach. Analiza rozkładu leków w poszczególnych odcinkach ciągu technologicznego oczyszczalni, potwierdza redukcję ibuprofenu, ketoprofenu, naproksenu, paracetamolu oraz tolmentinu w granicach 90-99,5% głównie na drodze biodegradacji oraz w ponad 76% fenoprofenu na drodze biodegradacji oraz sorpcji na kłaczkach osadu czynnego. Uzyskane wyniki prowadzą do wniosku, że konwencjonalne oczyszczalnie ścieków wykorzystujące metody osadu czynnego są zaprojektowane do skutecznego oczyszczania ścieków bytowo-gopodarczych, nie stanowią jednak skutecznego rozwiązania pozwalającego na całkowitą eliminację zanieczyszczeń farmaceutycznych. Pomimo uzyskania 99,5% stopnia redukcji dla ibuprofenu i paracetamolu, substancje czynne tych leków, jak i pozostałe analizowane związki są odprowadzane wraz ze ściekami oczyszczonymi do wód powierzchniowych, w ilościach, które mogą negatywnie oddziaływać na ekosystemy wodne.

Teza II: Testy z udziałem osadu czynnego, wykonane w warunkach laboratoryjnych, potwierdziły zdolność mikroorganizmów do degradacji dwóch wytypowanych leków z grupy NLPZ: ibuprofenu i diklofenaku. W celu uzyskania wyższej efektywności usuwania tych substancji czynnych, w przeprowadzonych badaniach zmieniano wartości parametrów temperatury, pH, obciążenia ładunkiem zanieczyszczeń oraz stężenia tlenu. Na przykładzie testu statycznego degradacji ibuprofenu przeprowadzonego dla trzech różnych wartości temperatury (8, 18, 28^{o}C), udowodniono, że wraz z jej wzrostem procesy rozkładu przebiegają bardziej efektywnie. W wykonanym w temperaturze 18^{o}C teście, biodegradacja ibuprofenu, po upływie doby wyniosła 50%. Spadek temperatury o 10^{o}C spowodował obniżenie efektywności usuwania leku o 10% po 24 h. Podwyższenie natomiast temperatury do 28^{o}C pozwoliło zaobserwować 15% wzrost redukcji leku (ibuprofenu) w stosunku do temperatury 18^{o}C.

W odniesieniu do diklofenaku, założeniem badawczym było sprawdzenie, jaka będzie efektywność redukcji leku przez mikroorganizmy osadu czynnego, przy zmianie odczynu pH, w krótkich odstępach czasu. Proces ten rozpatrzono w dwóch wariantach. Pierwszy z nich zakładał, że każdy z pięciu cykli badawczych obejmujący 12 dni (z wyjątkiem cyklu VI) podczas, którego do układu R2 dozowano diklofenak w trzech określonych stężeniach (1, 5 i 10 mg/L) stanowią odrębne eksperymenty. Układem odniesienia, dla serii od II do VI był pierwszy cykl badań, w którym parametry pracy bioreaktorów R1 i R2 zostały ustabilizowane

podczas trwającego 61 dni okresu wpracowania osadu czynnego. Drugi wariant zakładał, że badania prowadzone od 62 do 150 dnia stanowiły proponowany scenariusz pracy zakładu farmaceutycznego produkującego analizowaną substancję czynną. W założeniu, rozpatrywany zakład posiada własną oczyszczalnię ścieków opartą na metodzie osadu czynnego. Poszczególne cykle, w których następowała zmiana odczynu pH stanowiły warianty zmian tego parametru w przedziale od 6,0 do 7,5. Wahania te były odpowiedzią na zmienne warunki panujące w układzie (m.in. temperatury, dawki diklofenaku podawanej do układu, ilości węgla organicznego zawartego w pożywce, czy chwilowym spadkiem stężenia tlenu spowodowanym np. awarią dmuchawy, zaprezentowany w cyklu VI).

Niezależnie od przyjętego wariantu, można zauważyć, że najwyższy stopień redukcji diklofenaku nastąpił przy wartości odczynu pH w granicach 6,7 oraz 6,5, zaobserwowanych w I i III cyklu badań. W obu przypadkach uzyskane wyniki nastąpiły po 4 dobie dozowania diklofenaku w stężeniu 1mg/L.

Teza III: W teście statycznym przeprowadzonym w marcu i kwietniu 2016r. dla trzech zadanych wartości temperatury, założono, że dozowany w stężeniu 10 mg/L diklofenak stanowi jedyne źródło węgla organicznego dla mikroorganizmów osadu czynnego. Uzyskane wyniki ChZT wykazały spadek tego parametru, dla każdej z trzech serii pomiarowych, w zależności od temperatury. Pozwala to wnioskować, że ibuprofen stanowi źródło węgla organicznego dla mikroorganizmów osadu czynnego.

W odniesieniu do układu dynamicznego, w celu sprawdzenia czy mikroorganizmy osadu czynnego mogą wykorzystywać diklofenak, jako źródło węgla organicznego, w V cyklu badań, do układu dozowano pożywkę, w której ilość węgla była obniżona o 5% w stosunku do wyjściowego składu ścieków syntetycznych. Uzyskane wyniki wskazały jednak najniższą w stosunku do wszystkich pozostałych cykli badawczych efektywność usuwania leku. Nasuwa to przypuszczenie, że mikroorganizmy w wyniku deficytu łatwo przyswajalnego źródła węgla organicznego zawartego w pożywce wyjściowej, starały się przystosować do nowych warunków, nie rekompensując ubytku tego pierwiastka węglem dostępnym w strukturze diklofenaku.

Teza IV: Próbując udowodnić tezę IV, przyjęte założenie odniesiono do trudno rozkładalnego leku z grupy NLPZ – diklofenaku. Wykonane pomiary wskaźników zanieczyszczeń takich jak: ChZT, BZT_5, F_{og}, N_{og}, wskazały, że pierwiastki biogenne w obecności diklofenaku usuwane są nawet dwa razy wolniej niż w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1, pozbawionego diklofenaku. Mimo braku norm określających maksymalne dopuszczalne wartości opisanych wskaźników zanieczyszczeń dla zakładów farmaceutycznych

odprowadzających ścieki do miejskiej sieci kanalizacyjnej, w ocenie jakości ścieków oczyszczonych uzyskanych w wynikach badań testu dynamicznego posłużono się wytycznymi RMŚ z dnia 18 listopada 2014r. [Dz.U. 2014, poz. 1800]. Na jej podstawie, wskazano, że wartości stężeń N_{og} i P_{og} zostały przekroczone ponad wartości wskazane w rozporządzeniu. Nasuwa to wniosek, że długotrwałe, wysokie stężenia diklofenaku, rzędu miligramów w litrze, mogą znacznie hamować usuwanie azotu i fosforu w ściekach dopływających do miejskich oczyszczalni ścieków. Mimo braku regulacji prawnych określających dopuszczalne dawki leków w ściekach odprowadzanych przez wytwórców bądź odbiorców ścieków, zaprezentowana hipoteza budzi obawy, czy wzrastająca ilość leków docierająca do oczyszczalni miejskich może zaburzać usuwanie podstawowych wskaźników zanieczyszczeń według wartości wskazanych w obowiązujących regulacjach prawnych.

Wnioski:

1. Analiza zawartości związków farmaceutycznych z grupy NLPZ, w wybranych punktach pomiarowo-kontrolnych rzeki Warty wykazała większe stężenia leków w górnym odcinku biegu rzeki niż w punkcie zlokalizowanym za COŚ w Koziegłowach (z wyjątkiem poboru próbek w 11.2013r., 02.2014r., 04.2014r.). Prowadzi to do wniosku, że ścieki oczyszczone kierowane do Warty nie są jedynym źródłem odpowiadającym za obecność substancji farmaceutycznych w rzece Warcie. Ich zawartość w rzece na wysokości miasta Luboń oraz na odcinku Mostu Św. Rocha może sugerować wpływ innych czynników, jak np. niekontrolowane zrzuty ścieków z przedsiębiorstw zlokalizowanych na terenia miasta Poznania, bądź innych aglomeracji, położonych bliżej źródła biegu rzeki Warty.
2. Zastosowanie konwencjonalnych metod oczyszczania ścieków z wykorzystaniem osadu czynnego nie pozwala uzyskać całkowitej redukcji analizowanych aktywnych form leków. Efektywność ich usuwania jest zależna od rodzaju, właściwości i budowy chemicznej leku. Pomimo możliwego do uzyskania wysokiego stopnia redukcji (>90%), substancje tego typu nie są jednak eliminowane całkowicie, stąd pewna ich ilość, odprowadzana do odbiorników wodnych nie pozostaje obojętna dla środowiska naturalnego.
3. Istotną rolę w skuteczności usuwania poszczególnych substancji farmaceutycznych odgrywają właściwości hydrofilowe leków. Są one określane na podstawie współczynnika dystrybucji, który w zależności od odczynu pH panującego w układzie pozwalają oszacować mechanizm biodegradacji leku (zdolności do rozkładu biologicznego oraz właściwości sorpcyjne danego leku).
4. Analiza usuwania ibuprofenu, ketoprofenu, paracetamolu oraz tolmetinu w wybranych punktach ciągu technologicznego COŚ w Koziegłowach, wskazała ponad 90% spadek stężenia tych leków na odcinku między przepompownią ścieków a komorą denitryfikacji. Kwaśny charakter tych leków oraz współczynnik dystrybucji w granicach 4 dla wszystkich wyżej wymienionych leków, pozwala przypuszczać, że związki te są podatne na rozkład biologiczny w warunkach beztlenowych.
5. Stężenia leków zawartych w ściekach poprodukcyjnych, odprowadzanych z zakładów przemysłowych, stanowią średnio kilka procent w stosunku do ogólnej ich ilości dopływających wraz ze ściekami bytowo-gospodarczymi. W okresach wzmożonych zachorowań (np. na grypę), zawartość leków analizowana na odpływie ścieków z zakładów produkcyjnych może osiągać kilkadziesiąt procent lub nawet przekraczać wartości stężeń odnotowane na wlocie do miejskich oczyszczalni ścieków.

6. Obecnie nie ma regulacji prawnych, które wskazywałyby najwyższe dopuszczalne stężenia związków farmaceutycznych w ściekach dla zakładów generujących substancje lekowe i odprowadzające je do miejskich sieci kanalizacyjnych, jak i dla odbiorców tych ścieków (oczyszczalni ścieków).
7. Na podstawie badań własnych, przeprowadzonych w teście dynamicznym w zmiennych warunkach odczynu pH stwierdzono, że długotrwała obecność substancji toksycznej (diklofenaku) spowodowała pogorszenie w usuwaniu fosforu ogólnego oraz azotu ogólnego w odniesieniu do układu, w którym analizowana substancja nie występowała. Wzrost ilości fosforu ogólnego/azotu ogólnego w układzie R2, do którego dozowano diklofenak, może sugerować, że obecność diklofenaku w ściekach ogranicza redukcję tych dwóch pierwiastków biogennych.
8. Rosnące zapotrzebowanie i ogólna dostępność leków z grupy NLPZ sprzyja zwiększaniu produkcji określonych preparatów medycznych. Brak podejmowania działań w zakresie ograniczenia przedostawania się do środowiska tego rodzaju zanieczyszczeń może eskalować problem akumulacji leków w naturalnych ekosystemach wodnych i związane z tym zagrożenia dla żywych organizmów, bezpośrednio narażonych na kontakt z nimi.
9. Obecność substancji aktywnych leków w rzece Warcie, jak i w ściekach oczyszczonych odprowadzanych z COŚ, dodatkowo niecałkowita degradacja diklofenaku w teście dynamicznym wskazują, że substancje te nie ulegają całkowitemu rozkładowi. Dodatkowo, w celu zmniejszenia ładunku składników aktywnych leków wprowadzanych wraz ze ściekami poprodukcyjnymi do kanalizacji miejskiej, zakłady farmaceutyczne powinny posiadać przyzakładowe oczyszczalnie ścieków, zapewniające redukcję aktywnych form leków obecnych w ściakach poprodukcyjnych, generowanych w wyniku procesu wytwórczego danej substancji.
10. Diklofenak ma charakter kwasowy, co potwierdza wartość stałej kwasowej pKa = 4. Oznacza to, że powyżej wartości pH 4 w roztworze będzie dominowała forma zjonizowana diklofenaku. Taka postać leku jest bardziej przyjazna dla bakterii (bakterie mogą wówczas lepiej przyswajać lek). Stąd prowadzenie procesu biodegradacji powyżej wartości pH= 4 wydaje się być korzystniejsze. Założenie to potwierdziły osiągnięte wyniki stopnia redukcji diklofenaku, wynoszące 95% już po 4 dobach prowadzenia procesu degradacji podczas testu dynamicznego przy średniej wartości pH 6,7 dla wyjściowego stężenia diklofenaku wynoszącego 1,0 mg/L. Ponad 87% redukcję odnotowano także w cyklu III, w którym ustalona wartość pH wynosiła 6,5. Zanotowana wartość również wystąpiła po zakończeniu dozowania diklofenaku w stężeniu 1 mg/L.

11. Wysoki stopień redukcji diklofenaku nastąpił w przerwie, po zakończeniu III cyklu badań. W jej trakcie wykonano korektę pH, która miała na celu utrzymanie w IV serii badawczej odczynu pH na poziomie 6,0. W czwartym dniu przerwy odnotowano spadek stężenia diklofenaku o 86,2% w stosunku do stężenia leku zanotowanego w pierwszym jej dniu. W odniesieniu do pozostałych przerw, ilość zredukowanego stężenia leku w tym czasie postoju była najwyższa.
12. Brak adsorpcji na kłaczkach osadu czynnego wyklucza możliwość skutecznego usuwania diklofenaku za pomocą tego procesu. Pozwala to wnioskować, że redukcja diklofenaku metodami osadu czynnego, podobnie, jak w przypadku ibuprofenu następuje głównie na drodze biodegradacji.

BIBLIOGRAFIA

1. **Acuña V.**, Ginebreda, A., Mor, J.R., Petrovic, M., Sabater, S., Sumpter, J., Barceló, D., *Balancing the health benefits and environmental risks of pharmaceuticals: diclofenac as an example*. Environment International, 85, 2015, 327–333
2. **Adamek E.**, Jakubczyk E., Baran W., Makowski A., Lipska I., Ziemiańska J., Sobczak A., *Fotodegradacja wybranych leków przeciwzapalnych w środowisku wodnym*, Proceeding of ECOpole, vol. 5, 1, 147-153, 2011
3. **Aissaoui S.**, Ouled-Hadar H., Sifour M., Beggah Ch., Benhamada F., *Biological removal of the mixed pharmaceuticals: diclofenac, ibuprofen and sulfamethoxazole using a bacterial consortium*, Iranian Journal of Biotechnology, 15(2), 2017
4. **Allen Ch.**, Burke M., Bowen J., Kubo S., Lauer L., McGurk J., Practice Greenhealth, Managing Pharmaceutical Waste, A 10-Step Blueprint for Health Care Facilities in the United States, Revised August, 2008
5. **Almeida B.**, Oehmen A., Marques R., Brito D., Carvalho G., Crespo M.T., *Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture*, Bioresource Technology, 31-37, 133, 2013
6. **Al Qarni H.**, Collier P., O'Keeffe J., Akunna J., *Investigating the removal of some pharmaceutical compounds in hospital wastewater treatment plants operating in Saudi Arabia*, Environmental Science and Pollution Research, 23,13003-13014, 2016
7. **Anumol T.**, Vijayanandan A., Park M., Philip L., Snyder S.A., *Occurrence and fate of emerging trace organic chemicals in wastewater plants in Chennai, India*, Environment International, 92-93, 33-42, 2016
8. **Ashfaq M.**, Khan K.N. , Ur Rehman M.S., Mustafa G., Nazar M.F., Sun Q., Iqbal J., Mulla S.I., Yu Ch-P., *Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 136, 31-39, 2017
9. **Ashton D.**, Hilton M., Thomas K.V., *Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom*, Science of the Total Environment, 333:167–184, 2004
10. **Baranowska I**., Kowalski B. *A rapid UHPLC method for the simultaneous determination of drugs from different therapeutic groups in surface water and wastewater* Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 89:8-14, 2012
11. **Baranowska-Skimina A.**, *Firmy farmaceutyczne w kryzysie:* http://www.egospodarka.pl/92124,Firmy-farmaceutyczne-wkryzysie,1,56,1.html,2013, odczyt 04.2017
12. **Barceló D.**, Petrovic M*., Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste Removal Technologies*, The Handbook of Environmental Chemistry ISSN 1433-6863, Springer, 2008
13. *Bazy teleadresowe firm farmaceutycznych,* http://www.mp.pl/bazy/teleadresy.php?kid=5&n=&c=Pozna%F1&szukaj=szukaj
14. **BBC News Health**, *Antibiotic resistance „big threat to health*" 16th November, 2012, http://www.bbc.co.uk/news/health-20354536, odczytano 03.2017
15. **Bendz D**., Paxeus N.A., Ginn T.R., Loge F.J., *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden*, Journal of Hazardous Materials, 122:195–204, 2005
16. **Blum W.**, Faigle J.W., Pfaar U., Sallamann A., *Characterization of a novel diclofenac metabolite in human urine by capillary gas chromatography–negative chemical ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1996; 685:251–63
17. **Bo. L.**, Urase T., Wang X., *Biodegradation of trace pharmaceutical substances in wastwater by membrene bioreactor*, Frontiers of Environmental Science & Engineering in China 3(2), 236-240, 2009
18. **Błoński M.**, Antybiotykooporność jak terroryzm, powodzie i wybuchy wulkanów, *http://kopalniawiedzy.pl/antybiotykoopornosc-bakteria-zagrozenie ,17399*, odczyt z marca 2017

19. **Calamari D.**, Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. Environ. Sci. Technol. 37 (7), 2003, 1241–1248.
20. **Carlsson C**., Johansson A.-K., Alvan G., Bergman K., Kuhler T., *Are pharmeceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients*, Science of the Total Environment 364: 67-87, 2006
21. **Chander V.**, Sharma B., Negi V., Aswal R.S., Singh P., Singh R., Dobhal R., *Pharmaceutical compounds in drinking water, Journal of Xenobiotics*, 2016, v.6, 5774, 1-7
22. **Chen Y.**, Rosazza J.P.N.: *Microbial transformation of ibuprofen by a Nocardia species*. Applied and Environmental Microbiology, 1994; 60: 1292-1296
23. **Clara M.**, Kreuzinger N., Strenn B., Gans O., Kroiss H., *The solids retention time – a suitable design parameter to evaluate the capacity of wastewater treatment plants to remove micropollutants*, Water Research, 39, 97-106, 2005
24. **Czech B.**, *Usuwanie farmaceutyków z wód i ścieków z wykorzystaniem metod adsorpcyjnych i fotokatalitycznych, Adsorbenty i katalizatory Wybrane technologie a środowisko*, Nr 2/2012, rozdział 24, 443 – 452, wyd. Uniwersytet Rzeszowski
25. **Czerwiński J.**, Kłonica A., Ozonek J., *Pozostałości farmaceutyków w środowisku wodnym i metody ich usuwania*, Czasopismo Inżynierii Lądowej, Środowiska i Architektury, 2015, 67, 27-42
26. **D'Ascenzo G**., DiCorcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R., *Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities*, Science of the Total Environment , 2003 302:199–209
27. **Daneshvar A**., Svanfelt J, Kronberg L, Weyhenmeyer GA. *Winter accumulation of acidic pharmaceuticals in a Swedish River*, Environmental Science and Pollution Research, 17:908-916,2010
28. **Davies N.M.**, Anderson K.E. *Clinical pharmacokinetics of diclofenac therapeutic insights and pitfalls*, Clin Pharmacokinet 1997;33:184–213
29. **Dymaczewski Z**., Poradnik Eksploatatora Oczyszczalni Ścieków, praca zbiorowa, wyd. Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych Oddział Wielkopolski, Poznań, 2011
30. **Dyrektywa 2001/20/WE** Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej z dnia 4 kwietnia 2001 r. dotycząca zbliżania przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych Państw Członkowskich odnoszących się do wdrożenia zasad Dobrej Praktyki Klinicznej w prowadzeniu badań klinicznych produktów leczniczych przeznaczonych do stosowania przez człowieka, *Dz.U.,* 2001, L 121, str. 34
31. **Dyrektywa 2001/82/WE** Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej z dnia 6 listopada 2001 r. w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do weterynaryjnych produktów leczniczych, *Dz.U.,* 2001, L 311/1
32. **Dyrektywa 2001/83/WE** Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej z dnia 6 listopada 2001 r. w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi, *Dz. U*., 2001, L311/67
33. **Dyrektywa 2004/24/WE** Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej z dnia 31 marca 2004 r. zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE w sprawie wspólnotowego kodeksu dotyczącego produktów leczniczych stosowanych u ludzi, w odniesieniu do tradycyjnych ziołowych produktów leczniczych, *Dz. Urz. UE,* 2004, 136/85
34. **Dyrektywa 2004/27/WE** Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej z dnia 31 marca 2004 r. zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi, *Dz. Urz. UE,* 2004, L136/34
35. **Dyrektywa 2004/28/WE** Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej z dnia 31 marca 2004 r. zmieniająca dyrektywę 2001/82/WE w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do weterynaryjnych produktów leczniczych, *Dz. Urz. UE,* 2004,136/58
36. **Dyrektywa 2006/C 132/08**, Wytyczne dotyczące definicji potencjalnego poważnego zagrożenia dla zdrowia ludzi lub zwierząt lub dla środowiska naturalnego w kontekście art. 33 ust. 1 i 2 dyrektywy 2001/82/WE – marzec 2006, *Dz. Urz. UE*, 2006, nr 132
37. **Dyrektywa Komisji 2009/120/WE** z dnia 14 września 2009 r. zmieniająca dyrektywę 2001/83/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego

się do produktów leczniczych stosowanych u ludzi w zakresie produktów leczniczych terapii zaawansowanej [Dz.U.UE. L 242/3 z 15.9.2009]
38. **Dyrektywa Komisji 2009/9/WE** z dnia 10 lutego 2009 r. zmieniająca dyrektywę 2001/82/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do weterynaryjnych produktów leczniczych [Dz.U. L 311 z 28.11.2001]
39. **Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/53/WE** z dnia 18 czerwca 2009 r. zmieniająca dyrektywę 2001/82/WE i dyrektywę 2001/83/WE w odniesieniu do zmian warunków pozwoleń na dopuszczenie do obrotu produktów leczniczych [Dz.U.UE, L168/33, 30.6.2009]
40. **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 [Dz. Urz. UE L226/1 24.8.2013]
41. **Dyrektywa Rady z dnia 21 maja 1991** r. dotycząca oczyszczania ścieków komunalnych, 91/271/EWG, Dz. Urz. WE L 135/40 z 30.05.1991., str. 40-52, z późn. zm.; *Dz. Urz. WE* Polskie wydanie specjalne, rozdz. 15, t. **002**, str. 26
42. **Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej** z dnia 20 marca 2015r. ustanawiająca listę obserwacyjną substancji do celów monitorowania obejmującego całą Unię w zakresie polityki wodnej na podstawie dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE [Dz. Urz. UE L78/40, 24.3.2015]
43. **Ensano B. M. B.**, Borea L., Naddeo V., Belgiorno V., de Luna M. D. G., Ballesteros F.C. Jr. *Removal of Pharmaceuticals from Wastewater by Intermittent Electrocoagulation*, Water, 9,85,2017
44. EU Parliament vote allows water pollution from pharmaceuticals to continue, post, 28 November 2012 (http://wwf.panda.org:/what_we_do/how_we_work/policy/wwf_europe_environment/news/?206870/EU-Parliament-vote-allows-water-pollution-from-pharmaceuticals-to-continue), odczyt z dn. kwiecień 2017 r.
45. **Felis E.**, Miksch K., Sikora J.: *Występowanie i możliwości usuwania farmaceutyków w Polsce*, Materiały konferencyjne, VII Ogólnopolska Sesja Popularnonaukowa, „Środowisko a zdrowie - 2005", Częstochowa, 2005
46. **Fent K.**, Weston A.A., Caminada D., *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*, Aquatic Toxicology 76, p. 122-159, 2006
47. **Ferrari B.**, Paxéus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., *Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac*. Ecotoxicology and Environmental Safety 55, 2003, 359–370.
48. **Fick J.**, Lindberg R.H., Tysklind M., Larsson D.G.J.: *Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals*, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 516-523, 2010
49. **Gadipelly Ch.**, Perez-Gonzalez A., Yadav G.D., Ortiz I., Ibanez R., Rathod V.K., Marathe K.V., *Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse*, Industrial & Engineering Chemistry Research, 2014, 53, 11571-11592
50. **Galmier M.J.**, Bouchon B., Madelmont J.-C., Mercier F., Pilotaz F., Lartigue C., *Identification of degradation products of diclofenac by electrospray ion trap mass spectrometry*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analusis, 38, 790-796, 2005
51. **Gholami M.**, Mirzaei R., Kalantary R.R., Sabzali A., Gatei F., *Performance evaluation of reverse osmosis technology for selected antibiotics removal from synthetic pharmaceutical wastewater*, Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering, 2012, 9:19
52. **Gilbert N.**, *Nature ,* 27 November, 2012, 491, 503-504
53. **Ginter-Kramarczyk D.**, Zając A., Kruszelnicka I., Zembrzuska J., Budnik I., *Teraźniejszość i przyszłość produktów leczniczych w społeczeństwie i środowisku, Przemysł Chemiczny*, 2013, 92/5, 596-600
54. Global Ibuprofen Consumption 2016 Market Research Report: https://www.medgadget.com /2017/03/global-ibuprofen-consumption-2016-market-research-report.html]
55. Główny Inspektor Sanitarny, Stan sanitarny Kraju w roku 2015
56. Główny Urząd Statystyczny, Rocznik Statystyczny Rzeczypspolitej Polskiej, Zakład Wydawnictw Statystycznych, 2014r.

57. **Gomez M.J.**,Martinez Bueno M.J., Lecorte S., Fernandez-Alba A.R., Aguera A., *Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast*, Chemosphere, 66, 993-1002, 2007
58. **Guedidi H.**, Reinert L., Soneda Y., Bellakhal N., Duclaux L., *Adsorption of ibuprofen from aqueous solution on chemically surface-modified activated carbon cloths*, Arabian Journal of Chemistry, 2014, 10, 2017, S3584-S3594
59. **Guzik U.**, Hupert-Kocurek K., Mazur A., Wojcieszyńska D., *Biotransformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, XLVI, 2013, 1, 105-112
60. **Halling-Sorenson B.**, S. N. Nielsen, P. F. Lanzsky, Ingerslev, F., H. C. Lutzhoft and S. E. Jorgensen, Occurrence, fate and effect of pharmaceutical substances in the environment- A review. Chemosph, 1998, 38: 357- 393
61. **Han J.**, Qiu Wei, Meng Suwan, Gao Wei, *Removal of ethinylestradiol (EE2) from water via adsorption on aliphatic polyamides*, Water Res., 2012, 46, 5715-5724,
62. **Heberer T.**, *Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*, Toxicology Letters, 2002, 131/1-2, 5-17
63. **Helenkar A**., Sebők A., Zaray G., Molnar-Perl I. *The role of the acquisition methods in the analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs in Danube River by gas chromatography - mass spectrometry*, Talanta, 82:600-607, 2010
64. **Henry D.**, In: M., O.′.R. (Ed.), Widely Used Diclofenac Associated With Increased Risk for Cardiovascular Events. Heartwire, Toronto, 2013, www.medscape.com.
65. **Hernando M.D.**, Gomez M.J., Aguera A., Fernandez-Alba A.R.: *LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blokers and anti-ulcer agent) in wastewater and surface water*, Trends in Analytical Chemistry, 26, No.6, 2007
66. **Ho L.**, Grasset C., Hoefel D., Dixon M. B., Leusch F.D.L., Newcombe G., Saint Ch.P., Brookes J.D., *Assessing granular media filtration for the removal of chemical contaminants from wastewater*, Water Resources, 2011, **45**, 3461-3472
67. **Hoeger B.**, Kollner B., Dietrich D.R., Hitzfeld B., *Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (Salmo trutta f. Fario)*, Aquatic Toxicology, 2005 75(1) 53-64
68. **Huang M.**, Qi F., Wang J., Xu Q., Lin L., *Changes of bacterial diversity and tetracycline resistance in sludge from AAO systems upon exposure to tetracycline pressure*, Journal of Hazardous Materials, 298, 2015, 303–309
69. https://bazalekow.mp.pl/leki/doctor_subst.html?id=227, odczytano 04.2017
70. https://bazalekow.mp.pl/leki/doctor_subst.html?id=382, odczytano 04.2017
71. http://mowimyjak.se.pl/zdrowie/profilaktyka-i-leczenie/leki-bez-recepty-ibuprofen-paracetamol-naproksen-dzialanie-bezpieczne-czy-nie,168_59792.html
72. http://www.eapteki.info/przyszlosc-aptek-internetowych-perspektywy-2012/, (Przyszłość aptek internetowych. Perspektywy, 2012 r.), odczyt z kwietnia 2017 r.
73. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX%3A32013L0039, odczytano 07.2017
74. https://chemicalize.com/#/calculation, odczytano 09.2017
75. http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2925.html, odczytano 04.2017
76. http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3544.html?rid=4c69669f-4fc7-45f3-9086-3122a9cea0ef&page_num=0, odczytano 04.2017
77. http://www.damian.pl/270,116,263,Zastosowanie-beta-blokerow-endokrynolog-kardiolog,news.htm, odczytano 04.2017
78. http://www.europarl.europa.eu/atyourservice/pl/displayFtu.html?ftuId=FTU_5.4.4.html, odczytano 07.2017
79. https://www.gif.gov.pl/bip/rejestry/106,Rejestry.html, odczytano: 08.2017
80. http://www.gornicki.pl/uploads/TiShop/127/Leki_generyczne_w_Polsce_11-2012.pdf, (*Leki generyczne w Polsce*), odczyt z 04.2017
81. http://www.lekinacodzien.pl/2013/10/21/przeciwbolowe-ile-mozna/, odczytano: 08.2017
82. http://www.marketing-news.pl/message. Php ?art=46792, odczytano: 04.2017
83. http://www.mpu.pl/studium/index.php?studium=160, odczytano: 10.2017

84. http://www.poradnikzdrowie.pl/zdrowie/domowa-apteczka/porownanie-lekow-przeciwbolowych-paracetamol-ibuprofen-aspiryna_41634.html, odczytano: 08.2017
85. http://www.producencilekow.pl/images/pigulki/Pigulka_54.pdf, odczytano 10.2017
86. http://www.pzh.gov.pl/epimeld
87. https://www.R-project.org/, R Core Team (2017). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL, odczyt 06.2017
88. http://www.rynekaptek.pl/marketing-i-zarzadzanie/rynek-farmaceutyczny-w-okresie-styczen-wrzesien-2017,22823_4.html, odczytano 10.2017
89. http://rynekmedyczny.polki.pl/Przychodnie,Kielce,%C5%9Bwi%C4%99tokrzyskie,p,VDHHN,1, odczytano 08.2017
90. http://www.rynekzdrowia.pl/Farmacja/Raport-wartosc-globalnego-rynku-lekow-w-2021-r-wyniesie-1-5-bln-USD,168467,6.html, odczytano: 04.2017
91. https://www.weatheronline.pl/weather/maps/city, odczytano: 08.2017
92. http://www.rzekipolski.info/warta.html, odczytano 08.2017
93. http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/grypa/index.htm, odczytano 04.2017
94. **Huschek G.**, Hansen, P.D., Maurer, H.H., Krengel, D., Kayser, A., *Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations*. Environmental Toxicology 19 (3), 2004, 226–240.
95. **Hyungkeun R.**, Subramanya N., Zhao Fuman, Yu Chang-Ping, Sandt J., Chu Kung-Hui, *Biodegradation potential of wastewater micropollutants by ammonia-oxidizing bacteria*, Chemosphere 1087-1089, 2009
96. IMS Intelligence Applied, Analiza skutków wprowadzenia nowej ustawy na rynek farmaceutyczny, 2011
97. **Ioannou L.A.**, Hapeshi E., Vasquez M.I., Mantzavinos D., Fatta-Kassinos D., *Solar/TiO_2 photocatalytic decomposition of β-blockers atenolol and propanolol in water and wastewater*, Solar Energy, 2011, 85, 1915-1926
98. **Jenicek P.**, Zabranska J., Dohanyos M., *The influence of anaerobic pretreatment on the nitrogen removal from biosynthetic pharmaceutical wastewaters*, Antonie van Leeuwenhoek, 69, 1996, 41-46
99. **Jiang C.**, Geng J., Hu H., Ma H., Gao X., Ren H., *Impact of selected non-steroidal anti-inflammatory pharmaceuticals on microbial community assembly and activity in sequencing batch reactors*, Plos One. 12 (6), 2017
100. **Jiang L.**, Yang J., Chen J.: *Isolation and characteristics of 17β-estradiol-degrading Bacillus spp. strains from activated sludge*, Biodegradation, 2010
101. **Jones O.A. H.**, Voulvoulis, N., Lester, J.N., *Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals*. Water Resources. 36 (20), 2002, 5013–5022
102. **Jones O.A. H.**, Voulvoulis, N., Lester, J.N., *The occurrence and removal of selected pharmaceutical compounds in a sewage treatment works utillsing activated sludge treatment,* Environment Pollution, 145, 738-744, 2007
103. **Joss A.**, Keller E., Alder A. C., Göbel A., McArdell C. S., Ternes T. Siegrist H., *Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment*, Water Research, 39, 14, 3139-3152, 2005
104. **Karpińska J.**, Sokół A., Staneczko-Baranowska I., Kojło A., *Badania szybkości degradacji wybranych leków w układach modelowych i w próbkach wód rzecznych*, 2013
105. **Kasprzyk-Hordern B.**, Dinsdale RM, Guwy AJ. *The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters*. Water Research, 43:363-380, 2009
106. **Kawabata K.,** Sugihara K. , Sanoh S. , Kitamura S. , Ohta S., *Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment by sunlight and UV-A, -B and -C irradiation*, The Journal of Toxicological Sciences, 2013;38(2):215-23
107. **Khan S.J.**, Ongerth, J.E., *Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations*. Chemosphere 54 (3), 2004, 355–367
108. **Khetan S.K.**, Collins T.J., *Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environmrnt: A Challenge to Green Chemistry*, Chemical Reviews, 107, 2319-2364, 2007

109. **Kim M.**, Guerra P., Shah A., Parsa M., Alaee M. , Smyth S. A., *Removal of pharmaceuticals and personal care products in a membrane bioreactor wastewater treatment plant*, Water Science and Technology, 69,11, 2014, 2221- 2229
110. **Kimura K.**, Hara H., Watanabe Y., Removal of pharmaceuticals compounds by submerged membrane bioreactors (MBRs), Desalination, 178, 135-140, 2005
111. **Kimura K.**, Hara H., Watanabe Y., *Elimination of selected pharmaceuticals by biosolids from municipal wastewater treatment plants: importance of modest pH change and degree of mineralization*, Water and Science & Technology 62.5, 2010, IWA Publishing
112. **Kizer M.A.**, Smolen M.D., *Treatment Methods for Removal of Pharmaceuticals and Hormones from Drinking Water*, Oklahoma State University, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, 2008
113. **Kocwa-Haluch R.**, Woźniakiewicz T., *Analiza mikroskopowa osadu czynnego i jej rola w kontroli procesu technologicznego oczyszczania ścieków*, Środowisko, Czasopismo Techniczne wydawnictwo Politechniki Krakowskiej, 2011, zeszyt 6, p. 141-162
114. Komunikaty prasowe: http://biznes.pl/magazyny/medycyna/farmacja/swiatowy-przemysl-farmaceutyczny-jest-w-lepszej-ko,5145397,magazyn-detal.html, odczyt 04.2017
115. **Kosjek T.**, Heath E., Kompare B. *Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant*, Springer-Verlag, 2007
116. **Kosjek T**., Heath E., Krbavčič A. *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples*, Environment International, 31:679-685, 2005
117. **Koszowska A.**, Ebisz M., Krzyśko-Łupicka T., *Farmaceutyki i środki kosmetyczne w środowisku wodnyn jako nowy problem zdrowia środowiskowego*, Medycyna Środowiskowa, 18, 1, 62-69, 2015
118. **Kot-Wasik A.**, Dębska J., Namieśnik J.: Przemiany, stężenia i oznaczania pozostałości środków farmaceutycznych w środowisku, 2003
119. **Kraigher B.**, Kosjek T., Heath E., Kompare B., Mandic-Mulec I., Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in wastewater treatment bioreactors, Water Research, 42, 2008, 4578-4588
120. **Kruglova A.**, Ahlgren P., Korhonen N., Rantanen P., Mikola A., Vahala R., *Biodagradation of ibuprofen, diclofenac and carbamazepine in nitrifying activated sludge under 12^{o}C temperature conditions*, Science of the Total Enivironment 499, 394-401, 2014
121. **Kruglova A.**, Kråkström M., Riska M., Mikola A., Rantanen P., Vahala R., Kronberg L. *Comparative study of emerging micropollutants removal by aerobic activated sludge of large laboratory-scale membrane bioreactors and sequencing batch reactors under low-temperature conditions*, Bioresource Technology, 214, 81-88, 2016
122. **Kruszelnicka I.**, Ginter-Kramarczyk D., „Farmaceutyki w ściekach", magazyn Ochrona Środowiska, 2012, nr 5/2012, 46-47,
123. **Kruszelnicka I.**, Ginter-Kramarczyk D., Michałkiewicz M., Kloziński A., Zajchowski S., Jakubowska P., Tomaszewska J., *Kompozyty polimerowo-drzewne w technologii zawieszonego złoża ruchomego*, Polimery, 2014, tom 59, nr 10, 739-746
124. **Kruszelnicka I.**, Ginter-Kramarczyk D., Michałkiewicz M., Zajchowski S., Kloziński, J. Tomaszewska A., *The use of Wood-polymer composites in Moving Bed Biofilm Reactor Technology*, Polimery, 2014, tom 59, nr 5, 423-426
125. **Kuczyńska A.**, Wolska L., Namieśnik J., Rozdział 32. Zastosowanie biotestów w badaniach środowiskowych. s. 667-698. W: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. Red. Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P. Wydawca: Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego (CEEAM), Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, 2003, 807
126. **Kudlek E.** , Bohdziewicz J., Dudziak M., Grübel K. *Oznaczanie wybranych niesteroidowych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych w środowisku wodnym*, Proceedings of ECOpole, 9, 2, 2015
127. **Kujawa-Roeleveld K.**, Schuman K., Grotenhuis K., Kragić K., Mels A., Zeeman G., *Biodegradability of human pharmaceutically active compounds (PhAC) in biological systems treating source separated wastewater streams*, Switch Scientyfic Meeting, Wageningen, the Netherlands, 2008,

128. **Kummerer K**. *Pharmaceuticals in Environment*, Annual Rewiew of Environmental and Resources, 57-76, 35,2010
129. **Kummerer K.**, Henninger A., *Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent*, Clinical Microbiology and Infection, vol. 9, 2003, 12, 1203-1214,
130. **Lai K.**, Scrimshaw M.D., Lester J.N., *Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems*, Science Total Environment, 2002, 289, 159-168
131. **Langenhoff A.**, Inderfurth N., Veuskens T., Schraa G., Marco Blokland M, Kujawa-Roeleveld K., Rijnaarts H., *Microbial Removal of the Pharmaceutical Compounds Ibuprofen and Diclofenac from Wastewater*, BioMed Research International, 2013
132. **Larsson E.**, al.-Hamimi S., Jonsson J.A., *Behaviour of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and eight of their metabolites during wastewater treatment studied by hollow fibre liquid phase microextraction and liquid chromatography mass spectrometry*, Science of the Total Environment 485–486, 300–308, 2014
133. **Lee E.J.D.**, Williams K., Day R., Graham G., Champion D., *Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers man. Br J Clin Pharmacol* , 1985, 19:669–674
134. **Li X.**, Li G., A Review: *Pharmaceutical Wastewater Treatment Technology and Research in China*, Asia-Pacific Energy Equipment Engineering Research Conference, 2015
135. **Lin A.Y.**, Lin C.A., Tung H.H., Chary N.S., *Potential for biodegradation and sorption of acetaminophen, caffeine, propanolol acebutolol in lab-scale aqueous environments*, Journal of Hazardous Materials, 242-250, 15, 183 (1-3), 2010
136. **Lin K.**, Gan J., *Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils*, Chemosphere, 2011, **83**, 240-246
137. **Lindqvista N.**, Tuhkanenb T., Kronberga L., *Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters*, Water Research, 2005, 35, 2219-2228
138. **Lindsay J.,** Oaks M., Gilbert M., Virani Z., Watson T. R., T. R. Meteyer T. R., Rideout B.A., Shivaprasad H.L., Ahmed S., Chaudhry M. J. I. C., Arshad M., Mahmood S., Ahmad Ali &Aleem Ahmed Khan, *Nature,* 2004, **427**, 639-633
139. **Liziniewicz J.**, W. Kamiński, *Gazeta Polska*, 29 stycznia 2013 r., s. 3
140. **Lonappan L.**, Kaur Brar S., Kumar Das R., Verma M., Surampalli R.Y., *Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity- A review*, 96, 2016, 127-138.
141. **Lubliner B.**, Redding M., Ragsdale M., *Pharmaceutical and Personal Care Products in Municipal Wastewater Treatment and Their Removal by Nutrient Treatment Technologies*, Washington State Department of Ecology, Olympia, WA Publication Number 10-3-004, 2010
142. **Luo Y**., Guo W., Ngo H-H, Nghiem L-D, Hai F-I., Zhang J., Liang S., Wang X.C., Science of the Total Environment 619, 473-474, 2014
143. **Łebkowska M.**, Załęska-Radziwiłł M., Affek K., Substancje farmaceutyczne w środowisku wodnym – występowanie i zagrożenia, Gaz, Woda i Technika Sanitarna, 2012, 129-133
144. **Kondrat M.**, Całkowity zakaz reklamy aptek po 1 stycznia 2012 r. (http://www.zdrowie.abc.com.pl/czytaj/-/artykul/calkowity-zakaz-reklamy-aptek-po-1-stycznia-2012-r), odczyt z kwietnia 2017 r.
145. Magill's Medical Guide, *Anti-inflammatory drugs*, Sixth Edition, Salem Press, 2010
146. **Makuch A.**, *Biologiczne usuwanie związków azotu ze ścieków zawierających sulfonamidy*, Rozprawa doktorska, Gdańsk, 2009
147. Mały Rocznik Statyczny Polski 2017, Zakład Wydawnictw Statystycznych, Warszawa 2017
148. **Marciocha D.**, Raszka A., Kalka J., Górska-Surmacz J., *Leki w środowisku. Sulfametoksazol i trymetoprim jako jedne z najczęściej wykrywanych chemioterapeutyków w środowisku wodnym*, Wydawnictwo Komitetu Inżynierii Środowiska PAN, Lublin, 145-156, 2009
149. **Marco-Urrea E.**, Pérez-Trujillo M., Vicent T., Caminal G.: Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identifi cation of degradation products of ibuprofen by Trametes versicolor. Chemosphere, 2009; 74: 765-772
150. **Martín J.**, Camacho-Munoz D., Santos J.L., Aparicio I., Alonso E., *Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal*, Journal of Hazardous Materials, 2012 239–240, 40–47

151. **Melero J.A.**, Martinez F., Botas J.A., Molina R., Pariente M.I., *Heterogeneous catalytic wet peroxide oxidation systems for the treatment of an industrial pharmaceutical wastewater*, Water Research 43, 2009, 4010-4018
152. **Mestre A.S.**, Pires J., Nogueira J.M.F., Carvalho A.P., *Ibuprofen Adsorption on Activated Carbons Developed from Cork Waste*, Carbon, 2007, 45, 1979-1988
153. **Metzger M.**, *Identyfikacja rodzaju substancji lekowych w ściekach z w wybranych zakładach farmaceutycznych, praca magisterska*, Poznań, 2013,
154. **Miao X.-S.**, Yang, J.-J., Metcalfe, C.D., *Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant*, Environmental Science & Technology 39, 2005 7469–7475.
155. **Mielżyńska-Svach D.**, Control of hazardous substances in the Baktic Sea Region, prezentacja power point zrealizowana w ramach projektu COHIBA współfinansowanego przez unijny Program Region Morza Bałtyckiego 2007-2013Hoeger B., Kollner B., Dietrich D.R., Hitzfeld B., W*ater-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (Salmo trutta f. Fario)*. Aquatic Toxicology 75(1), p. 53-64, 2005
156. **Murdoch K.**, *Pharmaceutical Pollution in the Environment: Issues for Australia, New Zealand and Pacific Island countries*, National Toxics Network, Australia, 2015
157. **Murdoch R.W.**, Hay A. G., *The biodegradation of ibuprofen to trihydroxyibuprofen in activated sludge and by Variovorax Ibu-1*, Biodegradation, 26, 105-113, 2015
158. **Nakada N.**, Tanishima T., Shinoohara H., Kiri K., Takada H., *Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment*, Water Resources, 40, 3297-3303, 2006
159. **Nosek K.**, Styszko K., Gołaś J.: *Badanie obecności wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), triclosanu i bis fenolu A w ściekach komunalnych techniką chromatografii gazowej z detektorem mas (GC/MS)*
160. Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 10 lutego 2017 r. *w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym odprowadzaniu ścieków* [Dz.U. 2017, poz. 328]
161. Obwieszczenie Ministra Infrastruktury i Budownictwa z dnia 28 września 2016 r. *w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu rozporządzenia Ministra Budownictwa w sprawie sposobu realizacji obowiązków dostawców ścieków przemysłowych oraz warunków wprowadzania ścieków do urządzeń kanalizacyjnych*, Dz. U., 2016, poz. 1757
162. Obwieszczenie Prezesa Urzędu Rejesracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych z 30 marca 2017r. w sprawie ogłoszenia Urzędowego Wykazu Produktów Leczniczych Dopuszczonych do obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej [Dz.U Min. Zd. z 2017, poz. 45] z dnia 31 marca 2017r., http://dziennikmz.mz.gov.pl/api/DUM_MZ/2017/45/akt.pdf odczyt z dnia 25.04.2017r.
163. **Onal Y.**, Akmil-Basar C., Sarici-Ozdemir C., *Elucidation of the naproxen sodium adsorption onto activated carbon prepared from waste apricot: kinetic, equilibrium and thermodynamic characterization*, Journal of Hazardous Materials, 2007, 148, 727-734
164. **Pabitra B.**, Evaluation of toxicity of pharmaceuticals to the activated sludge treatment plant, praca magisterska, Finlandia, 2010
165. **Palmer E.**, Top 20 generic molecules worldwide, 2012, wwwfiercepharmacom
166. **Pereira A.M.**, Silva L.J., Meisel, L.M., Lino C.M., Pena A., *Environmental impact of pharmaceuticals from Portuguese wastewaters: geographical and seasonal occurrence, removal and risk assessment*, Environmental Research, 136, 108-119, 2015
167. **Pilkiewicz M.**, Rynek Farmaceutyczny 2012 – wpływ nowej ustawy na konsumpcję leków w Polsce, IMS Health, Poland, 2012
168. **Quintana J.B.**, Weiss S., Reemttsma T., *Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor*, Water Research, 39(12), 2654-2664, 2005
169. **Rabiet M.**, Togola A., Brissaud F., Seidel J-L., Budzinski H., Elbaz-Poulichet F., *Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized Mediterranean catchment*, Environmental Science&Technology, 40, 5282-5288, 2006

170. **Radjenovic J.**, Petrovic M., Barceló D., *Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a memtrane bioreactor*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387, 1365-1377, 2007
171. **Rainsford K.D.** *Ibuprofen Discovery, Development and Therapeutics* Biomedical Research Centre, Sheffield Hallam University, UK, 2015 John Wiley & Sons
172. **Reungoat J.**, Escher B.I., Macova M., Keller J.*, Biofiltration of wastewater treatment plant effluent: effective removal of pharmaceuticals and personal care products and reduction of toxicity*. Water Research 45:2751–2762, 2011
173. **Rivera-Jimenez S.M.**, Hernandez-Maldonado A.J.*, A Novel Sorbent foe the Removal of Naproxen from Water*, Microporous and Mesoporous Materials, 2008, **116**, 246-252
174. **Rizzo L.**, Fiorentino A., Grassi M., Attanasio D., Guida M., *Advanced treatment of urban wastewater by sand filtration and graphene adsorption for wastewater reuse: Effect on a mixture of pharmaceuticals and toxicity*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 2015, 3, 122-128
175. **Roberts P.H.**, Thomas K.V., *The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment*, Science of Total Environment, 356(1-3), 143-153, 2005
176. **Rosenberg E.** *Analytical techniques for the determination of organic and metal – organic analytes*, Analytical measurements in aquatic ecosystem (red. Namieśnik J., P. Szefer), CRC Press, 2009
177. **Rozporządzenia** Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej **854/2004** z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące organizacji urzędowych kontroli w odniesieniu do produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi*, Dz. Urz. UE,* 2004, 226/83
178. **Rozporządzenie (We) Nr 726/2004** Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 31 marca 2004 r. ustanawiająca *wspólnotowe procedury wydawania pozwoleń dla produktów leczniczych stosowanych u ludzi i do celów weterynaryjnych i nadzoru nad nimi oraz ustanawiające Europejską Agencję Leków* [Dz.U. L 136 z 30.4.2004]
179. **Rozporządzenie (WE) Nr 882/2004** Parlamentu Europejskiego i Rady Unii Europejskiej z dnia 29 kwietnia 2009 r. w sprawie kontroli urzędowych, przeprowadzonych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt, *Dz. Urz. UE,* 2009, 191/1
180. **Rozporządzenie** Ministra Zdrowia z dnia 21 listopada 2008 r. *w sprawie reklamy produktów leczniczych*, Dz.U. 2008, Nr 210, poz. 1327
181. **Rozporządzenie Ministra Zdrowia** z dnia 27 lutego 2012 r. *w sprawie szczegółowych warunków i trybu postępowania ze środkami odurzającymi, substancjami psychotropowymi i prekursorami kategorii 1, ich mieszaninami oraz produktami leczniczymi, zepsutymi, sfałszowanymi lub którym upłynął termin ważności, zawierającymi w swoim składzie środki odurzające, substancje psychotropowe lub prekursory kategorii 1*, Dz.U. 2012., poz. 236
182. **Rozporządzenie Ministra Środowiska** z dnia 18 listopada 2014r. *w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi, oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego*, Dz.U. z 2014r. poz. 1800
183. **Rozporządzenie Ministra Zdrowia** z dnia 13 listopada 2015 r. *w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi* [Dz.U. 2015, poz. 1989]
184. **Rozporządzenie Ministra Zdrowia** z dnia 16 marca 2017 r. *w sprawie szczegółowych warunków i trybu wydawania pozwoleń oraz dokumentów niezbędnych do przywozu, wywozu, wewnątrzwspólnotowego nabycia lub wewnątrzwspólnotowej dostawy środków odurzających, substancji psychotropowych lub prekursorów kategorii* , Dz.U. 2017, poz. 686.
185. **Rozporządzenie Rady Ministrów** z dnia 6 marca 2017r. *zmieniające rozporządzenie w sprawie opłat za korzystanie ze środowiska* [Dz.U. 2017, poz. 723]
186. **Rudy A.C.**, Knight P.M., Brater D.C., Hall S.D., *Stere-oselective metabolism of ibuprofen in humans: administration of R-S- and racemic ibuprofen*, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1991, 259:1133–1139
187. **Saleem M.**, *Pharmaceutical wastewater treatment: A physicochemical study*, Journal of Research (Science), 18, 2, 125-134, 2007

188. **Samaras V.G.**, Stasinakis A.S., Mamais D., Thomaidis N. S., Lekkas T. D. *Fate of selected pharmaceuticals and synthetic endocrine disrupting compounds during wastewater treatment and sludge anaerobic digestion*, Journal of Hazardous Materials, volumes 244-245, 259-267, 2013
189. **Santos Lucia H.M.L.M.**, Araujo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M., *Journal of Hazardous Materials*, **175**, 45-95,2010
190. **Schroder P.**, Helmreich B., Skrbić B., Carballa M., Papa M., Pastore C., Emre Z., Oehmen A., Langenhoff A., Molinos M., Dvarioniene, Huber C., Tsagarakis K.P. Martinez-Lopez E., Meric Pagano S., Vogelsang C., Mascolo G., *Status of hormones and painkillers in wastewater effluents across several European states considerations for the EU watch list concerning estradiols and diclofenac*, Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23, 12835-12866
191. **Schwab B.W.**, Hayes E.P., Fiori J.M., Mastrocco F.J., Roden N.M., Cragin D., Meyerhoff R.D., D'Aco V.J., Anderson P.D., *Human pharmaceuticals in US surface waters: a human healt risk assessment*, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005, 42 , 296-312
192. Sektor farmaceutyczny i biotechnologiczny w Polsce, Departament Informacji Gospodarczej Polska Agencja Informacji i Inwestycji Zagranicznych S.A., Warszawa, 2011
193. **Serrano D.**, Suarez S., Lema J.M., Omil F., *Removal of persistent pharmaceutical micropollutants from sewage by addition of PAC in a sequential membrane bioreactor*, Water Resources, 2001,45, 5323-5333
194. **Shala L.**, Foster G.D. *Surface water concentrations and loading budgets of pharmaceuticals and other domestic-use chemicals in an urban watershed (Washington, DC, USA)*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 58:551-561, 2010
195. **Sires I.**, Brilas E., „Remediation of water pollution caused by pharmaceutical residues based on electrochemical separation and degradation technologies: A review", Environmental International, 2012, 40, 212-229
196. **Sosnowska K.**, Styszko-Grochowiak K., Gołaś J.: Leki w środowisku – źródła, przemiany, zagrożenia, 2009
197. **Sosnowska K.**, Szyszko K., Gołaś J., *Wstępne oznaczenie diklofenaku w ściekach oczyszczonych techniką chromatografii gazowej z detektorem mas (GC/MS)*, Materiały Krakowskiej Konferencji Młodych Uczonych,Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica ; Grupa Naukowa Pro Futuro. — Kraków: Sympozja i Konferencje KKMU ; nr 5 — Na okł. tyt.: V Krakowska Konferencja Młodych Uczonych. S. 353–364, 2010
198. **Stackelberg P.E.**, Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Henderson A.K., Reissman D.B., *Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant*, Science of the Total Environment, Vol. 329, No. 1-3, 2004, 99-113
199. **Stasinakis A.S.**, Mermigka S., Samaras V.G., Farmaki E. *Occurrence of endocrine disrupters and selected pharmaceuticals in Aisonas River (Greece) and environmental risk assessment using hazard indexes*, Environmental Science and Pollution Research, 19:1574-1583, 2012
200. **Stefańczyk M.**, Rynek farmaceutyczny w Polsce: w latach 2011 - 2013 tylko umiarkowany wzrost, 2011
201. **Stierlin H.**, Faigle J.W. *Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren®) in animals and in man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile*. Xenobiotica 1979; 9(10):611–21
202. **Strenn B.**, Clara, M., Gans, O., Kreuzinger, N., *Carbamazepine, diclofenac, ibuprofen and bezafibrate – investigations on the behaviour of selected pharmaceuticals during wastewater treatment*, Water Science & Technology 50, 2004, 269– 276
203. **Stuart M.**, Lapworth D., Crane E., Hart A.: *Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater*, 2012, 1-12
204. **Stuer-Lauridsen, F.**, Birkved, M., Hansen, L.P., Lutzhoft, H.C., Halling-Sorensen, B., *Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use*, Chemosphere 40 (7), 2000, 783–793
205. **Suarez S.**, Lema J.M., Omil F., *Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) under nitrifying and denitrifying conditions*, Water Research 44, 3214-3224, 2010
206. **Subramanya N.T.**, *Biodegradation of bisphenol a and ibuprofen by ammonia oxidizing bacteria*, Master of Science, Texas A&M University, 2007

207. **Szymczak K.**, *Ocena zawartości substancji czynnych leków przeciwbólowych w ściekach pochodzących z przemysłu farmaceutycznego*, praca magisterska, Poznań, 2015
208. **Szymonik A.**, Lach J., *Zagrożenia środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych*, Inżynieria i Ochrona Środowiska, 2012, 15, 3, 249-263
209. **Szyprowska M.**, Wichowski P., Stępień P., *Badania procesów beztlenowego oczyszczania ścieków na przykładzie ścieków z przemysłu farmaceutycznego*, Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich, Nr 7/2011, Polska Akademia Nauk, Oddział w Krakowie, s. 155-168, Komisja Technicznej Infrastruktury Wsi
210. **Tadkaew N.**, Hai F.I., McDonald J.A., Khan S.J., Nghiem L.D., *Removal of trace organics by MBR treatment: the role of molecular properties*, Water Research, 45(8), 2439-2451, 2011
211. **Taewoo Y.**, *Sorption and biodegradation of pharmaceutical compounds in biological wastewater treatment process*, rozprawa doktorska, Auburn University , Auburn, Alabama, grudzień, 2007,
212. **Tang K.**, Ooi G.T.H., Litty K., Sundmark K., Kaarsholm K.M.S., Sund Ch., Kragelund C., Christensson M., Bester K., Andersen H.R., *Removal of pharmaceuticals in conventionally treated wastewater by a polishing moving bed biofilm reactor (MBBR) with intermittent feeding*, Bioresource Technology, 236, 2017, 77-86
213. **Tauxe-Wuersch A**., De Alencastro L.F., Grandjean D., Tarradellas J., *Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment*, Water Resources, 1761-1772, 39, 9, 2005
214. **Teijon G.**, Candela L., Tamoh K., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A.R. .*Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain)*, Science of the Total Environment 408:3584–3595, 2010
215. **Thacker P.D.**, *Pharmaceutical data eludes environmental researchers*, Water Science & Technology 39, 2005, 193A–194A
216. **Thomas M. A.**, Klaper R. D., P*sychoactive Pharmaceuticals Induce Fish Gene Expression Profiles Associated with Human Idiopathic Autism*, Research Article, 2012
217. **Thomas P.M.**, Foster G.D., *Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, caffeine, and triclosan in wastewater by gas chromatography-mass spectrometry*, Journal of Environmental Science and Health, 39, 8, 1969-1978, 2004
218. **Tomska A.**, *Wpływ wybranych farmaceutyków na aktywność dehydrogenaz osadu czynnego*, Inżynieia Ekologiczna, 48, 214-218, 2016
219. **Topp E.**, Monteiro S.C., Beck A., Coelho B.B., Boxall A.B.A., Duenk P.W., Kleywegt S., Lapen D.R., Payne M., Sabourin L., Li H., Metcalfe H., *Runoff of pharmaceutically-active compounds from agricultural land amended with liquid municipal biosolids*, Science of the Total Environment, 2008, **296**, 52-59
220. **Urban I.**, Zużyte i przeterminowane leki zagrażają nie tylko środowisku naturalnemu, ale także naszemu zdrowiu i życiu, (http://www.nazdrowie.pl/artykul/odpady-farmaceutyczne), odczytano 04.2017r.
221. Urzędowy Rejestr Hurtowni Farmaceutycznych – stan na wrzesień 2017r.
222. Ustawa o odpadach z dnia 14 grudnia 2012r. [Dz.U. 2016, poz. 1987]
223. Ustawa *o zmianie przepisów refundacji leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych*, Dz. U., 2012 r., poz. 95
224. Ustawa z dnia 18 lipca 2001 r. *Prawo wodne* [Dz.U. 2017, poz. 1121]
225. Ustawa z dnia 6 września 2001r. *Prawo farmaceutyczne* [Dz. U. 2016, poz. 2142 – tekst jednolity z późn. zm.]
226. **Valcárcel Y**., González Alonso S, Rodríguez-Gil JL, Romo Maroto R. *Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceutical in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain*. Chemosphere;82:1062-1071,2011
227. **Verlicchi P.**, Galletti A., Petrovic M., Barceló D., Al Aukidy M., Zambello E., *Removal of selected pharmaceuticals from domestic wastewater in an activated sludge system followed by a horizontal subsurface flow bed—analysis of their respective contributions*, Science of Total Environment, 454–455:411–425, 2013
228. **Vieno N.**, Sillanpaa M., *Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant – A rewiew*, Environment International 69, 2014, 28-39

229. **Vieno N.**, Tuhkanen, T., Kronberg, L., *Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland*. Water Resources 41, 2007, 1001–1012
230. **Vystavna Y.**, Huneau F., Grynenko V., Vergeles Y. *Pharmaceuticals in rivers of two regions with contrasted socio-economic conditions: occurrence, accumulation, and comparison for Ukraine and France*, Water, Air, & Soil Pollution, 223:2111-2124, 2012
231. **Wandzik I.**, *Materiały pomocnicze do przedmiotu „Związki Biologicznie Aktywne" dla studentów specjalności Chemia Bioorganiczna*, Gliwice, 2013
232. **Wang L**., Ying GG, Zhao JL, Yang XB, Chen F. *Occurrence and risk assessment of acidic pharmaceuticals in the Yellow River, Hai River and Liao River of north China*. Science of the Total Environment, 408:3139-3147, 2010
233. **Wang S.**, Gunsch C.K. *Effects of selected pharmaceutically active compounds on the ammonia oxidizing bacterium Nitrosomonas europaea*, Chemosphere, 82, 2011, 565–572
234. **Webb S.**, Ternes T., Gibert M., Olejniczak K., *Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water*, Toxicological Letters, 2003, Vol. 142, pp.157
235. Wkład innowacyjnego przemysłu farmaceutycznego w rozwój polskiej gospodarki, Raport, PwC, wrzesień, 2011
236. Wojewódzki Inspektorat Ochrony Środowiska: *Wyniki Badań Potencjału Ekologicznego w punkcie pomiarowo-kontrolnym WARTA-POZNAŃ, MOST ŚW. ROCHA na podstawie wyników badań z roku 2011*, poznan.wios.gov.pl/gis/ocena 2011/Warta-Poznan.pdf
237. World Health Organization, Pharmaceuticals in drinking water, WHO/HSE/WSH/11.05, Raport Światowej Organzacji Zdrowia, 2011
238. **Yang X.**, Flowers R.C., Weinberg H.S., Singer P.C., *Occurrence and Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in an Advanced Wastewater Reclamation Plant*, Water Resources, 2011, 45, 5218-5228
239. **Yu Ch-P.**, Chu K. – Hui, *Occurrence of pharmaceutical and personal care products along the West Prong Little Pigeon River in east Tenessee*, USA, 1281-1286, 2009
240. **Yu Ch-P.**, Roh Hyungkeun, Chu Kung-Hui: *17β-Estradiol-Degrading Bacteria isolated from Activated Sludge*, Environment Science Technology, 486-492, 2007
241. **Yu J.T.**, Bouwer E.J., Coelhan M., *Occurence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent*, Agricultural Water Management, 86, 72-80, 2006
242. **Yu J.T.**, Bouwer E.J., Coelhan M., *Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent*, Agricultural Water Management 2006, 86, 72-80.
243. **Yu Z.**, Peldszus S., Huck P.M., *Adsorption characteristics of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound—Naproxen, carbamazepine and nonylphenol—on activated carbon*, Water Resources, 2008, 42, 2873–2882
244. **Zając A.**, Budnik I., Zembrzuska J., Kruszelnicka I., Ginter-Kramarczyk D., Droga farmaceutyków w środowisku przyrodniczym na terenie województwa wielkopolskiego - źródła występowania, obecność, zagrożenia, Materiały konferencyjne z II studenckiej konferencji naukowej „Produkcja, ekonomia, zarządzanie, marketing i ochrona środowiska – jak to się robi w Wielkopolsce", Gniezno, maj 2013,
245. **Zając A.**, Kruszelnicka I., Ginter- Kramarczyk D., Zembrzuska J., Biologiczne sposoby usuwania zanieczyszczeń z grupy *emerging contaminants* podczas oczyszczania ścieków *Przemysł Chemiczny*, 2016, 95 (2), 263-268
246. **Zając A.**, Zembrzuska J., Kruszelnicka I., Ginter-Kramarczyk D., *Stopień biodegradacji niesteroidowych leków zapalnych w procesach oczyszczania ścieków w dużych aglomeracjach miejskich*, Przemysł Chemiczny, 2014, 93(12) 2265-2269
247. **Zając A.**, Zembrzuska J., Kruszelnicka I., Ginter-Kramarczyk D., *Sposoby usuwania produktów farmaceutycznych i ich metabolitów z wody i ścieków*, Przemysł Chemiczny, 94 (1), 2015,76-80
248. **Zembrzuska J.**, Ginter-Kramarczyk D., Kruszelnicka I., Zając A., *Występowanie Niesteroidowych Leków Przeciwbólowych W Wielkopolsce w ściekach komunalnych i przemysłowych i ich ekotoksykologiczna ocena ryzyka*, Zaopatrzenie w Wodę, jakość i Ochrona Wód, Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych, Oddział Wielkopolski, 979-994, 2016

249. **Zgoła-Grześkowiak A.** *Application of DLLME to isolation and concentration of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples*, Chromatographia, 72:671-678, 2010
250. **Zhang D.**, Luo J., Lee Z.M.P., Maspolim Y., Gersberg R.M., Liu Y., *Characterization of bacterial communities in wetland mesocosms receiving pharmaceutical-enriched wastewater*. Ecological Engineering, 90, 2016, 215– 224
251. **Zhang Y.**, Geißen S.-U., Gal C. *Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies*, Chemosphere, 73,8, 1151-1161, 2008
252. **Zhang Y.Y**., Geng J.J., Ma H.J., Ren H.Q., Xu K., Ding L. *Characterization of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge under tetracycline and sulfamethoxazole selection pressure*. Science of Total Environment 2016; 571: 479–486
253. **Zhao X**., Wang X.C., Chen Z.L., Xu H., Zhang Q.F., *Microbial community structure and pharmaceuticals and personal care products removal in a membrane bioreactor seeded with aerobic granular sludge*, Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 2015, 425–433
254. **Zhou H.**, Zhang Q., Zhang Q., Ma L., Yu B., Li H., Zhou Y., *Removal of clofibric acid and diclofenac during anaerobic digestion of sewage sludge*, Environment Protection Engineerinng, 39, 2013, 4, 63-77
255. **Zounkova R.**, Kovalova L., Blaha L., Dott W.: *Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites*, Chemosphere, 2010, 253- 260
256. **Zwiener C.**, Seeger S., Glauner T., Frimmel F.H., *Metabolites from the biodegradation of pharmaceuticals residues of ibuprofen in biofilm reactors and batch experiments*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372, 569-575, 2002
257. **Żabczyński S.**, Felis E., Surmacz-Górska J., Miksch K., Ternes T., Fate of PPCPs in sequencing batch reactor (SBR), Architecture and Civil Engineering Enviroonment, 127-132, 3/2009

SPIS TABEL

Tabela 1. Obecność diklofenaku i ibuprofenu w środowisku wodnym i ściekach 22
Tabela 2. Skuteczność usuwania diklofenaku za pomocą wybranch metod biologicznych wykorzystujących osad czynny wg danych literaturowych 31
Tabela 3. Skuteczność usuwania ibuprofenu za pomocą wybranch metod biologicznych wykorzystujących osad czynny 31
Tabela 4. Charakterystyka ścieków z wybranych zakładów farmaceutycznych 41
Tabela 5. Produkty lecznicze dopuszczone do obrotu na terenie Polski 42
Tabela 6. Organizacje światowe działające w obszarze ochrony zdrowia 60
Tabela 7. Metody analityczne do oznaczania ibuprofenu i diklofenaku w wodzie i ściekach 64
Tabela 8. Zadania i cele badawcze realizowane w ramach postawionych tez badawczych 72
Tabela 9. Skład pożywki syntetycznej przygotowanej wg normy PN-C-04645:2001 82
Tabela 10. Opisująca rodzaje analizowanych próbek z ibuprofenem w teście statycznym 85
Tabela 11. Metody oznaczania poszczególnych parametrów fizykochemicznych 93
Tabela 12. Skład pierwotnie przygotowywanej pożywki 94
Tabela 13. Zmodyfikowany skład pożywki [w stosunku do Kosjek T i in., 2007] 95
Tabela 14. Skład ostatecznie wytypowanej pożywki 96
Tabela 15. Wartości dopuszczalne wybranych wskaźników zanieczyszczeń na podstawie [Dz.U. z 2014r., poz. 1800] 134
Tabela 16. Zestawienie przekroczeń dopuszczalnych wskaźników zanieczyszczeń przez osad czynny w obecności diklofenaku wg załącznika 4, tabeli 1 Dz. U. z 2014, poz. 1800 135
Tabela 17. Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego w reaktorach R1 i R2 w wybranych dniach prowadzonego testu dynamicznego (okres wpracowania, okres od 1 do 34 dnia testu) 147
Tabela 18. Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego w reaktorach R1 i R2 w wybranych dniach prowadzonego testu dynamicznego (okres wpracowania i pierwszy dzień po zadozowaniu diklofenaku do reaktora R2) 148
Tabela 19. Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego w reaktorach R1 i R2 w wybranych dniach prowadzonego testu dynamicznego (okres dozowania 10mg/L I serii badawczej oraz cykl II badań) 149
Tabela 20. Analiza mikrobiologiczna osadu czynnego w reaktorach R1 i R2 w wybranych dniach prowadzonego testu dynamicznego (okres dozowania diklofenaku w cyklach od III do VI) 150

SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Drogi farmaceutyków w środowisku [opracowanie własne] ... 21
Rysunek 2. Budowa diklofenaku, wzór strukturalny, A – wzór strukturalny, B – model 3D ... 34
Rysunek 3. Ścieżka metaboliczna diklofenaku w ludzkim ciele ... 36
Rysunek 4. Schemat przebiegu procesu metabolizmu postaci wyjściowej (macierzystej leku) ... 36
Rysunek 5. Budowa ibuprofenu, wzór strukturalny A – wzór strukturalny, B – model 3D ... 37
Rysunek 6. Wzory strukturalne ibuprofenu i jego metabolitów ... 39
Rysunek 7. Sposoby odprowadzania ścieków poprodukcyjnych z zakładów farmaceutycznych [opracowanie własne] ... 40
Rysunek 8. Przykładowy schemat 3-stopniowego systemu Bardenpho [opracowanie własne] ... 43
Rysunek 9. Schemat reaktora UASB ... 44
Rysunek 10. Harmonogram prac badawczych w latach 2011-2017 ... 74
Rysunek 11. Mapa obrazująca kierunek biegu rzeki Warty w obszarze miasta Poznania z naniesionymi punktami poboru próbek ... 77
Rysunek 12. Schemat Centralnej Oczyszczalni Ścieków w Koziegłowach z zaznaczonymi miejscami poboru próbek ... 79
Rysunek 13. Schemat stanowiska badawczego przedstawiający sposób przechowywania próbek do analiz [test statyczny-szybkość usuwania ibuprofenu w czasie] ... 83
Rysunek 14. Schemat stanowiska badawczego przedstawiający sposób przechowywania próbek do analiz [test statyczny- analiza rozkładu ibuprofenu dla zmiennych wartości temperatury] ... 84
Rysunek 15. Harmonogram badań testu dynamicznego (okres od wpracowania osadu czynnego do zakończenia badań właściwych z dozowaniem diklofenaku) - opis oznaczeń na str. 88 ... 89
Rysunek 16. Schemat stanowiska badawczego bioreaktorów R1 i R2 ... 90
Rysunek 17. Fazy pracy układu dynamicznego ... 92
Rysunek 18. Stężenie stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w rzece Warcie na odcinku miasta Luboń ... 99
Rysunek 19. Stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w rzece Warcie na odcinku Mostu Św. Rocha w mieście Poznań ... 100
Rysunek 20. Stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w rzece Warcie na odcinku gminy Czerwonak w Koziegłowach ... 101
Rysunek 21. Średnie stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w wybranych odcinkach rzeki Warty na terenie m. Poznania w okresie od 10.2012 do 04.2014 ... 102
Rysunek 22. Stężenia analizowanych leków z grupy NLPZ w wybranych odcinkach rzeki Warty na terenie m. Poznania w okresie od 10.2012 do 04.2014 ... 104
Rysunek 23. Stężenia analizowanych leków z grupy NLPZ w wybranych odcinkach rzeki Warty na terenie m. Poznania w okresie od 10.2012 do 04.2014 ... 105
Rysunek 24. Zależność godzin nasłonecznienia (a), wskaźnika UV (b), temperatury (c) oraz ciśnienia atmosferycznego (d) od stężenia wybranych leków z grupy NLPZ w analizowanych okresach poboru próbek w rzece Warcie na wysokości odpływu ścieków oczyszczonych z COŚ w Koziegłowach ... 110
Rysunek 25. Stężenie wybranych leków z grupy NLPZ w różnych miejscach ciągu technologicznego COŚ w Koziegłowach k. Poznania ... 113
Rysunek 26. Stężenie wybranych leków z grupy NLPZ w dalszych punktach ciągu technologicznego COŚ w Koziegłowach k. Poznania ... 113
Rysunek 27. Stopień redukcji wybranych leków z grupy NLPZ w poszczególnych odcinkach ciągu technologicznego COŚ w Koziegłowach względem ich zawartości w ściekach surowych ... 114
Rysunek 28. Stopień redukcji analizowanych leków z grupy NLPZ w poszczególnych odcinkach ciągu technologicznego COŚ ... 114
Rysunek 29. Zapadalność na grypę i podejrzenia grypy w Polsce w okresie 2012-2015 w porównaniu z poprzednimi sezonami [GIS, 2015] ... 116
Rysunek 30. Zapadalność na grypę i podejrzenia grypy w Polsce w roku 2014 w porównaniu z poprzednimi sezonami [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/grypa/index.htm] ... 116

Rysunek 31. Stężenia wybranych farmaceutyków z grupy leków NLPZ zawartych w ściekach poprodukcyjnych wybranych zakładów farmaceutycznych działających na obszarze powiatu poznańskiego latach 2012 - 2013 117
Rysunek 32. Stężenia wybranych farmaceutyków z grupy leków NLPZ zawartych w ściekach poprodukcyjnych wybranych zakładów farmaceutycznych działających na obszarze powiatu poznańskiego w latach 2014 – 2015 118
Rysunek 33. Stopień redukcji ibuprofenu dla testów statycznych przeprowadzonych w marcu i kwietniu 2011r. 120
Rysunek 34. Wartości stopnia redukcji ibuprofenu uzyskane dla trzech serii badawczych prowadzonego testu statycznego w zależności od temperatury 121
Rysunek 35. Wartości średniego odczynu pH uzyskane dla trzech serii badawczych prowadzonego testu statycznego w zależności od zmiennej temperatury 122
Rysunek 36. Wartości ChZT uzyskane dla trzech serii badawczych prowadzonego testu statycznego w zależności od zmiennej temperatury 123
Rysunek 37. Sucha masa osadu w bioreaktorach R1 i R2 w okresie wpracowania osadu czynnego (od 1 do 61 dnia) 127
Rysunek 38. Objętość osadu po 30 min. zagęszczaniu w cylindrze oraz obliczona wartość indeksu osadu czynnego w bioreaktorach R1 i R2 w okresie wpracowania osadu czynnego (od 1 do 61 dnia) 127
Rysunek 39. Średnia temperatura oraz średnia wartość odczynu pH w bioreaktorach R1 i R2 w okresie wpracowania osadu czynnego (od 1 do 61 dnia) 128
Rysunek 40. Średnie stężenie tlenu w bioreaktorach R1 i R2 w okresie wpracowania osadu czynnego (od 1 do 61 dnia) 128
Rysunek 41. Średnia objętość osadu po 30 min. zagęszczaniu w cylindrze oraz obliczonej wartości indeksu osadu w bioreaktorach w okresie dozowania diklofenaku* 138
Rysunek 42. Sucha masa osadu w bioreaktorach w okresie dozowania diklofenaku* 138
Rysunek 43. Średnia temperatura oraz średnia wartość odczynu pH w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* 139
Rysunek 44. Średnia wartość tlenu w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* 139
Rysunek 45. Wartość ChZT w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* 140
Rysunek 46. Wartość BZT_5 w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* 140
Rysunek 47. Wartość ChZT oraz BZT_5 w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* 141
Rysunek 48. Średnie wartości $N\text{-}NH_4$ w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* .. 141
Rysunek 49. Średnie wartości $N\text{-}NO_3$ w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* .. 142
Rysunek 50. Średnie wartości $N\text{-}N_{og}$ w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* ... 142
Rysunek 51. Średnie wartości $P\text{-}PO_4$ w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* ... 143
Rysunek 52. Średnie wartości $P\text{-}P_{og}$ w bioreaktorach R1 i R2 w okresie dozowania diklofenaku* 143
Rysunek 53. Stopień redukcji diklofenaku po 4 dobach od zadozowania określonej dawki leku w bioreaktorze R2, we wszystkich analizowanych seriach badawczych 144
Rysunek 54. Stopień redukcji diklofenaku po 1 dobie od zadozowania określonej dawki leku w bioreaktorze R2 we wszystkich analizowanych seriach badawczych 145
Rysunek 55. Stężenie usuniętego diklofenaku w stosunku do dozowanej dawki leku wraz z jego pozostałością w reaktorze R2 146
Rysunek 56. Mikroorganizmy osadu czynnego występujące w reaktorach R1 i R2 (a-h) 151
Rysunek 57. Mikroorganizmy osadu czynnego występujące w reaktorach R1 i R2 (i-p) 152
Rysunek 58. Rozkłady wartości indeksu osadu w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a) oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f) 155
Rysunek 59. Rozkłady stężenia azotu ogólnego w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a) oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f) 156
Rysunek 60. Rozkłady stężenia fosforu ogólnego w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a), oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f) 157

Rysunek 61. Rozkłady stężenia ChZT w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a), oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f) 158
Rysunek 62. Rozkłady stężenia BZT5 w całym okresie dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do reaktora wzorcowego R1 (a), oraz w poszczególnych cyklach badawczych (b-f) 159
Rysunek 63. Rozkłady wartości indeksu osadu w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych 160
Rysunek 64. Rozkład stężenia ChZT w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych 161
Rysunek 65. Rozkład stężenia BZT5 w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych 161
Rysunek 66. Rozkłady stężenia azotu ogólnego w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych 162
Rysunek 67. Rozkłady stężenia fosforu ogólny w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych 163
Rysunek 68. Rozkłady stężenia redukcji diklofenaku w cyklu I dozowania diklofenaku w reaktorze R2 w odniesieniu do poszczególnych cykli badawczych 164
Rysunek 69. Stężenia diklofenaku w próbkach pobranych z cieczy nadosadowej oraz dla próbek z osadem czynnym..... 165