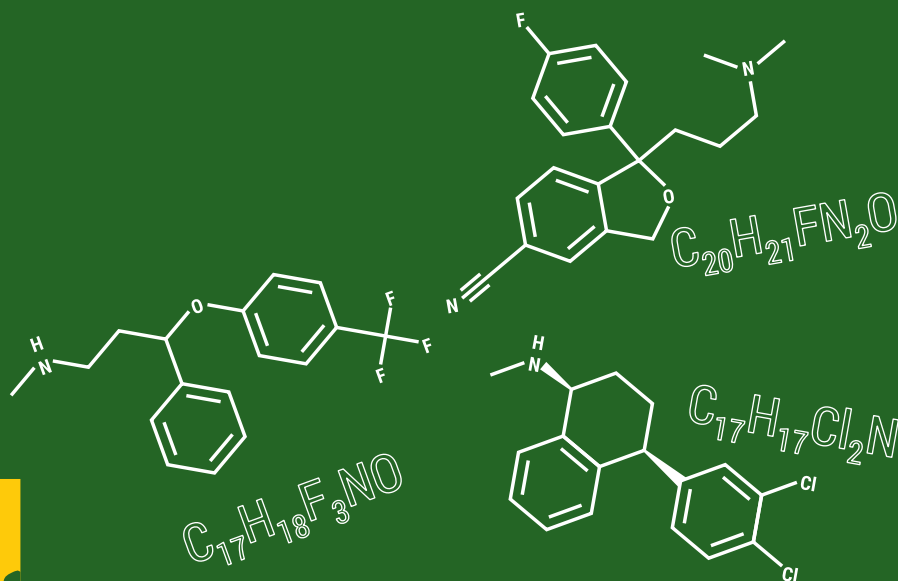


TOKSYCZNOŚĆ WYBRANYCH FARMACEUTYKÓW I ICH MIESZANIN W ŚCIEKACH W STOSUNKU DO *ESCHERICHIA COLI*

Marzena Matejczyk



Marzena Matejczyk

**TOKSYCZNOŚĆ WYBRANYCH
FARMACEUTYKÓW
I ICH MIESZANIN W ŚCIEKACH
W STOSUNKU DO *ESCHERICHIA COLI***



OFICyna WYDAWNICZA POLITECHNIKI BIAŁOSTOCKIEJ
BIAŁYSTOK 2022

Recenzenci:
prof. dr hab. inż. Mariusz Dudziak
dr hab. inż. Adam Muszyński, prof. PW

Redaktor naukowy dyscypliny inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka:
dr hab. inż. Izabela Anna Tałałaj, prof. PB

Korekta językowa:
be correct Edyta Chrzanowska

Skład, grafika i okładka:
Marcin Dominów

© Copyright by Politechnika Białostocka, Białystok 2022

ISBN 978-83-67185-25-7
ISBN 978-83-67185-26-4 (eBook)
DOI: 10.24427/978-83-67185-26-4



Publikacja jest udostępniona na licencji
Creative Commons Uznanie autorstwa-Użycie niekomercyjne-Bez utworów zależnych 4.0
(CC BY-NC-ND 4.0).

Pełną treść licencji udostępniono na stronie
creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode.pl.
Publikacja jest dostępna w Internecie na stronie Oficyny Wydawniczej PB.

Druk: PPH Remigraf sp. z o.o.

Oficina Wydawnicza Politechniki Białostockiej
ul. Wiejska 45C, 15-351 Białystok
e-mail: oficina.wydawnicza@pb.edu.pl
www.pb.edu.pl

Spis treści

Wykaz ważniejszych skrótów i symboli.....	5
Wstęp	7
1. Farmaceutyki w środowisku	11
2. Cel i zakres pracy.....	61
3. Materiały i metodyka badań	63
4. Wyniki badań.....	75
5. Dyskusja	121
6. Podsumowanie i wnioski.....	131
7. Plany dalszych badań.....	133
Załącznik A	135
Załącznik B.....	153
Załącznik C	263
Literatura	277
Spis tabel.....	293
Spis rycin	299
Streszczenie	303
Abstract.....	305

Wykaz ważniejszych skrótów i symboli

4'-OHDCF	– 4'-hydroksydiklofenak
5-FU	– 5-fluorouracyl
5-OHDCF	– 5-hydroksydiklofenak
AOPs	– procesy zaawansowanego (pogłębionego) utleniania (ang. <i>advanced oxidation processes</i>)
BZDs	– benzodiazepiny
CAS	– konwencjonalny osad czynny (ang. <i>conventional activated sludge</i>)
CBZ	– karbamazepina
CIS	– cisplatyna
CIT	– citalopram
DCF	– diklofenak
D-CIT	– desmetylcitalopram
DOX	– doksorubicyna
E1	– estron
E3	– estriol
ECs	– pojawiające się zanieczyszczenia (ang. <i>emerging contaminants</i>)
EDCs	– związki zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego (ang. <i>endocrine disrupting compounds</i>)
EE2	– 17 α -etynyloestradiol
FLU	– fluoksetyna
<i>gfp</i>	– gen reporterowy <i>gfp</i> (ang. <i>green fluorescent protein</i>)
IBU	– ibuprofen
K_d	– współczynnik adsorpcji osadu
KET	– ketoprofen
LogKow	– współczynnik podziału oktanol–woda
<i>luxCDABE</i>	– gen reporterowy <i>luxCDABE</i>
MBR	– bioreaktory membranowe (ang. <i>membrane bioreactors</i>)
MET	– metoprolol
Nor-FLU	– norfluoksetyna
Nor-SER	– norsertralina
NSAIDs	– niesterydowe leki przeciwzapalne (ang. <i>non-steroidal antiinflammatory drugs</i>)
pK_a	– stała dysocjacji kwasu

PPCPs	– farmaceutyki i środki ochrony osobistej (ang. <i>pharmaceuticals and personal care products</i>)
PRP	– propranolol
<i>recA</i>	– promotor <i>recA</i>
ROS	– reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i>)
SER	– sertralina
SMX	– sulfametoksazol
SRT	– wiek osadu
SSRIs	– inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny (ang. <i>selective serotonin reuptake inhibitors</i>)
α E2	– 17 α -estradiol
β E2	– 17 β -estradiol

Wstęp

Przemysł farmaceutyczny jest jedną z najbardziej dochodowych i dynamicznie rozwijających się gałęzi przemysłu na świecie. W skali globalnej obserwujemy znaczny wzrost spożycia farmaceutyków. Dane szacunkowe mówią, że obecnie światowa konsumpcja aktywnych farmakologicznie substancji wynosi 100 000 ton rocznie – do 2020 roku wzrosła o 24% w porównaniu z rokiem 2015. Wzrost zużycia farmaceutyków prowadzi do ich większej dystrybucji do środowiska (Lonappan i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).

W prezentowanej monografii, celem zachowania spójności nomenklatury, za farmaceutyk przyjęto, zgodnie z definicją słownika języka polskiego PWN, lek wyprodukowany przez przemysł farmaceutyczny. Ustawa o prawie farmaceutycznym z 6 września 2001 roku definiuje lek jako produkt leczniczy, który jest substancją lub mieszaniną substancji mającą właściwości zapobiegania bądź leczenia chorób ludzi i zwierząt, podawaną także w celach diagnostycznych albo modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu. Również zgodnie z wyżej wspomnianą ustawą za substancję czynną (aktywną) farmakologicznie uważa się składnik leku, który odpowiada za jego działanie farmakologiczne. Za pozostałości farmaceutyczne natomiast uznano zarówno leki, jak i ich metabolity powstające w wyniku przemian metabolicznych w organizmach ludzi i zwierząt oraz produkty przemian leków na drodze transformacji, biotransformacji lub biodegradacji.

Szereg substancji aktywnych farmakologicznie charakteryzuje się wysokim stopniem oporności na biodegradację w środowisku i oczyszczalniach ścieków. Powszechnie znane i stosowane technologie oczyszczania ścieków są niewystarczające w usuwaniu pozostałości farmaceutycznych. Nie jesteśmy technologicznie przygotowani na wzrost zawartości farmaceutyków i innych mikrozanieczyszczeń w ściekach. Problem ten dotyczy głównie obszarów o dużych skupiskach ludności. Oczyszczalnie ścieków są wciąż największym źródłem pozostałości farmaceutycznych, skąd dostają się one do wód powierzchniowych. Obecnie farmaceutyki wykrywane są nie tylko w nich oraz ściekach surowych i oczyszczonych, lecz także w wodzie przeznaczonej do spożycia. Do szczególnie niebezpiecznych należą antybiotyki i środki przeciwgrzybicze odnajdywane w wodach i glebach, których obecność może się przyczyniać do szerzenia zjawiska oporności drobnoustrojów. Prowadzone w ostatnich latach badania naukowe, szczególnie testy chroniczne przeprowadzane na organizmach żywych, potwierdzają niekorzystne oddziaływanie pozostałości farmaceutycznych i zdolność bioakumulacji tego rodzaju zanieczyszczeń w tkankach, co stanowi zagrożenie

dla zdrowia i życia ludzi (Kümmerer, 2009; Liu i Wong, 2013; Lonappan i wsp., 2016; Branchet i wsp., 2021).

Odpowiedzią na narastający problem coraz częstszego wykrywania aktywnych farmakologicznie związków chemicznych w środowisku był wydany 11 marca 2019 roku przez Komisję Europejską komunikat „Strategiczne podejście Unii Europejskiej do substancji farmaceutycznych w środowisku”, skierowany do Parlamentu Europejskiego, Rady oraz Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego. W pkt 2.5, zatytułowanym „Braki wiedzy”, wyraźny nacisk położono na poszerzenie i pogłębienie badań dotyczących obecności, notowanego stężenia oraz oszacowania ryzyka środowiskowego dla niektórych substancji farmaceutycznych. Podkreślono, że wiele z nich wprowadzonych do obrotu kilka lat temu nie zostało poddanych ocenie ryzyka środowiskowego.

Zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego 2001/83/WE i Europejskiej Agencji Leków (European Medicines Agency, EMA) przed wprowadzeniem do obrotu nowego leku konieczne jest przeprowadzenie oceny ryzyka środowiskowego (Environmental Risk Assessment, ERA). Ze względu na brak rzetelnej informacji o niej brakuje regulacji prawnych dotyczących uwalniania wybranych leków, np. antynowotworowych i ich metabolitów, ze szpitali do środowiska (Zhang i wsp., 2013).

Wracając do komunikatu z 2019 roku, w dokumencie tym potwierdzono, że monitoring substancji farmaceutycznych w środowisku jest bardzo ograniczony. Innym problemem jest potrzeba nadzoru miejsc o szczególnym oddziaływaniu na środowisko, np. narażonych na odpływy ścieków szpitalnych. Komisja Europejska podkreśliła również, że wiedza o możliwych skutkach interakcji pozostałości farmaceutycznych z innymi związkami chemicznymi występującymi w ściekach i wodach jest niewystarczająca.

Także w literaturze naukowej coraz częściej opisuje się problem wykrywania w ściekach i wodach metabolitów i produktów transformacji leków, które mogą charakteryzować się wyższą toksycznością niż lek macierzysty (Kümmerer, 2009; Lonappan i wsp., 2016). W piśmiennictwie istnieje wyraźna luka w wiedzy na temat biologicznej aktywności metabolitów leków oraz ich możliwych interakcji z innymi lekami i związkami chemicznymi występującymi w środowisku, będących pochodzenia zarówno antropogenicznego, jak i naturalnego (np. substancje produkowane przez mikroorganizmy, metabolity roślin). Tego rodzaju mieszaniny mogą znacznie silniej działać na organizmy, w porównaniu ze związkami występującymi indywidualnie. Nie wiemy także, w jakim stopniu charakter matrycy, np. ścieki surowe i oczyszczone, oddziałuje na aktywność biologiczną farmaceutyków i ich metabolitów (Liu i Wong, 2013; Lonappan i wsp., 2016).

Dotychczasowe badania potwierdziły bioakumulację diklofenaku, ibuprofenu, acetaminofenu, kwasu mefenamowego i nimesulidu w dziko żyjących organizmach wodnych, co wyraźnie sygnalizuje potrzebę prowadzenia badań dotyczących ekologicznych skutków obecności farmaceutyków w środowisku i mechanizmów ich biologicznej aktywności. Należy też podkreślić, że nasza wiedza na temat aktywności biologicznej metabolitów biodegradacji NSAIDs i ich oddziaływania na środowisko jest nieduża (Kümmerer, 2009; Kawase i wsp., 2017).

Do tej pory ukazało się niewiele prac odnoszących się do mikrobiologicznej degradacji leków w środowisku. Również problematyka głównych grup mikroorganizmów zaangażowanych w ten proces nie jest do końca poznana, obejmuje jedynie początkowe etapy biotransformacji NSAIDs w środowisku wodnym. Jeszcze mniej wiemy na temat powstających metabolitów, których czasami jest kilka lub kilkanaście. Z kolei dosyć dobrze opracowane są szlaki degradacji pochodnych kwasu salicylowego, które prowadzą do rozszczepienia pierścienia aromatycznego z udziałem dioksygenaz katecholowych lub dioksygenazy gentyzynowej do substratów centralnych szlaków metabolicznych (Marchlewicz i wsp., 2015).

Leki neuroaktywne, zwane psychiatrycznymi, są szeroko stosowane w leczeniu zamkniętym i otwartym na całym świecie. Należą do nich m.in. leki antydepresyjne. Jedną z najpopularniejszych grup antydepresantów są selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRIs) używane w leczeniu klinicznych depresji, zespołów obsesyjno-kompulsywnych, zespołów napadów paniki, fobii społecznej oraz zespołów deficytów uwagi. Obecnie obserwuje się znaczny wzrost konsumpcji leków należących do SSRIs (Silva i wsp., 2015; Puckowski i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018). Kolejną grupą leków o istotnym wzroście zużycia są leki antynowotworowe (Zhang i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2017; Kosjek i wsp., 2013).

W prezentowanej monografii do badań wybrano leki antydepresyjne z grupy – SSRI: sertralinę (SER), fluoksetynę (FLU), citalopram (CIT), ich metabolity, czyli nor-sertralinę (Nor-SER), nor-fluoksetynę (Nor-FLU) i desmetylcitalopram (D-CIT), oraz leki antynowotworowe, jak cisplatyna (CIS) i 5-fluorouracyl (5-FU). Wszystkie z nich są wykrywane w ściekach i wodach powierzchniowych na całym świecie (Sheng i wsp., 2014; Tiwari i wsp., 2017; Zhang i wsp., 2017; Mole i Brooks, 2019; Gornik i wsp., 2020; Shi i wsp., 2020). W literaturze naukowej niewiele jest badań dotyczących toksyczności metabolitów Nor-SER, Nor-FLU oraz D-CIT. Brakuje także danych prezentujących toksyczność mieszanin wymienionych wyżej leków antydepresyjnych i ich metabolitów z lekami antynowotworowymi jak CIS i 5-FU, które ze względu na swoją budowę chemiczną i specyfikę działania na poziomie DNA charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną i są poważnym zagrożeniem w środowisku. Niewystarczająca jest również liczba badań określających, w jakim stopniu środowisko ścieków surowych (ŚS) i oczyszczonych (ŚO), w porównaniu z laboratoryjnym medium hodowlanym (MH), oddziałuje na toksyczność i genotoksyczność wymienionych wyżej leków antydepresyjnych, ich metabolitów i mieszanin oraz mieszanin z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU.

W świetle powyższych informacji za główne cele przedstawionej monografii obrano określenie i porównanie toksyczności i genotoksyczności substancji czynnych wybranych leków antydepresyjnych – SER, FLU i CIT, ich metabolitów – Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT, mieszanin oraz mieszanin z substancjami czynnymi leków antynowotworowych CIS i 5-FU. Kolejnym celem była ocena wpływu matrycy ŚS i ŚO w porównaniu z MH oraz ŚO w porównaniu z ŚS na toksyczność i genotoksyczność wyżej wymienionych substancji czynnych leków antydepresyjnych, metabolitów oraz ich mieszanin z lekami antynowotworowymi.

1. Farmaceutyki w środowisku

1.1. Farmaceutyki i ich metabolity wykrywane w ściekach i wodach powierzchniowych

Według statystyk średnia ilość przyjmowanych rocznie farmaceutyków w przeliczeniu na osobę wynosi 15 g. W krajach wysokorozwiniętych zużycie leków jest wyższe i sięga od 50 do 150 g na osobę na rok. W Europie do ich produkcji stosuje się około 400 aktywnych farmakologicznie związków chemicznych (Szymonik i Lach, 2012). Polski rynek sprzedaży farmaceutyków zajmuje szóste miejsce w Europie, a leki pozarecepturowe z grupy OTC (ang. *over the counter*), głównie przeciwbólowe, stanowią około 34% (Szymonik i Lach, 2012). Według najnowszego raportu z 2019 roku, wykonanego przez Instytut IQVIA, szacuje się, że dochody światowego rynku farmaceutycznego będą rosły do 2023 roku nawet do 6% rocznie.

Zwiększające się zużycie farmaceutyków przyczynia się do wzrostu ich wykrywalności w ściekach oczyszczonych, wodach powierzchniowych, a także wodzie przeznaczonej do spożycia (Styszko i wsp., 2021). Substancje farmaceutyczne dostają się do środowiska głównie przez:

- a) ścieki oczyszczone odprowadzane z oczyszczalni ścieków komunalnych, zawierające wydalone oraz nieużyte substancje farmaceutyczne wyrzucone do zlewu lub toalety, pomimo istnienia systemów zbiórki odpadów;
- b) nawożenie gleby obornikiem zwierzęcym;
- c) akwakultury, gdzie substancje farmaceutyczne są często dodawane do paszy.

Inne źródła przedostawania się pozostałości farmaceutycznych do środowiska to:

- a) ścieki oczyszczone odprowadzane z zakładów produkcyjnych (zwłaszcza spoza Unii Europejskiej);
- b) rozprowadzanie osadów ściekowych zawierających substancje farmaceutyczne usunięte ze ścieków;
- c) wypasanie zwierząt gospodarskich;
- d) leczenie zwierząt domowych;
- e) niewłaściwe składowanie nieużytych substancji farmaceutycznych i skażonych odpadów (Szymonik i Lach, 2012; Wydro i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).

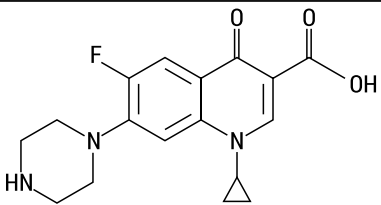
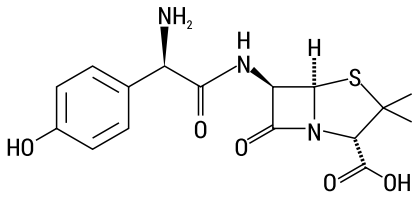
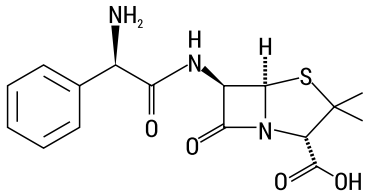
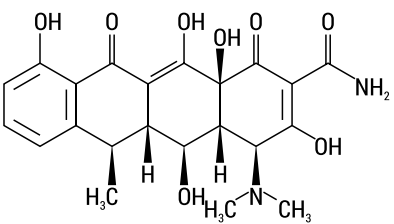
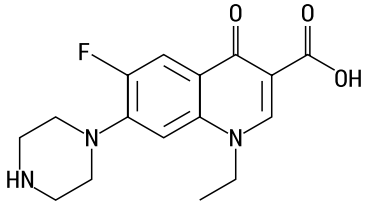
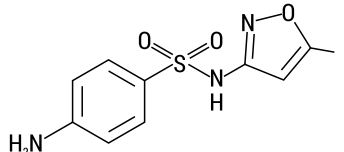
Farmy hodowlane zwierzęce oraz spływy powierzchniowe z gleb w znacznym stopniu również przyczyniają się do przedostawania się leków do środowiska (Herber, 2002; Liu i Wong, 2013; Wydro i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).

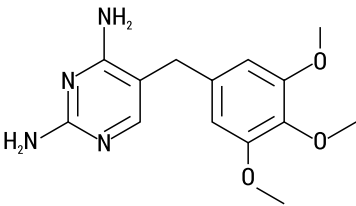
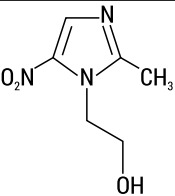
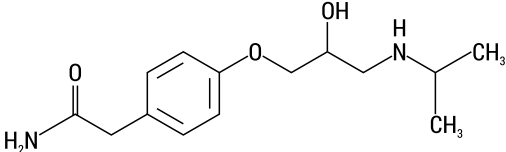
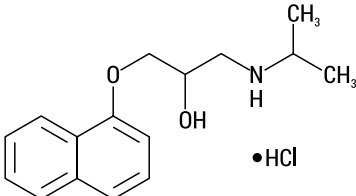
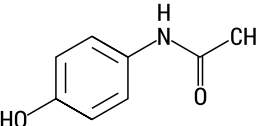
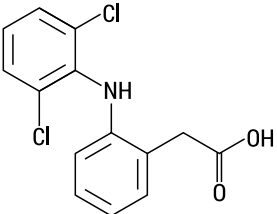
Farmaceutyki zaklasyfikowano do grupy mikrozanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego, które w literaturze określane są mianem farmaceutyków i środków ochrony osobistej – PPCPs. Do tej grupy zaliczane są leki stosowane w leczeniu ludzi i zwierząt, środki pomocnicze używane w medycynie i farmaceutyce (np. obojętne składniki i nośniki leków), suplementy i odżywki spożywcze (tzw. nutraceutyki), a także kosmetyki, takie jak mydła, szampony, wody toaletowe, repelenty, antyseptyki i blokery UV. Ze względu na często złożoną budowę chemiczną (głównie leki) oraz różnorodne właściwości fizykochemiczne PPCPs należą do związków trudno wykrywalnych w matrycach środowiskowych i opornych na biodegradację, co nie ułatwia ich usuwania ze ścieków (Besse i Garric, 2008; Lonappan i wsp., 2016; Wydro i wsp., 2016).

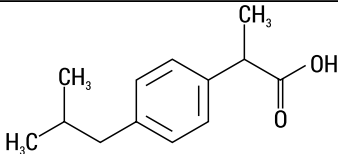
Problem obecności farmaceutyków w środowisku nie jest tematem nowym. Już w latach 70. w Stanach Zjednoczonych wykrywano w ściekach oczyszczonych kwas salicylowy, kwas klofibrowy i metabolity klofibratu. Dekadę później w rzekach Anglii stwierdzono obecność leków antynowotworowych i syntetycznych sterydów. Rozwój technik analitycznych w latach 90. umożliwił detekcję różnorodnych związków chemicznych w środowisku w bardzo małym stężeniu w zakresie ng/dm^3 i $\mu\text{g/dm}^3$ (Mezzelani i wsp., 2018). Od tego czasu zaobserwowano znaczący przyrost wiedzy na temat zanieczyszczeń farmaceutycznych w środowisku.

W latach 1999–2000 w badaniach przeprowadzonych przez amerykańską agencję naukowo-badawczą Geological Survey wykazano, że najczęściej pojawiającymi się farmaceutykami w wodach powierzchniowych są niesteroidowe leki przeciwzapalne, antybiotyki i hormony (Kolpin i wsp., 2002; Szymonik i Lach, 2012). W tabeli 1.1 zaprezentowano najczęściej wykrywane leki w ściekach szpitalnych na całym świecie. Stosowane w dużych ilościach PPCPs w formie niezmienionej oraz wraz z metabolitami przedostają się do środowiska, stanowiąc zagrożenie dla organizmów wodnych i ludzi. Szczególną uwagę zwrócono na antybiotyki, które szeroko wykorzystuje się w leczeniu ludzi i zwierząt. Długotrwała ekspozycja organizmów na nie może w konsekwencji prowadzić do pojawienia się opornych szczepów bakterii, co zagraża zdrowiu publicznemu (Zhang i wsp., 2009). Antybiotyki zawierają kilka ważnych podgrup, których obecność stwierdzono w środowisku. Należą do nich makrolidy (np. erytromycyna, roksitromycyna), sulfonamidy (np. sulfametoksazol, sulfadime-toksyna) i fluorochinolony (np. norfloksacyna, cyprofloksacyna). Kolejną bardzo intensywnie badaną grupą związków chemicznych są hormony, które odpowiadają za zaburzenia funkcjonowania układu hormonalnego organizmów wodnych. Wśród nich najbardziej niepokojące są syntetyczne estrogeny steroidowe, stosowane jako doustne środki antykoncepcyjne, głównie etynyloestradiol, EE2 (Liu i Wong, 2013; Mezzelani i wsp., 2018).

TABELA 1.1. Najczęściej wykrywane leki w ściekach szpitalnych na świecie

Lek	Wzór strukturalny	Maksymalne wykrywane stężenie (ng/dm ³)
Antybiotyki i chemioterapeutyki		
Ciprofloksacyna		101 000
Amoksycylina		900
Ampicylina		5 080
Doksycyklina		6 700
Norfloksacyna		17 000
Sulfametoksazol		12 800

Lek	Wzór strukturalny	Maksymalne wykrywane stężenie (ng/dm ³)
Trimetoprim		7 600
Metronidazol		90 200
β-blokery		
Atenolol		122 000
Propranolol		37 500
Niesterydowe leki przeciwzapalne – NSAIDs		
Acetaminofen		186 500
Diklofenak		70 000

Lek	Wzór strukturalny	Maksymalne wykrywane stężenie (ng/dm ³)
Ibuprofen		151 000

ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Liu i Wong, 2013; Mezzelani i wsp., 2018.

Omawiając hormony, nie sposób nie wspomnieć o bardzo ważnej grupie związków chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego, czyli EDCs. Należą do niej zarówno hormony pochodzenia naturalnego, jak i syntetyczne, będące składnikami leków antykoncepcyjnych oraz stosowanych w hormonalnej terapii zastępczej, a także polichlorowane dibenzodioksyny PCDD, polichlorowane bifenyle PCB, substancje aktywne zawarte w pestycydach (tzw. biocydy), ftalany i alkilofenole. Wraz ze spływami powierzchniowymi oraz odciekami ze składowisk odpadów EDCs przedostają się do wód powierzchniowych i podziemnych ze ścieków bytowych i przemysłowych. Należą do związków chemicznych szczególnie niebezpiecznych, ponieważ mogą zakłócać funkcjonowanie układu hormonalnego, jak też stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia organizmów żywych (Włodarczyk-Makuła, 2014; Gálvez-Ontiveros i wsp., 2020).

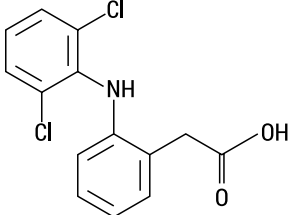
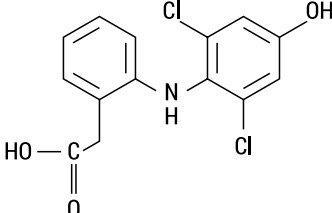
Kolejne grupy leków o wysokiej częstotliwości wykrywania w środowisku to środki przeciwbólowe i przeciwzapalne, takie jak diklofenak i ibuprofen; leki przeciwpadaczkowe, jak karbamazepina i primidon; regulatory lipidów we krwi, np. klofibrat i gemfibrozyl; β -blokery, takie jak metoprolol i propranolol, oraz środki kontrastowe, jak jopromid i diatrizoat (Herber, 2002; Liu i Wong, 2013). Do najczęściej zaś wykrywanych w ściekach produktów higieny osobistej zaliczamy triklosan i triklokarban, które są środkami przeciwdrobnoustrojowymi. W ostatnich latach obserwuje się również wzrost zużycia leków antydepresyjnych, szczególnie inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny, jak FLU, CIT, SER, paroksetyna i wenlafaksyna (Mezzelani i wsp., 2018).

Obecnie ciągle żyjemy w czasie pandemii COVID-19. Na całym świecie prowadzone są badania naukowe oceniające jej wpływ na zdrowie psychiczne populacji. Zebrane dane wskazują, że pandemia ta w istotny sposób wpływa na funkcjonowanie oraz jakość życia ludności. Do najczęściej zgłaszanych symptomów zaburzeń psychicznych w dobie COVID-19 należą stany lęku, niepokoju, depresji i bezsenności. Badania przeprowadzone w Anglii, dotyczące liczby wypisanych recept na leki antydepresyjne w latach 2019–2020, jednoznacznie potwierdzają wzrost ich zużycia. Dane pokazują, że od stycznia do grudnia 2020 roku angielscy lekarze wypisali o cztery miliony więcej recept na leki antydepresyjne w porównaniu z rokiem 2019. W Stanach Zjednoczonych również zanotowano trzykrotny wzrost epizodów depresyjnych w pandemii COVID-19, w porównaniu z czasem przed pandemią (Deng i wsp., 2020; Rabeea i wsp., 2021).

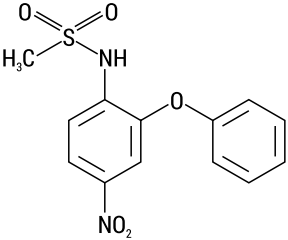
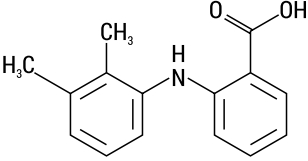
Pochodzące z wydaliny ludzkich farmaceutyki i ich metabolity przedostają się do oczyszczalni ścieków, a następnie wraz ze ściekami oczyszczonymi do wód powierzchniowych. Szczególnie niebezpieczne są ścieki szpitalne. Badania wykazują, że PPCPs wykrywane są w oczyszczalniach ścieków w różnych krajach na całym świecie, w stężeniach od ng/dm^3 do $\mu\text{g/dm}^3$, a skuteczność ich usuwania z zastosowaniem konwencjonalnych procesów oczyszczania ścieków jest ograniczona (Herber, 2002; Liu i Wong, 2013; Wydro i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).

Niesterydowe leki przeciwzapalne NSAIDs są powszechnie stosowane w leczeniu bólu i stanów zapalnych zarówno u zwierząt, jak i ludzi. Mechanizm działania tych leków polega na inhibicji reakcji katalizowanych przez cyklooksygenazy COX-1 i COX-2, co zapobiega formowaniu prostaglandyn i tromboksanu z kwasu arachidowego. Prostaglandyny uczestniczą w takich procesach jak ból, stan zapalny, regulacja przepływu krwi w nerkach, koagulacja i synteza ochronna błony śluzowej żołądka. Klasyczne NSAIDs są inhibitorami enzymów COX-1 i COX-2, należące natomiast do tej grupy leki nowej generacji są bardziej specyficzne od indukowalnych izoform COX-2, które są odpowiedzialne za reakcje zapalne (Parolini i wsp., 2011; Mezzelani i wsp., 2018). W tabeli 1.2 przedstawiono najczęściej wykrywane leki grupy NSAIDs, a także wybrane metabolity w matrycach środowiskowych.

TABELA 1.2. Najczęściej wykrywane leki z grupy NSAIDs i wybrane metabolity w matrycach środowiskowych

Leki grupy NSAIDs	Metabolit	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Diklofenak (DCF)		15307-79-6		$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_2$	318,1
	4'-hydroksydiklofenak (4'-OHDCF)	64118-84-9		$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_3$	312,15

Leki grupy NSAIDs	Metabolit	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
	5-hydroksy-diklofenak (5-OHDCF)	69002-84-2		$C_{14}H_{11}Cl_2NO_3$	312,1
Ibuprofen (IBU)		15687-27-1		$C_{13}H_{18}O_2$	206,28
Ketoprofen (KET)		22071-15-4		$C_{16}H_{14}O_3$	254,281
Naproksen (NAP)		22204-53-1		$C_{14}H_{14}O_3$	230,26
Kwas acetylo-salicylowy (AA)		50-78-2		$C_9H_8O_4$	180,16
Acetaminofen (AMP)		103-90-2		$C_8H_9NO_2$	151,16

Leki grupy NSAIDs	Metabolit	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Nimesulid (NIM)		51803-78-2		$C_{13}H_{12}N_2O_5S$	308,31
Kwas mefenamowy (MA)		61-68-7		$C_{15}H_{15}NO_2$	241,29

ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Kümmerer, 2009; Memmert i wsp., 2013; Kawase i wsp., 2017.

W badaniach przeprowadzonych w 20 krajach na całym świecie stwierdzono obecność DCF i IBU w ponad 90% analizowanych prób. W ściekach stężenie NSAIDs wynosiło $> 1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ i dla DCF zarejestrowano wartości do $1,59 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, dla ibuprofenu $3,35 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ oraz dla kwasu acetylosalicylowego $1,51 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Fatta-Kassinos i wsp., 2011; Desbiolles i wsp., 2018). W wodach rzecznych w rejonie Madrytu zawartość IBU, DCF, NAP i KET wynosiła odpowiednio: $5 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, $3,4 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, $3,1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ i $1,56 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Również w wodach powierzchniowych Wielkiej Brytanii wykryto DCF – w stężeniu $0,424 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ oraz IBU – $3,1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Podobnie w wodach powierzchniowych Francji odkryto niesterydowe leki przeciwzapalne, takie jak KET, DCF i NAP, których zawartość wahała się w granicach od $0,4 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ do $0,9 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Także w polskich rzekach, Wiśle, Odrze i Warcie, wykryto DCF, kwas acetylosalicylowy oraz NAP – od $0,3 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ do $0,73 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Szymonik i Lach, 2016). W ściekach oczyszczonych w Szwajcarii zidentyfikowano DCF w ilości około $2,4 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Najwyższą natomiast zawartość IBU zanotowano w ściekach oczyszczonych w Hiszpanii i wynosiła ona $28 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. W basenie Morza Śródziemnego odnotowano obecność AMP w stężeniu do $200 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ oraz KET do $6 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Lonappan i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).

Farmaceutyki wykazują swoją biologiczną aktywność już w niewielkich dawkach i oddziałują na różne mechanizmy komórkowe, tj. aktywność enzymów komórkowych, sygnałowe szlaki komórkowe. Zarówno leki macierzyste, jak i ich metabolity po wydaleniu z organizmu ludzkiego podlegają w środowisku licznym przemianom fizycznym, chemicznym i biologicznym, takim jak hydroliza, fotoliza, biodegradacja i bioakumulacja. Różne procesy biotyczne/abiotyczne zwykle skutkują powstaniem

produktów transformacji o nowych właściwościach (Kümmerer, 2009; Lonappan i wsp., 2016).

W testach na *Danio rerio* dla DCF wartości LC_{50} wynosiły 166,6 mg/dm³ dla stadiów juwenilnych oraz 6,11 mg/dm³ dla embrionów (Praskova i wsp., 2011). W testach z *Daphnia magna*, bazujących na inhibicji mobilności, EC_{50} dla DCF osiągało wartości 22,4 mg/dm³, dla aspiryny i ibuprofenu zawierało się w granicach 88,1–108 mg/dm³, a dla naproksenu 166,3–174 mg/dm³. W testach toksyczności prowadzonych na glonach *Desmodesmus subspicatus* opartych na inhibicji wzrostu wartości EC_{50} dla DCF wynosiły 72 mg/dm³, z kolei dla IBU, NAP i AA były wyższe od 100 mg/dm³ (Puckowski i wsp., 2016). Liczne badania wykazały zdolność bioakumulacji NSAIDs w tkankach organizmów wodnych. W małżach odłowionych w pięciu punktach wzdłuż wybrzeży Belgii zawartość kwasu acetylosalicylowego wynosiła 490 ng/g suchej masy, a acetaminofenu 115 ng/g suchej masy. Małże *Mytilus galloprovincialis* zebrane u wybrzeży Włoch zawierały DCF w stężeniu 16,1 ng/g suchej masy, IBU natomiast w stężeniu 9,40 ng/g suchej masy. Wykryto w nich także NIM w stężeniu 6,04 ng/g suchej masy. Obecność DCF stwierdzono również w tkankach różnych gatunków ryb (*Cyprinus carpio*, *Carassius carassius*) i innych organizmów wodnych żyjących w oceanach, morzach oraz rzekach. Badania prowadzone przez ekotoksykologów dowiodły znaczącego szkodliwego wpływu NSAIDs na organizmy żywe. Badając małże *M. galloprovincialis* naukowcy potwierdzili znaczny potencjał bioakumulacji DCF, IBU i KET po 14 dniach ekspozycji mięczaków na środowiskowe stężenie 2,5 µg/dm³ tych leków (Lonappan i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018). W przeprowadzonych analizach udokumentowano, że wywoływały one zaburzenia immunologiczne, działały genotoksycznie, modulowały metabolizm lipidów i cykl komórkowy oraz były odpowiedzialne za zmiany w profilu transkrypcyjnym genów ulegających ekspresji w wymienionych wyżej procesach. Zarówno DCF, IBU, jak i KET badane w niższym stężeniu 250 ng/dm³ w *M. galloprovincialis* i po dwutygodniowej ekspozycji indukowały enzymy antyoksydacyjne, dysmutazę ponadtlenkową, katalazę, S-transferazę glutationu i reduktazę glutationu oraz stymulowały peroksydację lipidów (Nava-Álvarez i wsp., 2014). W badaniach prowadzonych na *Ruditapes philippinarum* i krabie *Carcinus maenas* eksponowanym na działanie IBU w stężeniu do 50 µg/dm³ stwierdzono destabilizację lizosomalnych membran, modulację szlaków detoksyfikacyjnych i metabolizmu oksydacyjnego oraz efekt genotoksyczny (Cunha i wsp., 2017).

Większość badań dotyczy macierzystych leków z grupy NSAIDs, niewiele natomiast wiadomo na temat metabolitów, ich aktywności biologicznej i potencjału oddziaływania na środowisko. Najczęstszymi obiektami badań spośród NSAIDs są DCF i jego metabolity, głównie 4'-hydroksydiklofenak (4'-OHDCF) oraz 5-hydroksydiklofenak (5-OHDCF). U ssaków DCF ulega biotransformacji m.in. do 4'-OHDCF i 5-OHDCF, które, jak wykazano, są wysoce reaktywne i indukują tworzenie reaktywnych form tlenu [ROS] (Matejczyk i wsp., 2020a; 2020b; 2020c). Ponadto główny metabolit, 4'-OHDCF, ma słabe działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe. Ustalono również, że DCF i 4'-OHDCF zaburzają układ hormonalny oraz działają immunomodulacyjnie (Klopčič i wsp., 2018). Z kolei po siedmiodniowej

inkubacji ostryg *Crassostrea gigas* wyłowionych z Pacyfiku z IBU oraz AMP w stężeniu do $100 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ wykazano inhibicję enzymów antyoksydacyjnych, a także oddziaływanie na transkrypcyjną regulację ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm i biotransformację leków. W eksperymentach prowadzonych na *Salmo trutta*, inkubowanych w obecności DCF w stężeniach wyższych od $10 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, stwierdzono znaczące zmiany w tkankach wątroby i nerek (Memmert i wsp., 2013).

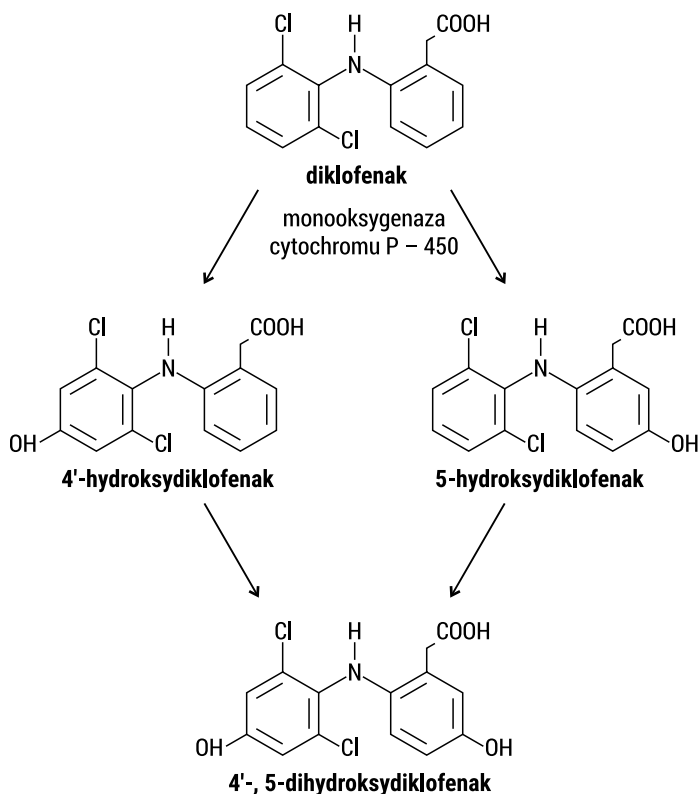
Pozostali reprezentanci NSAIDs, tj. naproksen, diklofenak, ketoprofen, paracetamol i ibuprofen, ulegają biodegradacji głównie z udziałem grzybów z wykorzystaniem enzymów lignolitycznych oraz układu cytochromu P – 450 (Guzik i wsp., 2013). Najpopularniejszym przykładem jest diklofenak, który po przedostaniu się do środowiska odznacza się dużą trwałością i toksycznością (Quintana i wsp., 2005).

Osorio-Lozada i wsp. (2008) dowiedli, że szczep *Actinoplanes sp.* wykazywał wysoką aktywność w rozkładzie diklofenaku i biotransformował 100% tego leku w ciągu 5 godzin. Znacznie dłużej, bo nawet do 120 godzin przebiegał proces biotransformacji diklofenaku z udziałem grzybów z gatunków *Cunninghamella elegans*, *Beauveria bassiana* i *Cunninghamella echinulata*. Podczas przemian diklofenaku zidentyfikowano główne metabolity, takie jak 4'-hydroksydiklofenak, 5-hydroksydiklofenak oraz 4',5-dihydroksydiklofenak. Identyczne wykryto w czasie biotransformacji diklofenaku w organizmie ludzkim, co sugeruje podobieństwo aparatu enzymatycznego opartego na monooksygenazach współdziałających z cytochromem P – 450. Prace z ostatnich lat potwierdzają obecność kilku możliwych szlaków rozkładu diklofenaku u mikroorganizmów środowiskowych, włączając mikrobiom osadu czynnego w oczyszczalniach ścieków (Osorio-Lozada i wsp., 2008). Hata i wsp. (2010) w badaniach na *Phanerochaete sordida* wykazali, że oprócz układu enzymatycznego związanego z cytochromem P – 450 w procesie biotransformacji diklofenaku biorą udział prawdopodobnie manganozależna peroksydaza i lakaza. Sugeruje to współistnienie dwóch możliwych dróg metabolizowania tego leku.

Kolejnym wykrywanym w matrycach środowiskowych lekiem należącym do NSAIDs jest ibuprofen. Do tej pory udokumentowano, że głównie lignolityczne gatunki grzybów oraz nieliczne gatunki bakterii wykazują zdolność jego metabolizowania. Do tych pierwszych należą gatunki *Bjerkandera adusta* i *Phanerochaete chrysosporium*. Do najczęściej identyfikowanych metabolitów procesu biotransformacji ibuprofenu przez te szczepy zaliczono hydroksylowane pochodne: 1-hydroksyibuprofen, 2-hydroksyibuprofen oraz 1,2-dihydroksyibuprofen. W badaniach eksperymentalnych potwierdzono, że te pochodne charakteryzują się większą toksycznością niż związek macierzysty i mogą mieć poważny wpływ na organizmy biocenozy wodnych (Marchlewicz i wsp., 2015). Bakteryjną degradację ibuprofenu opisano u *Sphingomonas* Ibu-2. Proces ten zachodzi przede wszystkim z udziałem dioksygenaz, syntetazy acylo-CoA oraz ligazy-CoA i prowadzi do powstania 4-izobutylokatecholu, będącego głównym produktem rozkładu ibuprofenu (Kagle i wsp., 2009).

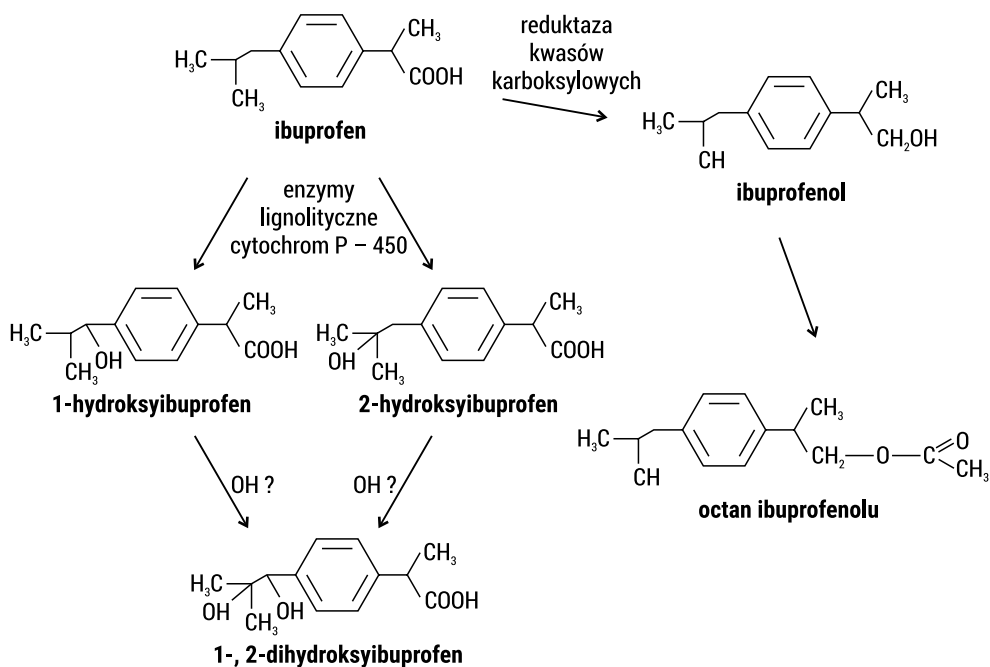
Ketoprofen i naproksen to kolejne leki należące do grupy NSAIDs wykrywane w ściekach i wodach powierzchniowych. Ustalono, że *Trametes versicolor* ma zdolność całkowitej biotransformacji ketoprofenu. Do najczęściej identyfikowanych metabolitów

należą kwas 3-(hydroksy-karboksymetylo)hydratropowy oraz kwas 3-(keto-karboksymetylo)hydratropowy. Biotransformację naproksenu opisano u grzybów z gatunków *Cunninghamella blakeslesna*, *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans*, wykorzystujących układ enzymatyczny związany z cytochromem P – 450. Głównymi metabolitami biotransformacji naproksenu w układach kometabolicznych są O-desmetylnaprosen i siarczan 6-O-desmetylnaproksenu (Zhong i wsp., 2003; Marchlewicz i wsp., 2015). Na rycinach 1.1–1.3 przedstawiono schematy biotransformacji diklofenaku, ibuprofenu i naproksenu oraz ich najważniejsze metabolity.



RYC. 1.1. Biotransformacja diklofenaku i jego główne metabolity – 4'-hydroksydiklofenak i 5-hydroksydiklofenak

Leki psychiatryczne, zwane również neuroaktywnymi, są szeroko stosowane zarówno w lecznictwie zamkniętym, jak i otwartym na całym świecie. Należą do nich głównie leki antydepresyjne, antyepileptyczne i przeciwlękowe. Podobnie jak inne leki, one także dostają się do środowiska przede wszystkim wraz z odpadami domowymi, z wydaliniami ludzkimi czy też poprzez bezpośrednie wyrzucanie nieużywanych lub przeterminowanych leków do toalet. Głównym źródłem przedostawania się neuroaktywnych leków do wód są jednak oczyszczalnie ścieków (Calisto i Esteves, 2009; Silva i wsp., 2015).

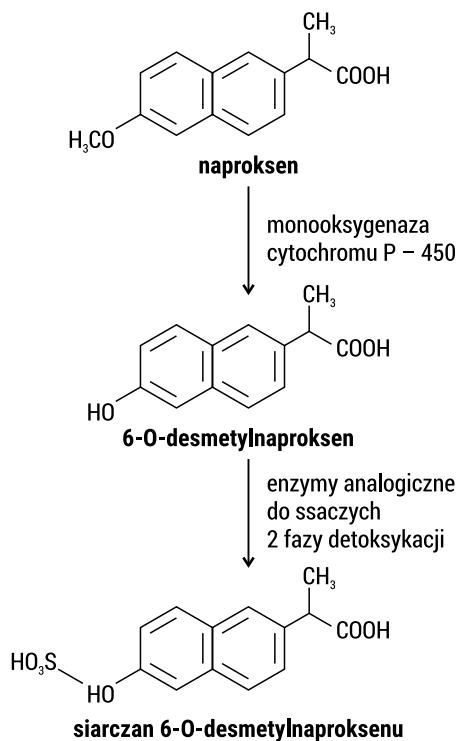


RYC. 1.2. Biotransformacja ibuprofenu i jego główne metabolity: 1-hydroksyibuprofen, 2-hydroksyibuprofen oraz 1,2-dihydroksyibuprofen

Według raportu Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (ang. Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD) z 2011 roku szacuje się, że w latach 2000–2010 konsumpcja leków należących do SSRIs wzrosła o 60%. Do najpowszechniejszych należą: fluoksetyna (FLU, Prozak), citalopram (CIT), paroksetyna (PAR), sertralina (SER) i wenlafaksyna (VEN). Po spożyciu doustnym SSRIs są intensywnie metabolizowane w organizmie człowieka, a uwalniane pierwotne metabolity są na ogół produktami N-desmetylowymi. Większość z nich zachowuje aktywność farmakologiczną (Silva i wsp., 2012, 2015). Fluoksetyna jest wydalana głównie z moczem (mniej niż 10% w postaci niezmienionej), jako norfluoksetyna (Nor-FLU) lub N-glukuronid asfluoksetyny. Inne badania farmakokinetyczne wskazują, że tylko około 20% jest wydalane jako Nor-FLU i jej glukuronid. W odniesieniu do CIT usuwanie niezmienionego związku wynosi od 12 do 20%. W przypadku SER tylko 0,2% doustnej dawki jest wydalane w postaci niezmienionej z moczem (Silva i wsp., 2015).

W związku z ciągle wzrastającym zużyciem antydepresantów należą do jednych z najczęściej wykrywanych związków chemicznych w środowisku (Gornik i wsp., 2020; Shi i wsp., 2020). Do tej pory wielokrotnie udokumentowano obecność leków antydepresyjnych oraz ich metabolitów (Nor-FLU, D-CIT, Nor-SER) w ściekach w szerokim zakresie stężeń – od 0,15 do 32228 ng/dm³, w wodach powierzchniowych w stężeniach od 0,5 do 8000 ng/dm³ oraz w wodzie wodociągowej – od 0,5 do 1400 ng/dm³. Także w osadach i glebie wykryto FLU i SER oraz ich metabolity w stężeniu do 1033 ng/g. W polskich wodach najwyższe stężenie 45 ng/dm³ antydepresantów zanotowano

w rzece Utrata (Minagh i wsp., 2009; Silva i wsp., 2012; Giebułtowicz i Nałęcz-Jawecki, 2014; Silva i wsp., 2015; Puckowski i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018). Jeśli chodzi o leki antydepresyjne, to w Polsce w wodzie wodociągowej wykryto: citalopram w stężeniu $1,5 \text{ ng/dm}^3$, mianserin w stężeniu $0,9 \text{ ng/dm}^3$, sertralinę w stężeniu $3,1 \text{ ng/dm}^3$, moklobemid w stężeniu $0,3 \text{ ng/dm}^3$ i wenlafaksynę w stężeniu $1,9 \text{ ng/dm}^3$ (Giebułtowicz i Nałęcz-Jawecki, 2014).



RYC. 1.3. Biotransformacja naproksenu i jego główne metabolity – 6-O-desmetylnaproxen oraz siarczan 6-O-desmetylnaprosenu

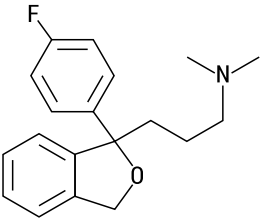
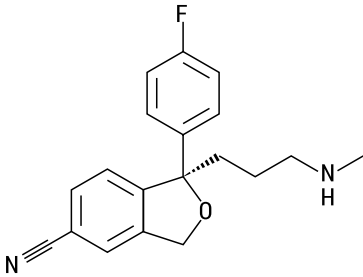
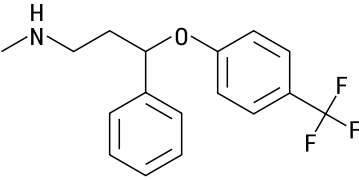
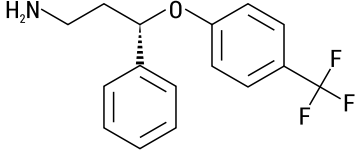
Obecność leków neuroaktywnych i ich metabolitów stwierdzono też w tkankach organizmów wodnych: w mózgu, wątrobie oraz plazmie ryb i mięczaków w stężeniach na poziomie ng/g. Biorąc zaś pod uwagę metabolity Nor-FLU i Nor-SER, ich najwyższe stężenie zarejestrowano w tkankach mózgu, wątroby i mięśniach ryb. W organizmach *Hydropsyche* sp. i *E. octoculata* wykryto także CIT w stężeniu $3,6\text{--}4,2 \text{ ng/g}$ oraz SER – $4,3\text{--}5,5 \text{ ng/g}$ (Puckowski i wsp., 2016). W badaniach przeprowadzonych na małżach odłowionych wzdłuż wybrzeży Kalifornii u 64% badanych osobników stwierdzono obecność SER w stężeniu $1,4 \text{ ng/g}$. W małżach *M. galloprovincialis* złowionych w Atlantyku w rejonie Portugalii zauważono bioakumulację FLU w stężeniu do $9,93 \text{ ng/g}$ suchej masy, Nor-FLU w stężeniu do $21,7 \text{ ng/g}$ suchej masy, CIT do $4,9 \text{ ng/g}$ suchej masy, D-CIT do $10,2 \text{ ng/g}$ suchej masy oraz Nor-SER w stężeniu do $6,68 \text{ ng/g}$ suchej masy (Silva i wsp., 2012; Gornik i wsp., 2020).

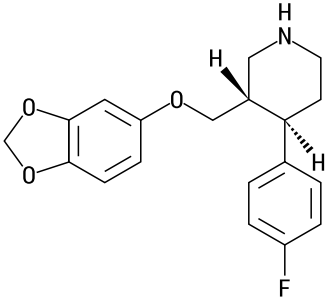
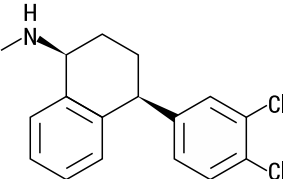
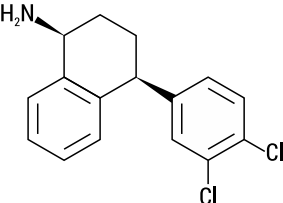
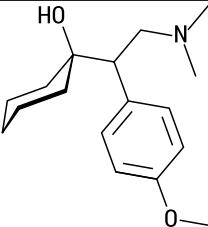
Podczas prowadzonych badań występowanie wyższych stężeń metabolitów, selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny, głównie Nor-FLU i Nor-SER, zaobserwowano w organizmach małży z gatunku *M. galloprovincialis* odłowionych w Atlantyku w pobliżu Portugalii oraz w tkankach *Lepomis macrochirus*, *Ictalurus punctatus* i *Pomoxis nigromaculatus* pochodzących z Teksasu. Zwiększoną zdolność bioakumulacji metabolitów leków z grupy SSRIs w tkankach organizmów ekotoksykologów tłumaczą ich niższą polarność w porównaniu ze związkami macierzystymi. To właściwości fizykochemiczne SSRIs determinują ich zachowania środowiskowe. Są to związki lipofilowe, których pK_a (stała dysocjacji kwasu) wynosi od 9,05 do 10,5. Jako chlorowodorki wszystkie SSRIs charakteryzują się niskim współczynnikiem podziału oktanol–woda i stosunkowo wysoką rozpuszczalnością w wodzie. Ponadto lekom tym przypisane są wysokie współczynniki sorpcji z glebami i osadami, co oznacza, że są to związki trwałe. Potencjał ich bioakumulacji, a także ich toksyczność zależne są od wartości pH środowiska (Silva i wsp., 2012; 2015; 2017).

W związku ze zwiększającą się wykrywalnością zanieczyszczeń farmaceutycznych w różnych matrycach środowiskowych istnieje potrzeba intensywniejszego badania ich oddziaływania na środowisko. Obecnie bardzo niewiele wiemy na temat transportu i aktywności leków przeciwdepresyjnych, takich jak SSRIs, oraz ich metabolitów w środowisku (Celiz i wsp., 2009). Do tej pory ustalono, że SSRIs modulują poziom neurotransmiterów serotoniny, dopaminy, norepinefryny. Badania toksykologiczne wykazały, że u ryb, mięczaków oraz innych wodnych bezkręgowców ekspozowanych na działanie środowiskowego stężenia leków z grupy SSRIs dochodziło do zaburzeń reprodukcji, wzrostu, metabolizmu, odporności, odżywiania się, lokomocji, ubarwienia i zachowania (Bossus i wsp., 2014; Silva i wsp., 2015; Shi i wsp., 2020). W testach toksyczności ostrej prowadzonych na *Ceriodaphnia dubia* dla CIT wartość LC_{50} po 48-godzinnej ekspozycji wynosiła $3,90 \text{ mg/dm}^3$, a w testach z *Xenopus laevis* określona dla FLU wartość LC_{50} po 96-godzinnej ekspozycji wynosiła $7,5 \text{ mg/dm}^3$. W trwających 48 godzin testach toksyczności ostrej na *C. dubia* dla SER uzyskano $LC_{50} = 0,12 \text{ mg/dm}^3$. Zaobserwowano także niekorzystne oddziaływanie FLU, która hamowała właściwy rozwój młoty *Sepia officinalis* ekspozowanej na ten lek w stężeniu do 1 ng/dm^3 . Odnotowano też, że FLU w stężeniu $1\text{--}100 \text{ ng/dm}^3$ działała niekorzystnie na procesy pływania i odżywiania się *Gammarus pulex*, a w stężeniu 20 ng/dm^3 zaburzała układ hormonalny u omułka *Dreissena polymorpha* (Foster i wsp., 2010; Silva i wsp., 2012; Franzellitti i wsp., 2014; Silva i wsp., 2015). Z kolei CIT i FLU stosowane w stężeniu 500 ng/dm^3 wywoływały stres oksydacyjny i działały genotoksycznie. Badania toksykologiczne wykazały, że obecność SER w stężeniu wykrywanym w środowisku oddziaływała na dorosłe samce *Pimephales promelas*, prowadząc do zaburzeń anatomicznych i fizjologicznych (Goolsby i wsp., 2013; Silva i wsp., 2015). Po zadziałaniu na małże z gatunku *M. galloprovincialis* FLU w zakresie stężenia $0,03\text{--}300 \text{ ng/dm}^3$ stwierdzono bioakumulację tego leku w tkankach gruczołów trawiennych oraz intensyfikację peroksydacji lipidów i modulację ekspresji genów biorących udział w procesie detoksyfikacji ksenobiotyków (Hazelton i wsp., 2013; 2014; Silva i wsp., 2015). Leki z grupy SSRIs, oddziałując nawet w śladowych

ilościach na organizmy żywe, mają zdolność modulacji poziomu serotoniny i wpływają na procesy fizjologiczne w glonach, roślinach, bezkręgowcach i kręgowcach (Silva i wsp., 2015). W tabeli 1.3 zaprezentowano najczęściej wykrywane w środowisku leki z tej grupy i ich metabolity.

TABELA 1.3. Ogólna charakterystyka głównych leków z grupy SSRI i ich metabolitów

Leki z grupy SSRI	Metabolit	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Citalopram (CIT)		59729-33-8		$C_{20}H_{21}FN_2O$	324,16
	Desmetylcitalopram (D-CIT)	62498-67-3		$C_{19}H_{19}FN_2O$	310,15
Fluoksetyna (FLU)		54910-89-3		$C_{17}H_{18}F_3NO$	309,13
	Norfluoksetyna (Nor-FLU)	83891-03-6		$C_{16}H_{16}F_3NO$	295,12

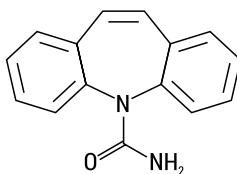
Leki z grupy SSRI's	Metabolit	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Paroksetyna (PAR)		61869-08-7		$C_{19}H_{20}FNO_3$	329,14
Sertralina (SER)		79617-96-2		$C_{17}H_{17}Cl_2N$	305,07
	Norsertalina (Nor-SER)	87857-41-8		$C_{16}H_{15}Cl_2N$	291,06
Venlafaksyna (VEN)		93413-69-5		$C_{17}H_{27}NO_2$	277,04

ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Silva i wsp., 2012; Silva i wsp., 2015.

Karbamazepina (CBZ) należy do kolejnej grupy leków neuroaktywnych wykazujących właściwości antyepileptyczne (ryc. 1.4). Jej pozostałości są często wykrywane zarówno w ściekach surowych, jak i oczyszczonych, w wodach powierzchniowych, podziemnych i w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi w stężeniu od 0,03 do 11,6 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Karbamazepinę znaleziono także w wodach morskich i przybrzeżnych w stężeniu od 0,21 do 321 ng/dm^3 . Takie kryteria, jak ciągłość uwalniania CBZ do środowiska wodnego oraz oporność tego leku na biodegradację, przyczyniły się do zdefiniowania CBZ jako antropogenicznego markera zanieczyszczeń wód.

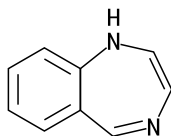
Karbamazepinę wykryto w wielu gatunkach organizmów wodnych basenu Morza Śródziemnego (np. małżach *M. galloprovincialis*), u wybrzeży Belgii, w małżach *Mytilus edulis* w zatoce San Francisco, w *Geukensia demissa* oraz w *Crassostrea gigas* w delcie Ebro. Notowane stężenie sięgało wartości 3,5 ng/g suchej masy. Obecność CBZ stwierdzono też w bezkręgowcach i kręgowcach odłowionych z jeziora Tai Hu w Chinach w stężeniu do 18 g/g suchej masy, jak również w tkankach wielu gatunków ryb złowionych u wylotów oczyszczalni ścieków w Stanach Zjednoczonych (np. w mięśniach i wątrobie tilapii *Oreochromis niloticus* CBZ występowała w stężeniu do 1,03 ng/g suchej masy). W wielu pracach udokumentowano podwyższenie poziomu stresu oksydacyjnego oraz peroksydacji lipidów w tkankach morskich bezkręgowców ekspozycyjnych na środowiskowe stężenie CBZ zawierające się w zakresie od 0,3 do 9 µg/dm³.

Badania z ostatnich lat potwierdzają także zdolność kumulacji CBZ w glebach, gdzie lek ten charakteryzuje się znacznym stopniem oporności na biodegradację (Kümmerer, 2009; Puckowski i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).



RYC. 1.4. Karbamazepina (CBZ) – wzór strukturalny

Benzodiazepiny (BZDs) są kolejną grupą leków psychiatrycznych wykrywanych w ściekach i wodach powierzchniowych (ryc. 1.5). Charakteryzują się właściwościami anksjolitycznymi i przeciwdrgawkowymi, niektóre z nich są stosunkowo odporne na biodegradację. Leki te są dosyć powszechnie wykrywane w wodach powierzchniowych w stężeniu do 0,6 µg/dm³. Wykryto je również w tkankach *Crassostrea gigas* pochodzących z delty rzeki Ebro w stężeniu 0,8 ng/g suchej masy. Niewiele wiadomo na temat oddziaływania BZDs na organizmy żywe. Nieliczne udokumentowane dane wskazują na modulację metabolizmu dopaminy oraz podwyższenie poziomu stresu oksydacyjnego u ryb ekspozycyjnych na działanie benzodiazepin (Puckowski i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).



RYC. 1.5. Benzodiazepina (BDZ) – wzór strukturalny

Dotychczasowa wiedza na temat mikrobiologicznej biotransformacji leków neuroaktywnych jest ograniczona. Zidentyfikowano też bardzo niewiele grup drobnoustrojów biorących udział w ich biodegradacji. Udokumentowano, że SER ulegała najefektywniejszej biodegradacji w obecności izolatów *Pseudomonas* i *Serratia*. Z kolei

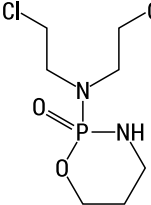
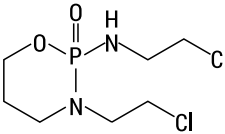
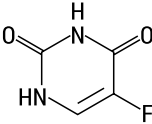
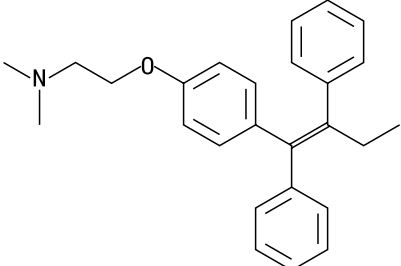
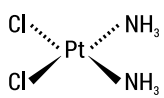
badania dotyczące FLU wykazały, że lek ten w stężeniu $1 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ ulega degradacji w ciągu 10 dni (Caracciolo i wsp., 2015). Rozpoznano także mikroorganizmy, które biorą udział w procesie biotransformacji CBZ, należą do nich grzyby *Cunninghamella elegans* ATCC9245, *Tinea versicolor* i *Ganoderma lucidum*. Zdolność biotransformacji CBZ mają również bakterie *Rhodococcus rhodochrous* oraz grzyby *Aspergillus niger* (Caracciolo i wsp., 2015).

Kolejną grupą leków wykrywanych w środowisku są leki antynowotworowe stosowane w leczeniu różnych typów nowotworów. Farmaceutyki te po podaniu głównie dożylnym ulegają metabolizmowi w organizmie ludzkim i wraz z metabolitami przedostają się do ścieków. Ze względu na bardzo silny mechanizm działania (cytotoksyczność, genotoksyczność, mutagenność i teratogenność) leki antynowotworowe mogą wywierać niekorzystny wpływ na każdy rosnący organizm eukariotyczny. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) należą one do leków cytotoksycznych (klasa L01) lub leków do terapii hormonalnej (klasa L02, w tym hormonów i antagonistów hormonów stosowanych szczególnie w leczeniu chorób nowotworowych). Ze względu na działanie terapeutyczne klasa L01 jest podzielona na pięć podgrup, a mianowicie: środki alkilujące, antymetabolity, alkaloidy roślinne, antybiotyki cytotoksyczne i inne środki przeciwnowotworowe. Farmaceutyki będące czynnikami alkilującymi należą do największej grupy leków antynowotworowych, indukują alkilację (poprzez wiązania kowalencyjne) z DNA, RNA oraz różnymi enzymami. Obecnie w terapii antynowotworowej wykorzystuje się około 100 leków (Zhang i wsp., 2013; Parrella i wsp., 2014).

W ściekach najczęściej wykrywane są: cyklofosfamid (CP), ifosfamid (IF), tamoksifen, cytarabina, cisplatyna (CIS), 5-fluorouracyl (5-FU), doksorubicyna (DOX), etopozyd, gemcytabina i winorelbina. W ściekach szpitalnych w Szwajcarii, Chinach i Niemczech rejestrowano stężenie CP do $4486 \text{ ng}/\text{dm}^3$, IF do $1914 \text{ ng}/\text{dm}^3$, tamoksifenu do $740 \text{ ng}/\text{dm}^3$, 5-FU do $122 \text{ ng}/\text{dm}^3$, DOX do $1350 \text{ ng}/\text{dm}^3$ i CIS do $250 \text{ ng}/\text{dm}^3$. W australijskich oraz francuskich ściekach pochodzących ze szpitali stężenie 5-FU sięgało odpowiednio wartości 124 i $4 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Zhang i wsp., 2013; 2017; Kosjek i wsp., 2013). W wodach powierzchniowych, odbierających odpływy z oczyszczalni ścieków, najwyższymi stwierdzonymi stężeniami CP oraz tamoksifenu były odpowiednio $65 \text{ ng}/\text{dm}^3$ oraz $212 \text{ ng}/\text{dm}^3$. W tabeli 1.4 przedstawiono wybrane leki antynowotworowe najczęściej wykrywane w ściekach.

Leki antynowotworowe i ich metabolity charakteryzują się wysoką reaktywnością cytotoksyczną i cytostatyczną. Bardzo poważnym skutkiem ubocznym ich działania jest wpływ na zdrowe komórki organizmu, który prowadzi do ich uszkodzenia i śmierci. Ze względu na swoją bardzo zróżnicowaną budowę chemiczną i właściwości fizyko-chemiczne leki antynowotworowe są stosunkowo odporne na biodegradację w środowisku i nawet w bardzo niewielkich, śladowych ilościach silnie działają na organizmy żywe (Zhang i wsp., 2013; Lutterbeck i wsp., 2016). Wykazano, że wydajność degradacji CP w ściekach szpitalnych wynosi około 20%, z kolei 50-dniowa inkubacja doprowadziła do mniej niż 30% degradacji 5-FU (Zhang i wsp., 2017).

TABELA 1.4. Wybrane leki antynowotworowe najczęściej wykrywane w ściekach

Leki anty- nowotworowe	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa mole- kularna (u)
Cyklofosfamid (CP)	50-18-0		$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	261,09
Ifosfamid (IF)	3778-73-2		$C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$	261,09
5-fluorouracyl (5-FU)	51-21-8		$C_4H_3FN_2O_2$	130,08
Tamoksifen	10540-29-1		$C_{26}H_{29}NO$	371,52
Cisplatyna (CIS)	15663-27-1		$PtCl_2(NH_3)_2$	300,05

ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Zhang i wsp., 2013.

Antybiotyk to lek naturalnego bądź syntetycznego pochodzenia, który charakteryzuje się selektywnym toksycznym mechanizmem działania na bakterie lub inne mikroorganizmy. Światowa konsumpcja antybiotyków sięga dziesiątek tysięcy ton rocznie, a w leczeniu ludzi są one trzecią z najczęściej wypisywanych przez lekarzy grupą farmaceutyków. W medycynie weterynaryjnej z kolei stanowią one więcej niż 70% używanych leków. Ze względu na powszechność stosowania antybiotyków znaczna ich część w postaci leku macierzystego oraz metabolitów przedostaje się do środowiska wraz z moczem i kałem ludzkim i zwierzęcym, w postaci przeterminowanych

leków, ze ściekami szpitalnymi oraz z odpływami z oczyszczalni ścieków. Istotnym źródłem antybiotyków jest również rolnictwo. Są one dodawane do pasz nie tylko celem profilaktyki i leczenia, lecz także w celu promocji wzrostu i zwiększenia wydajności żywienia.

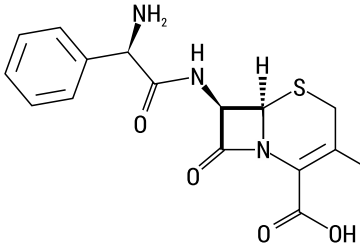
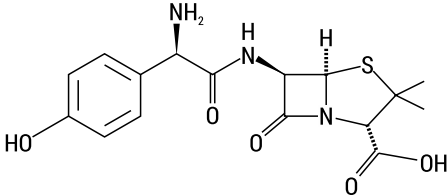
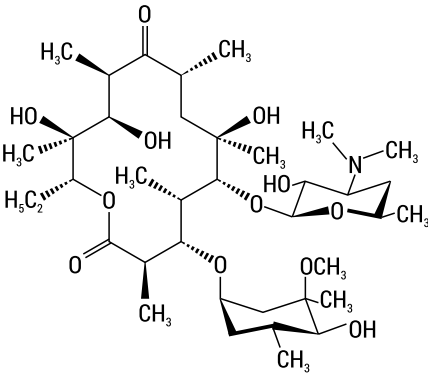
Antybiotyki są metabolizowane przez organizmy żywe z różną wydajnością, od 30% do 90%, po czym lek macierzysty wraz z często aktywnymi biologicznie metabolitami jest wydalany bezpośrednio do gleby lub ścieków. Antybiotyki są wykrywane w ściekach na całym świecie w stężeniach od ng/dm^3 do mg/dm^3 (Liu i wsp., 2009; Mezzelani i wsp., 2018). W matrycach środowiskowych ich aktywność, jak też ich metabolitów zależy od wielu czynników: właściwości fizyko-chemicznych, warunków klimatycznych, pH, typu gleby, obecności związków chemicznych i innych. Antybiotyki są bardzo różnorodną grupą chemiczną związków, których zróżnicowane właściwości chemiczne wpływają na zachowanie, mobilność, trwałość i biodostępność w rozmaitych matrycach środowiskowych. Większość antybiotyków ulega efektywnej sorpcji na cząsteczkach osadów. Najczęściej wykrywane w środowisku są: tetracykliny (TCs), penicyliny (PEs), sulfonamidy (SAs), makrolidy (MAs), aminoglikozydy (AMs) i fluorochinolony (FQs). Najwyższe stężenie w ściekach oczyszczonych zanotowano dla amoksycyliny – do 1670 ng/dm^3 , cefakloru – do 1800 ng/dm^3 , cefaleksyny – do 5070 ng/dm^3 , erytromycyny – do 4330 ng/dm^3 , ofloksacyny – do 7870 ng/dm^3 , sulfodiazyny – do 4180 ng/dm^3 , sulfametoksazolu – do 9460 ng/dm^3 , sulfatiazolu – do 4270 ng/dm^3 , tetracykliny – do 1420 ng/dm^3 , trimetoprimu – do 37000 ng/dm^3 oraz tylozyny – 3400 ng/dm^3 . Wysokie stężenie antybiotyków wykryto też w wodach powierzchniowych na całym świecie – najwyższe dla ciprofloksacyny w wodach rzecznych Francji w stężeniu nawet do 9660 ng/dm^3 , oksytetracykliny w rzekach w Japonii w stężeniu do $68\,000 \text{ ng/dm}^3$ oraz sulfapyridyny w rzekach Hiszpanii w stężeniu do $12\,000 \text{ ng/dm}^3$. W hiszpańskich wodach podziemnych wykryto najwięcej sulfacetamidu, do 3461 ng/dm^3 , w USA zaś sulfametoksazolu, do 1110 ng/dm^3 (Fatta-Kassinos i wsp., 2011; Lonappan i wsp., 2016). W zbiornikach wodnych odbierających ścieki z oczyszczalni notowane stężenia sulfametoksazolu sięgały wartości $4 \mu\text{g/dm}^3$ (Nowrotek i wsp., 2017).

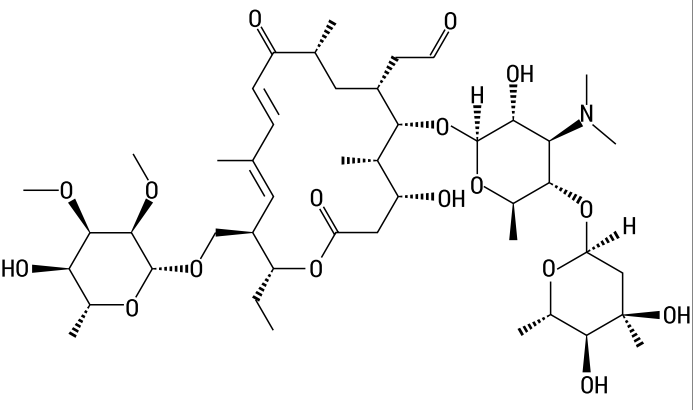
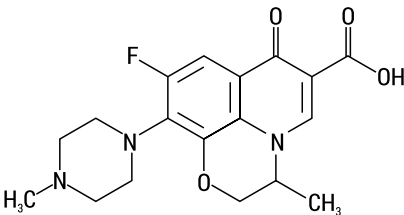
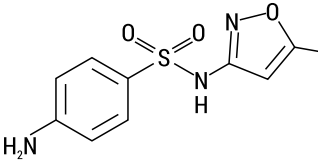
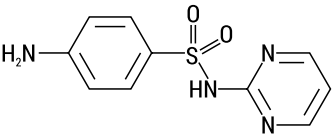
Kwas nalidyksowy (NA) obok innych grup antybiotyków, szczególnie β -laktamowych, jest często wykrywany w matrycach środowiskowych i charakteryzuje się stosunkowo wysoką opornością na biodegradację. Kokoszka i wsp. (2021) w swojej pracy piszą, że najczęściej spotykane stężenie NA w ściekach surowych wynosi od $15,6$ do $50,3 \text{ ng/dm}^3$. Wykazano również zdolność jego bioakumulacji w tkankach roślin, np. w korzeniach pietruszki, w których NA wykryto w stężeniu $0,14$ – $0,72 \text{ ng/g}$ (Kokoszka i wsp., 2021). Kwas nalidyksowy jest chemioterapeutyką należącym do grupy chinolonów, wprowadzonym w 1967 roku do leczenia ludzi i zwierząt. Wykazuje toksyczną aktywność, szczególnie wobec bakterii Gram-ujemnych, jak również drożdży *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Kluyveromyces lactis*. Mechanizm działania NA polega na hamowaniu syntezy DNA w komórkach (Muñoz i wsp., 2020; Kokoszka i wsp., 2021), a jego cytotoksyczne i nowotworowe oddziaływanie stwierdzono też w organizmach wyższych (Morrissey i wsp., 1991; Belyaev, 2011).

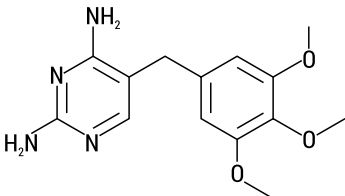
Do tej pory u roślin zidentyfikowano szereg receptorów antybiotyków, które oddziałują na replikację chloroplastów (fluorochinolony), transkrypcję-translację (tetracykliny, makrolidy, linkosamidy, aminoglikozydy), biosyntezę folianów (sulfonamidy) i kwasy tłuszczowe (triklosan). Badania prowadzone w ciągu ostatnich lat potwierdziły niekorzystne oddziaływanie triklosanu na środowisko wodne. Udokumentowano także niekorzystny wpływ ciprofloksacyny na biocenozy wód strumieni, w tym na mikroorganizmy kolonizujące obumierającą biomasę liści. Jeśli chodzi o badania toksyczności antybiotyków, to większość dotyczy środowiska wodnego, mniej zaś gleby. Niewiele jest badań dotyczących chronicznego oddziaływania antybiotyków, szczególnie małych dawek, na środowisko (Fatta-Kassinos i wsp., 2011; Nowrotek i wsp., 2017). Liu i wsp. (2009) zbadali toksykologiczny efekt sześciu wybranych antybiotyków – chlortetracykliny, tetracykliny, tylozyny, sulfametoksazolu, sulfametazyny i trimetoprimu – na kiełkowanie nasion i wzrost roślin owsa, ryżu i ogórka. Badania wykazały, że sulfametoksazol, sulfametazyna oraz trimetoprim działały najtoksyczniej na wzrost roślin w glebie. Ponadto stwierdzono zróżnicowaną gatunkową wrażliwość badanych roślin na różne antybiotyki. Toksyczne działanie sulfametoksazolu zaobserwowano także u nicieni, który zaburzał ich zachowanie i wzrost. Toksyczny efekt fluorochinolonów (norfloksacyny) stwierdzono na bakteriach morskich, gdzie wartość EC_{50} wynosiła $22 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Szczególnie niepokojące jest oddziaływanie uwolnionych do środowiska antybiotyków i ich metabolitów na *Cyanobacteria*. Organizmy te stanowią około 70% biomasy całkowitego fitoplanktonu i są odpowiedzialne za produkcję znacznej części O_2 i wiązania CO_2 . Zaburzenia prawidłowego funkcjonowania ekosystemów wodnych oraz szerzenie się zjawiska antybiotykooporności i opornych mikroorganizmów patogennych to główne zagrożenia zdrowia publicznego spowodowane nadmiernym przedostawaniem się antybiotyków i ich metabolitów do środowiska. W tabeli 1.5 przedstawiono antybiotyki najczęściej wykrywane w ściekach miejskich (Liu i wsp., 2009; Fatta-Kassinos i wsp., 2011).

Do tej pory zidentyfikowano kilkanaście grup mikroorganizmów odpowiedzialnych za mikrobiologiczną biodegradację antybiotyków. Najwięcej badań dotyczy biodegradacji antybiotyków β -laktamowych. Najczęściej opisywanym szlakiem biodegradacji penicylin jest hydrolityczna reakcja, w wyniku której powstaje biologicznie nieaktywny metabolit – kwas penillowy. Analizy wykazały, że degradacja cefalosporyn i penicyliny zachodzi znacznie wydajniej w obecności jonów metali miedzi, cynku, kadmu, kobaltu i rtęci, które stymulują rozpad pierścienia β -laktamowego. Spośród różnych grup mikroorganizmów z potencjałem biodegradacji antybiotyków *Bacillus subtilis* przeprowadza ten proces z dosyć wysoką wydajnością (Yang i wsp., 2019). Udokumentowano, że wyizolowany z gleby szczep *Microbacterium* sp. C448 wykazywał właściwości biodegradacji sulfametazyny (sulfonamid), a szczep *Microbacterium* sp. BR1 miał zdolność biodegradacji sulfametoksazolu (SMX). Stwierdzono, że wiele tlenowych bakterii heterotroficznych z typów *Actinobacteria* lub *Proteobacteria* biotransformuje antybiotyki sulfonamidowe. Biotransformacja sulfonamidów przez szczepy bakteryjne została po raz pierwszy opisana dla *Rhodococcus* i *Pseudomonas*.

TABELA 1.5. Wybrane antybiotyki najczęściej wykrywane w ściekach miejskich

Antybiotyki	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Antybiotyki β-laktamowe				
Cefaleksyna	15686-71-2		$C_{16}H_{17}N_3O_4S$	347,39
Amoksylicyna	26787-78-0		$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	310,15
Antybiotyki makrolidowe				
Erytromycyna	114-07-8		$C_{37}H_{67}NO_{13}$	733,93

Anty-biotyki	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Tylozin	1401-69-0		$C_{46}H_{77}NO_{17}$	916,10
Fluorochinolony				
Oflo-ksacyna	82419-36-1		$C_{18}H_{20}FN_3O_4$	361,37
Sulfonamidy				
Sulfameto-ksazol	723-46-6		$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253,28
Sulfa-diazyna	68-35-9		$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	250,278

Anty-biotyki	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Inhibitor reduktazy kwasu dihydrofoliowego				
Trimeto- prym	738-70-5		$C_{14}H_{18}N_4O_3$	290,32

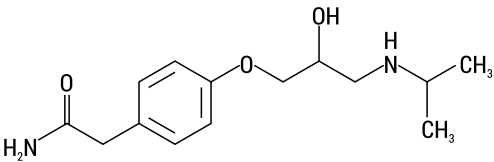
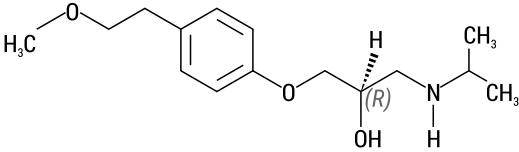
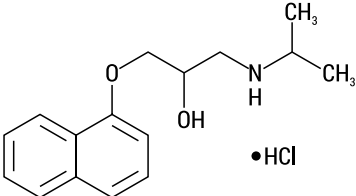
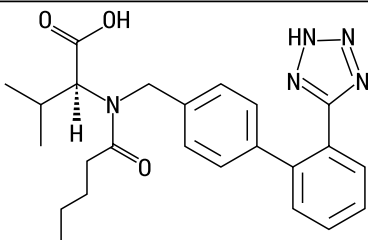
ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Fatta-Kassinos i wsp., 2011.

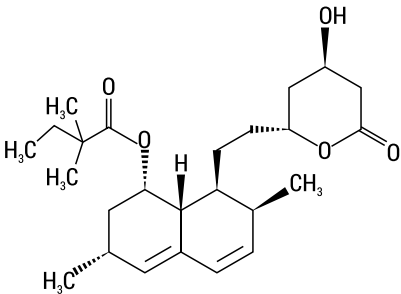
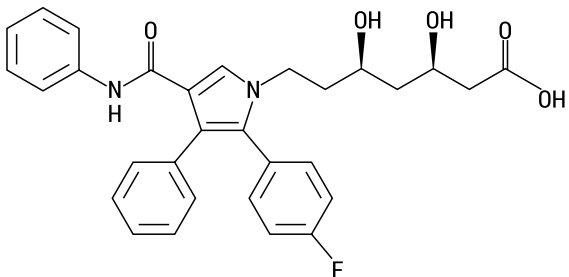
Co ciekawe, zauważono, że podczas tych procesów w zależności od stosowanego podłoża hodowlanego tworzą się różne metabolity. U szczepów *Arthrobacter* D2 i D4, *Terrabacter* sp. i *Acinetobacter* sp. W1 stwierdzono zdolność do degradacji sulfadiazyny. W przypadku antybiotyków aminoglikozydowych jedynie dla jednego szczepu bakterii *Stenotrophomonas maltophilia* opisano zdolność biodegradacji streptomycyny. Potencjał biodegradacji tetracyklin wykryto u grzybów z rodzaju *Basidiomycota* i *Ascomycota* oraz u bakterii *Stenotrophomonas* i *Sphingobacterium*. Zdolność biotransformacji tetracyklin opisano także dla *Paecilomyces* sp. CMB-MF010 i *Fusarium* sp. CMB-MF017 (Reis i wsp., 2020).

Do najważniejszych leków sercowo-naczyniowych należą β -blokery: atenolol (ATE), metoprolol (MET), propranolol (PRP); inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę (ang. *angiotensyn-converting-enzyme* – ACE inhibitors); antagoniści receptora angiotensyny II (sartany, Valsartan – VAL) i blokery kanałów wapniowych (diltiazem – DLM). Betablokery i sartany należą do najpowszechniej wykrywanych leków tej grupy w ściekach i wodach, nawet w stężeniu do $10 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Puckowski i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018). W tabeli 1.6 przedstawiono wybrane leki sercowo-naczyniowe oraz statyny najczęściej wykrywane w ściekach miejskich.

W odpływach z oczyszczalni ścieków stężenie sartanów VAL oraz eprosartanu sięgało do wartości $6,5 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. W ściekach szpitalnych w Portugalii zarejestrowano najwyższe stężenie VAL – $19,8 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Z kolei wysokie stężenie MET wykryto w ściekach szpitalnych w Brazylii – $9,9 \mu\text{g}/\text{dm}^3$, we Włoszech zaś sotalol w stężeniu $6,7 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Znacznie wyższe stężenie leków sercowo-naczyniowych stwierdzono w ściekach z fabryk leków w Indiach, tj. losartan w stężeniu do $2500 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ oraz MET w stężeniu do $950 \mu\text{g}/\text{dm}^3$. Obecność tego ostatniego zarejestrowano także w wodach podziemnych w stężeniu do $0,35 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ oraz w wodzie wodociągowej w stężeniu $0,038 \mu\text{g}/\text{dm}^3$ (Godoy i wsp., 2015).

TABELA 1.6. Wybrane leki sercowo-naczyniowe oraz statyny najczęściej wykrywane w ściekach miejskich

Leki sercowo-naczyniowe	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Atenolol (ATE)	29122-68-7		$C_{14}H_{22}N_2O_3$	266,34
Metoprolol (MET)	56392-17-7		$(C_{15}H_{23}NO_3)_2 \cdot C_4H_6O_6$	684,81
Propranolol (PRP)	318-98-9		$C_{16}H_{21}NO_2 \cdot HCl$	295,80
Valsartan (VAL)	137862-53-4		$C_{24}H_{29}N_5O_3$	435,52

Leki sercowo-naczyniowe	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Statyny				
Simwa-statyna (SIM)	79902-63-9		$C_{25}H_{38}O_5$	418,57
Atorwa-statyna (ATO)	110862-48-1		$C_{33}H_{35}FN_2O_5$	558,64

ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Mezzelani i wsp., 2018.

Leki sercowo-naczyniowe wykryto w tkankach organizmów wodnych w różnych rejonach świata. Do tej pory ustalono, że spośród β -blokerów PRP wykazuje znaczny potencjał akumulacji w organizmach wodnych. Występowanie ATE w stężeniu do 57 ng/g suchej masy oraz PRP – 17,8 ng/g suchej masy potwierdzono u ryb z gatunku *Jenynsia multidentata* oraz *Gambusia affinis* odłowionych u wybrzeży Argentyny. Wyłowiona natomiast z chińskiej rzeki *Hemiculter leucisculus* zawierała w tkankach wątroby i mózgu PRP w stężeniu do 0,2 ng/g mokrej masy. Obecność tego leku w stężeniu do 1 ng/g mokrej masy stwierdzono również w organizmie złowionego ze strumienia Teksasu ślimaka *Planorbis* sp. Dane literaturowe wzmiankują, że prawie 90% gatunków kręgowców i bezkręgowców wyłowionych z jeziora Tai Hu w Chinach zawierało PRP nawet w stężeniu do 111 ng/g suchej masy. Podobnie DLM wykryto w stężeniu do 1,5 ng/g suchej masy w *Crassostrea gigas* pochodzących z delty rzeki Ebro (Puckowski i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).

Dostępnych jest niewiele prac na temat toksyczności ostrej leków sercowo-naczyniowych. Pod tym względem najlepiej przebadane są leki należące do grupy β -blokerów, PRP, MET oraz ATE. W testach toksyczności przeprowadzonych na glonach dla ATE ustalono wartości $EC_{50} = 620 \text{ mg/dm}^3$, dla MET natomiast $EC_{50} = 7,3 \text{ mg/dm}^3$. W przypadku PRP w zależności od gatunku glonów użytych w teście wartości EC_{50} wahały się w granicach od 0,24 do 24 mg/dm^3 (Puckowski i wsp., 2016).

Dla wielu leków sercowo-naczyniowych, np. bisoprololu i lisinoprilolu, nie ma dostępnych badań toksykologicznych, mimo że są one wykrywane w matrycach środowiskowych. Ze względu na znaczne stężenia leków sercowo-naczyniowych w ściekach oraz wodach powierzchniowych istnieje wyraźna potrzeba podjęcia szerszych badań toksykologicznych, jak też oszacowania ryzyka związanego z oddziaływaniem tej grupy leków na środowisko (Ding i wsp., 2015; Puckowski i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).

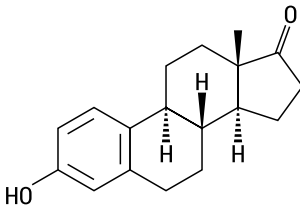
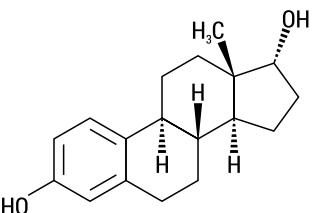
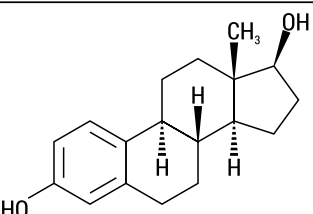
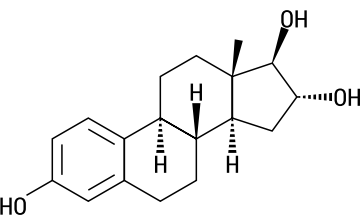
Jeśli chodzi o leki obniżające poziom cholesterolu u ludzi, obecnie do najczęściej stosowanych należą statyny – simwastatyna (SIM) i atorwastatyna (ATO). Niewiele wiemy na temat ich występowania w środowisku. Nieliczne dane literaturowe potwierdzają zdolność ich bioakumulacji w organizmach żywych oraz potencjał ich szkodliwego oddziaływania na nie, nawet w stężeniach ng/dm^3 . U kręgowców główny mechanizm działania statyn polega na obniżeniu syntezy cholesterolu poprzez kompetencyjną inhibicję enzymu 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reduktazy (HMGR), odpowiedzialnej za kontrolę syntezy cholesterolu. Do tej pory ustalono, że statyny są również inhibitorami HMGR u stawonogów, a SIM w stężeniu 160 ng/dm^3 zaburzał rozwój widłonoga *Nitocra spinipes*. Podobne efekty zaobserwowano w rozwoju embrionów jeżowca *Paracentrotus lividus* po ekspozycji na SIM w stężeniu 2000 ng/dm^3 . Z kolei u stawonoga *Gammarus locusta* eksponowanego przez 35 dni na SIM w stężeniu do $8 \text{ }\mu\text{g/dm}^3$ zaobserwowano zaburzenia wzrostu, reprodukcji oraz dojrzewania gonad (Ismail i wsp., 2014; Xie i wsp., 2015; Mezzelani i wsp., 2018).

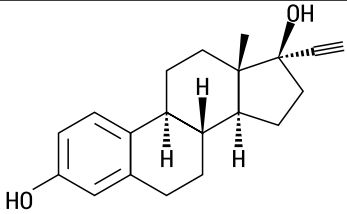
Gemfibrozyl to kolejny lek należący do grupy regulatorów gospodarki lipidowej we krwi człowieka. Jest spotykany w ściekach i wodach powierzchniowych w stężeniach od ng/dm^3 do $\mu\text{g/dm}^3$. Do tej pory opisano jeden gatunek grzyba *Cunninghamella elegans* ATCC 9245, mającego zdolność biotransformacji gemfibrozylu w płynnej hodowli. Istnieją również doniesienia o szczepach *Bacillus sp.* izolowanych z osadu czynnego oczyszczalni ścieków, wykazujących potencjał degradacji tego leku (Caracciolo i wsp., 2015).

Steroidy stanowią grupę organicznych związków chemicznych zawierających w swojej budowie cztery cykloalkanowe pierścienie. Steroidy są rodziną cząsteczek lipidów zawierających cholesterol, hormony steroidowe i sole żółciowe. Do hormonów sterydowych zaliczamy: glukokortykoidy, mineralokortykoidy, androgeny, estrogeny oraz progestogeny. Wszystkie z nich zaangażowane są w metaboliczne reakcje zachodzące w organizmach. Estrogeny ze względu na częstą wykrywalność w ściekach i wodach powierzchniowych należą do najintensywniej badanych hormonów steroidowych. Wyróżniamy estrogeny naturalne i syntetyczne. Do tych pierwszych zaliczamy estron (E1), 17 α -estradiol (α E2), 17 β -estradiol (β E2) oraz estriol (E3),

spośród syntetycznych estrogenów najpopularniejszy jest zaś 17 α -etynyloestradiol (EE2), używany w tabletkach antykoncepcyjnych (Puckowski i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018). W tabeli 1.7 przedstawiono naturalne i syntetyczne estrogeny najczęściej wykrywane w ściekach.

TABELA 1.7. Estrogeny naturalne oraz syntetyczne najczęściej wykrywane w ściekach

Estrogeny	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Estrogeny naturalne				
Estron (E1)	53-16-7		$C_{18}H_{22}O_2$	270,37
17 α -estradiol (α E2)	57-91-0		$C_{18}H_{24}O_2$	272,38
17 β -estradiol (β E2)	50-28-2		$C_{18}H_{24}O_2$	272,38
Estriol (E3)	50-27-1		$C_{18}H_{24}O_3$	288,38

Estrogeny	Numer CAS	Wzór strukturalny	Wzór sumaryczny	Masa molekularna (u)
Estrogeny syntetyczne				
17 α-etynyloestradiol (EE2)	57-63-6		$C_{20}H_{24}O_2$	269,40

ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Puckowski i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018.

Obecność estrogenów naturalnych i syntetycznych w środowisku związana jest z ich coraz powszechniejszym stosowaniem w leczeniu weterynaryjnym zwierząt hodowlanych i domowych oraz hormonalnej terapii zastępczej kobiet i antykoncepcji. Znaczne ilości estrogenów pochodzą też z farm zwierząt hodowlanych, gdzie hormony te występują w karmach. Ze względu na częstą wykrywalność w środowisku oraz toksyczne oddziaływanie na organizmy wodne już w dawkach ng/dm^3 EE2 jest jednym z najczęściej badanych estrogenów (Zhou i wsp., 2012). W chińskich rzekach zanieczyszczonych spływami z obszarów mających kontakt z karmami i nawozami z farm hodowlanych zarejestrowano zawartość E1 nawet do $1267 ng/dm^3$, E2 do $313,6 ng/dm^3$ oraz E3 do $210 ng/dm^3$. Również w ściekach miejskich w różnych rejonach Chin zawartość poszczególnych estrogenów sięgała wartości $85,7 ng/dm^3$ dla E1, $102,8 ng/dm^3$ dla E2, $126 ng/dm^3$ dla EE2 oraz $374 ng/dm^3$ dla E3 (Chen i wsp., 2010; Zhou i wsp., 2012). Ze względu na niską rozpuszczalność estrogenów w wodzie ulegają one silnej sorpcji do gleby i osadów. W Chile wykryto obecność E1, E2, E3 oraz EE2 w 54 próbach pobranych z różnych miejsc w obrębie przybrzeżnych osadów. Największą zawartość, wynoszącą $48,14 ng/g$ suchej masy, zanotowano dla EE2. Z rezerwuarów gleb oraz wód powierzchniowych estrogeny przedostają się do wód pitnych, gdzie ich stężenie sięga nawet wartości $28 ng/dm^3$. Wysokie zanieczyszczenie estrogenami wykryto w Stanach Zjednoczonych – w każdej z 139 prób wód ze strumieni odnotowano ich obecność, najczęściej były to EE2, w stężeniu do $831 ng/dm^3$, oraz E3 (Williams i wsp., 2003; Cargouët i wsp., 2004; Puckowski i wsp., 2016).

Estrogeny wydalone są z organizmu ludzkiego wraz z moczem. Poza farmami hodowlanymi największymi źródłami estrogenów, które przedostają się do środowiska, są ścieki oczyszczone wypływające z oczyszczalni ścieków. Estrogeny mają zdolność zaburzania funkcjonowania układu hormonalnego w narażonych organizmach. Jednym z symptomów ich oddziaływania, a głównie EE2, na organizmy wodne jest podwyższone stężenie indukowanego przez estrogeny prekursorowego białka vitellogeniny (Vtg), która od 1999 roku została uznana za bioindykator związków chemicznych mających potencjał zaburzania układu hormonalnego (EDCs). Do tej pory ustalono, że estrogeny negatywnie oddziałują na prawidłowy rozwój i rozrodczość

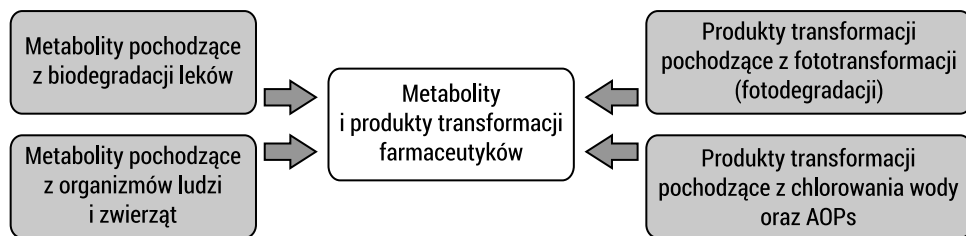
(efekt reprotoksyczny) oraz metabolizm organizmów na różnych poziomach troficznych (Matozzo i wsp., 2008; Jean i wsp., 2012).

Reprotoksyczny efekt estrogenów w wodnych organizmach zaobserwowano w stężeniu niższym od 1 ng/dm^3 (Crane i wsp., 2006). W wodach powierzchniowych Anglii i Francji wykryto wyższe niż 1 ng/dm^3 stężenie EE2, które odpowiednio wynosiły $3,4 \text{ ng/dm}^3$ w Anglii oraz 2 ng/dm^3 dla Francji. W badaniach środowiskowych wykazano, że estrogeny powodują demaskulinizację i zmniejszają płodność u zwierząt, odpowiadają też za rozwój raka jąder (Dudziak i Luks-Betlej, 2004). Zauważono również, że niewielkie dawki estrogenów zmniejszają rozmiar jaj, produkcję spermy, redukują jakość gamet i powodują feminizację samców ryb. Znaczące zaburzenia reprodukcyjnego behawioru zaobserwowano u zebrafish (*Danio reiro*), eksponowanych na niskie stężenie EE2. Ponadto negatywne skutki oddziaływania EE2 na rozrodczość i metabolizm stwierdzono także u *Gammarus pulex*, *C. riparius*, *Hyaletella azteca*, *Lymnaea stagnalis*, szczególnie w testach chronicznych. Dla bezkręgowców ustalono wartość LC_{50} oraz EC_{50} poszczególnym estrogenom E1, E2, EE2 oraz E3. Stężenie to zawierało się w przedziałach $0,1\text{--}10 \text{ mg/dm}^3$ (LC_{50}) oraz $0,01\text{--}4,15 \text{ mg/dm}^3$ (EC_{50}) [Camacho-Muñoz i wsp., 2010].

Do tej pory zidentyfikowano co najmniej kilka rodzajów bakterii mających zdolność biodegradacji hormonów steroidowych. Należą do nich gatunek *Comamonas testosteroni* DSM 50244 rozkładający testosteron oraz wyizolowane z gleby bakterie *Alcaligenes sp.* M21. Kolejnymi modelowymi szczepami biodegradującymi testosteron są *C. testosteroni* ATCC11996 i TA441. Kompletną biodegradację estrogenów opisano dla wyizolowanych z gleby *Nocardia sp.* E 110. Niektóre izolaty *Rhodococcus* pochodzące z gleby i osadu czynnego (*R. equi* i *R. zopfii*) przeprowadzały proces pełnej biodegradacji estrogenów. W testach modelowych z *Novosphingobium tardaugens* NBRC 16725 i *Sphingomonas spp.* również zidentyfikowano mechanizm katabolizmu estrogenów (Chiang i wsp., 2019).

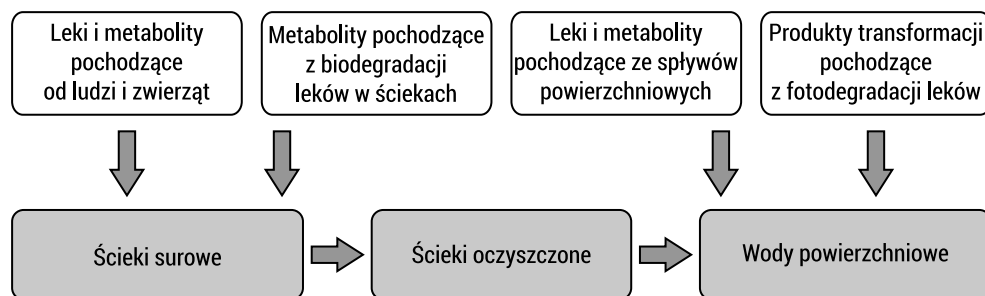
Farmaceutyki po biochemicznej transformacji w organizmach ludzi i zwierząt są przekształcane do polarnych, hydrofilowych i biologicznie aktywnych metabolitów, które wydalone są wraz z moczem i kałem do ścieków (Tiwari i wsp., 2017). Głównymi cechami przypisywanymi metabolitom są ich trwałość i oporność na biodegradację, co wynika z ich niskiego potencjału sorpcyjnego. W matrycach środowiskowych, takich jak ścieki i wody, pozostałości farmaceutyczne występują w mieszaninach z innymi lekami oraz związkami chemicznymi. W środowisku ścieków i wód leki ulegają procesowi biodegradacji z udziałem mikroorganizmów, a w wodach powierzchniowych procesowi fototransformacji (fotodegradacji) z udziałem promieni słonecznych. W wyniku biodegradacji leków powstają metabolity, podczas fotodegradacji natomiast powstają produkty transformacji leków (Celiz i wsp., 2009; Lonappan i wsp., 2016). Zarówno one, jak i same farmaceutyki są prekursorami powstających produktów ubocznych dezynfekcji czy AOPs (ang. *advanced oxidation processes*), które wykazują toksyczność wyższą niż związki wyjściowe. Na rycinie 1.6 zaprezentowano główne źródła metabolitów i produktów transformacji farmaceutyków w matrycach środowiskowych. Z kolei rycina 1.7 przedstawia główne drogi przedostawania się

metabolitów i produktów transformacji leków do ścieków i wód powierzchniowych. Mając na uwadze fakt, że do ścieków z wydaliniami ludzkimi trafiają leki i ich metabolity, należy przebadать także toksyczność metabolitów i ich oddziaływanie na środowisko (Schulze i wsp., 2010; Mezzelani i wsp., 2018). Dlatego wymagana jest ocena pełnego szlaku metabolicznego podczas projektowania nowego leku, wzoru jego wydalania, losu w oczyszczalni ścieków oraz oszacowanie ryzyka związanego z przypadkowym wprowadzeniem leku do gatunków niebędących przedmiotem zwalczania (Tiwari i wsp., 2017).



RYC. 1.6. Główne źródła metabolitów i produktów transformacji farmaceutyków w matrycach środowiskowych

ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Celiz i wsp., 2009.



RYC. 1.7. Główne drogi przedostawania się metabolitów i produktów transformacji leków do ścieków i wód powierzchniowych

ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Lonappan i wsp., 2016.

Dotychczasowe badania naukowe dotyczą głównie oddziaływania na środowisko leków macierzystych. Bardzo niewiele jest zaś prac dotyczących toksyczności metabolitów i produktów transformacji, mieszanin leków macierzystych z metabolitami i produktami transformacji oraz ich możliwych efektów synergistycznych i antagonistycznych z innymi związkami chemicznymi występującymi w ściekach i wodach. Metabolity leków są spotykane zarówno w ściekach surowych, jak i oczyszczonych (Lonappan i wsp., 2016; Tiwari i wsp., 2017). Tiwari i wsp. (2017) podają, że czasami stężenie metabolitów w ściekach oczyszczonych jest wyższe niż leku macierzystego. Przykładem są metabolity ibuprofenu, hydroksyl-ibuprofen i karboksyl-ibuprofen,

oraz desmetylcitalopram (DCIT). Schmidt i wsp. (2018) w swojej pracy powołują się na przykład oczyszczalni ścieków w Hiszpanii, w której stężenie metabolitu 4'-OHDCF było wyższe niż leku macierzystego – DCF.

Wykazano, że aktywne metabolity, takie jak 10,11-dihydro-10,11-epoksy-karbamazepina, N4-acetylosulfametoksazol, 4-hydroksydiklofenak, mają zdolność bioakumulacji w organizmach wodnych i mogą wiązać się kowalencyjnie z białkami komórkowymi, prowadząc do zaburzeń odpowiedzi immunologicznej i wywoływania efektu toksycznego. W odłowionych ze strumienia, do którego odprowadzano ścieki komunalne, *Lepomis macrochirus*, *Ictalurus punctatus* i *Pelophylax nigromaculatus* wykryto metabolity FLU, Nor-FLU, i SER, Nor-SER, w stężeniu większym niż 0,1 ng/g. Udokumentowano, że są one o 50% bardziej toksyczne niż leki macierzyste (Tiwari i wsp., 2017). W kolejnych eksperymentach zaprezentowano, że w wyniku metabolizmu antydepresantów amitriptyliny i imipraminy powstają m.in. N-desmetyl i didesmetyl – stabilne metabolity wykazujące toksyczność w testach Spirotox, z użyciem *Spirostomum ambiguum*, i Thamnotokit, z użyciem *Thamnocephalus platyurus* (Celiz i wsp., 2009). Kolejny zidentyfikowany w rzekach i ściekach w Niemczech metabolit kwasu acetylosalicylowego, kwas salicyłowy, wywoływał w testach ostrych i chronicznych efekt toksyczny w stosunku do embrionów ryb, *Daphnia magna* i *Daphnia longispina* (Tiwari i wsp., 2017). Ibuprofen i jego metabolity, hydroksyl-ibuprofen i karboksyl-ibuprofen, zostały zidentyfikowane w stężeniu wyższym od 1,27 µg/dm³ w odpływach z oczyszczalni ścieków oraz w stężeniu 7 ng/dm³ w wodzie morskiej w Norwegii. Metabolity te odkryto także w Szwecji w ściekach oczyszczonych i zbiornikach wodnych, do których je odprowadzano (Celiz i wsp., 2009).

Karbamazepinę wykryto w ściekach i wodach powierzchniowych w stężeniu odpowiednio 800 ng/dm³ i 20 ng/dm³. Do tej pory w organizmie człowieka zidentyfikowano 32 metabolity karbamazepiny, z czego do najczęściej wykrywanych w matrycach środowiskowych należą: 10,11-epoksy-karbamazepina, 10,11-dihydrodiol-karbamazepina, 2-hydroksykarbamazepina i 3-hydroksykarbamazepina. Odnaleziono je w ściekach surowych i oczyszczonych oraz w wodach powierzchniowych. Stężenie tych metabolitów sięgało wartości 9,3 ng/dm³ w ściekach oczyszczonych i 2,2 ng/dm³ w wodach powierzchniowych (Miao i wsp., 2005).

W badaniach przeprowadzonych w Niemczech w wodach gruntowych ujawniono metabolity leku przeciwbólowego fenazonu – propifenazon i dimetyloaminofenazon. W większości zostały one usunięte podczas procesu uzdatniania wody wodociągowej. Niektóre z metabolitów fenazonu, charakteryzujące się wysoką trwałością, szczególnie 1-acetylo-1-metylo-2-dimetyloksamoilo-2-fenylhydrozyd i 1,5-dimetylo-1,2-dehydro-3-pirazolon, wykryto w stężeniu 1 µg/dm³ w wodzie oczyszczonej (Celiz i wsp., 2009).

Kolejnym lekiem wykrywanym w środowisku jest kwas acetylosalicyłowy, który jest metabolizowany do kwasu salicyłowego ulegającego dalszej przemianie w kwas gentyzynowy, kwas salicylurowy i koniugaty glukuronidowe. Kwas salicyłowy i gentyzynowy wykryto w ściekach i rzekach w stężeniach µg/dm³. W Kanadzie kwas salicyłowy został zidentyfikowany w wodach gruntowych w stężeniu ng/dm³. Udokumentowano,

że jest on toksyczny dla embrionów *Danio* przegowanego, podczas gdy kwas gentyzynowy wykazuje ostre i chroniczne działanie toksyczne na *Daphnia magna* i *Daphnia longispina* (Marques i wsp., 2004). Z kolei w Szwajcarii i Anglii w ściekach oczyszczonych oraz rzekach wykryto acetylsulfametoksazol, metabolit sulfametoksazolu, w stężeniach do 82 ng/dm³ (Celiz i wsp., 2009).

Istnieją doniesienia, że niektóre z metabolitów diklofenaku (DCF) są bardziej toksyczne od leku macierzystego. W testach na glonach udokumentowano sześciokrotnie bardziej toksyczne oddziaływanie produktów fototransformacji diklofenaku w porównaniu z samym diklofenakiem. Ponadto wykazano, że jego metabolity są toksyczne w stosunku do organizmów wodnych (Aristi i wsp., 2016; Lonappan i wsp., 2016). Diklofenak ze względu na częstość występowania w środowisku jest jednym z najlepiej przebadanych leków. Szacuje się, że około 65% DCF występuje w formie metabolitów zawierających w swojej strukturze grupy -OH w różnych pozycjach. Obecność grup hydroksylowych wzmacnia potencjał interaktywności metabolitów z metalami i tworzenie kompleksów, które są nowymi, pojawiającymi się zanieczyszczeniami (ang. *emerging contaminants* – ECs), ich toksyczność może być wyższa od związków macierzystych. Ponadto DCF i jego metabolity mogą wchodzić w interakcje z innymi ECs występującymi w ściekach i wodach powierzchniowych, takimi jak pestycydy lub środki powierzchniowo czynne. Ponieważ ECs często są związkami mającymi w swojej strukturze kilka grup aktywnych, zatem możliwe jest wielokrotne oddziaływanie DCF i jego metabolitów z jednym lub wieloma innymi ECs (Eriksson i wsp., 2010; Schulze i wsp., 2010; Lonappan i wsp., 2016).

1.2. Interakcje farmaceutyków z innymi zanieczyszczeniami w ściekach

Bardzo ważnym problemem, który niewątpliwie wymaga dalszych badań, jest podatność leków i ich metabolitów na interakcje z innymi związkami chemicznymi występującymi w ściekach. Komunalne oczyszczalnie ścieków są kompleksowymi systemami, do których spływają zanieczyszczenia z różnych źródeł. W skład tych zanieczyszczeń wchodzi białka, węglowodany i tłuszcze, organiczne i mineralne związki azotu i fosforu, a także materiały ogniotrwałe, pestycydy, fenole, środki powierzchniowo czynne, metale ciężkie i patogeny różnych kategorii (bakterie, wirusy, pierwotniaki). Ponadto do ścieków trafiają rozmaite farmaceutyki i ich metabolity oraz produkty higieny osobistej (Kümmerer, 2009; Mezzelani i wsp., 2018).

Znacznym problemem w wykrywalności mikrozanieczyszczeń jest ich niskie stężenie w ściekach i wodach, wymagające bardzo czułych metod detekcji. Farmaceutyki, mimo że występują w matrycach środowiskowych w niskich stężeniach, są molekułami wykazującymi wysoki stopień reaktywności i mogą niekorzystnie wpływać na środowisko. Ponadto zanieczyszczenia te mogą oddziaływać z innymi zanieczyszczeniami tej samej lub innej klasy występującymi w ściekach. Ostatnie badania

wykazały antagonistyczne interakcje pomiędzy składnikami odżywczymi a lekami, w tym DCF, w biofilmach ze strumieni. Autorzy prac wyraźnie podkreślają, że przyszłe badania dotyczące oszacowania ryzyka oddziaływania farmaceutyków na środowisko powinny być bardziej ukierunkowane na określenie toksyczności mieszanin leków w porównaniu z lekami macierzystymi (Schulze i wsp., 2010; Lonappan i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018).

W badaniach nad aktywnością mieszanin PRP z FLU, stosowanych przez siedem dni w stężeniu $0,3 \text{ ng/dm}^3$, wykryto antagonistyczny efekt u *M. galloprovincialis*. Fluoksetyna indukowała nadekspresję produktu genu receptora serotoniny (5-HT₁), stosowany natomiast PRP w mieszaninie z FLU przeciwdziałał temu efektowi. W testach toksyczności z *D. magna* opisano efekt synergistyczny mieszanin DCF, IBU, naproksenu oraz kwasu acetylosalicylowego w porównaniu z lekami stosowanymi indywidualnie. Podobnie w testach z antybiotykami pochodzącymi z różnych grup zauważono synergistyczny efekt mieszanin wybranych antybiotyków z erytromycyną zarówno w stosunku do *Cyanobacteria* (*Anabaena* CPB4337), jak i glonów (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Zmiany toksyczności leków zaobserwowano również przy jednoczesnym ich stosowaniu z innymi stresorami związanymi z parametrami klimatycznymi, tj. pH i temperaturą. Stwierdzono, że zmiany wartości pH przyczyniły się do zwiększenia toksyczności karbamazepiny u małży *S. plana*. Podobną sytuację zauważono u małży *R. philippinarum* eksponowanych na DCF, gdzie zmiana wartości pH wywołała wyższą śmiertelność testowanych organizmów. Prawdopodobnie zmiany te były czynnikiem wpływającym na biodostępność leków i reakcję organizmów wodnych na nie (Backhaus, 2014; Lonappan i wsp., 2016).

Diklofenak i jego metabolity, głównie 4'-OHDCF i 5-OHDCF, należą do mikrozanieczyszczeń często wykrywanych w środowisku. Zdolność metabolitów do interakcji z innymi związkami chemicznymi wynika z obecności w ich budowie grup hydroksylowych –OH i możliwości tworzenia kompleksów, których toksyczność może być wyższa od związków macierzystych (Schulze i wsp., 2010; Lonappan i wsp., 2016). W pracach Matejczyk i wsp. (2020a, 2020b, 2020c) zaobserwowano interakcje DCF z metabolitami 4'-OHDCF i 5-OHDCF, wybranymi antybiotykami – ampiciliną, kanamycyną i kwasem nalidyksowym oraz kwasem chlorogenowym, kwasem kawowym i amigdalina. Wykryto także, że DCF w mieszaninach zarówno z metabolitami 4'-OHDCF i 5-OHDCF, jak i badanymi antybiotykami powoduje wzrost toksyczności i genotoksyczności względem *E. coli* w porównaniu z ich odpowiednimi roztworami jednoskładnikowymi. Ponadto mieszaniny te, porównując je do leków i metabolitów stosowanych pojedynczo, podwyższają generację ROS i indukcję promotora *sodA*, co może wskazywać, że głównym mechanizmem działania testowanych w pracy leków i metabolitów oraz ich mieszanin jest stres oksydacyjny.

1.3. Metody oznaczeń farmaceutyków w próbkach środowiskowych

Oznaczanie pozostałości farmaceutycznych w ściekach i wodach należy do trudnych zadań analitycznych. Związane to jest głównie ze złożonym charakterem matrycy (np. ścieki zawierające mieszaninę różnych związków chemicznych) oraz niskim poziomem stężenia analitów, rzędu ppb i ppt (Petrie i wsp., 2015). Ze względu na wymienione czynniki bardzo istotne jest właściwe przygotowanie próbek do oznaczeń. W przypadku próbek wody i ścieków najczęściej przeprowadza się ekstrakcję do fazy stałej (SPE), mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME) oraz rzadziej ekstrakcję ciecz–ciecz (LLE). Próbkę gleby z reguły poddaje się ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami, a następnie ekstrahuje się techniką SPE.

Obecnie do oznaczania farmaceutyków w próbkach środowiskowych wykorzystuje się głównie metody chromatograficzne, a w szczególności wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) oraz chromatografię gazową (GC), sprzężoną z odpowiednimi detektorami pozwalającymi na oznaczanie substancji na bardzo niskich poziomach. Zarówno z użyciem HPLC, jak i GC stosuje się spektrometr mas (MS) lub tandemowy spektrometr mas (MS/MS), rzadziej detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) w przypadku GC czy spektrofotometr z matrycą diodową (DAD) bądź detektor fluorescencyjny (FLD) w przypadku HPLC.

Rodzaj próbek oraz właściwości fizykochemiczne badanych związków chemicznych decydują o wyborze stosowanej metody. Przy związkach polarnych i wysoce rozpuszczalnych najczęściej stosuje się analizę z wykorzystaniem techniki LC–MS/MS. Z kolei GC–MS/MS wykorzystuje się częściej w przypadku oznaczeń związków lotnych (Dębska i wsp., 2003; Aznar i wsp., 2014). W literaturze naukowej do oznaczeń takich farmaceutyków, jak diklofenak, ibuprofen, naproksen, aspiryna, kofeina, ketoprofen w próbkach wody powierzchniowej i ściekach stosuje się ekstrakcję SPE oraz analizę GC–MS. Jednym zaś z etapów oznaczania farmaceutyków o charakterze kwasowym, jak aspiryna, ibuprofen, diklofenak, naproksen, gemfibrozil i kwas klobifrowy, było poddanie próbek derywatyzacji z użyciem odczynnika MSTFA przed dozowaniem do układu GC–MS (Kozarska i Krzyżewska, 2016). Reakcja derywatywacji chemicznej ma na celu modyfikację właściwości fizykochemicznych analitów, w wyniku czego powstaje pochodna zawierająca w swojej strukturze ugrupowanie dające sygnał analityczny kompatybilny z detektorem. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE) oraz chromatografia gazowa sprzężona z detektorem masowym (GC–MS) okazały się bardzo przydatne w oznaczeniu wybranych związków farmaceutycznych z grupy niesteroidowych leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych, tj. ibuprofenu i diklofenaku w środowisku wodnym (Kudlek i wsp., 2015). W pracy Gracia-Lor i wsp. (2011) opisano technikę symultanicznego oznaczenia z wykorzystaniem UHPLC–MS/MS 47 farmaceutyków należących do leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych, antybiotyków oraz leków antydepresyjnych w wodach powierzchniowych i ściekach. W kolejnej pracy Radović i wsp. (2015) przedstawiono oznaczenie 25 wybranych farmaceutyków

należących do antybiotyków, benzodiazepin, NSAIDs oraz związków antyepileptycznych z zastosowaniem techniki LC–MS/MS w próbkach osadów rzecznych i odpowiadających im wodach powierzchniowych i gruntowych. Dorival-García i wsp. (2013) wykonali pracę mającą na celu porównanie efektywności trzech metod ekstrakcji: wspomaganej ultradźwiękami (USE), wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym (MAE) i ekstrakcji cieczą pod ciśnieniem (PLE) w oznaczaniu antybiotyków chinolonowych w próbkach osadów ściekowych. Następnie antybiotyki te oznaczono metodą LC–MS/MS. Analiza statystyczna otrzymanych wyników nie wykazała istotnych statystycznie różnic pomiędzy efektywnością trzech metod ekstrakcji. Z kolei technika LC–MS/MS okazała się bardzo przydatna w oznaczaniu antybiotyków chinolonowych w próbkach osadów ściekowych.

1.4. Mikrobiologiczne biosensory w detekcji farmaceutyków oraz innych związków chemicznych zanieczyszczających środowisko

Rosnąca liczba zanieczyszczeń emitowanych do otaczającego nas świata sprawia, że znacząco zwiększyła się rola monitoringu stężenia i toksyczności wybranych substancji w środowisku. Jedną z głównych zalet wykorzystania biosensorów w tego typu analizach jest możliwość prowadzenia ciągłych pomiarów bezpośrednio na miejscu pobrania próbki (Lu i wsp., 2015). Dzięki biosensorom całokomórkowym można prowadzić detekcję substancji geno- i cytotoksycznych. Biosensory mikrobiologiczne znajdują też zastosowanie w wykrywaniu pestycydów, zanieczyszczeń organicznych, metali ciężkich i leków w środowisku (Matejczyk i Rosochacki, 2014; Bhalla i wsp., 2016; Matejczyk i wsp., 2020a; 2020b; 2020c).

Odkąd Ames i wsp. na początku lat 70. stworzyli test mutagenności z zastosowaniem bakterii *Salmonella*, nastąpił znaczny rozwój w wykorzystaniu genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów do oceny genotoksyczności leków i innych związków chemicznych wykrywanych w środowisku (Mortelmans i Zeiger, 2000; Matejczyk i Rosochacki, 2014). Biosensor to urządzenie wykorzystujące specyficzną reakcję biochemiczną, w której uczestniczą wyizolowane enzymy, układy immunologiczne, tkanki, organelle lub całe komórki, w celu wykrycia docelowych substancji – zazwyczaj poprzez układ elektryczny, termiczny lub optyczny (Tichoniuk, 2013). Biosensor jest urządzeniem analitycznym, którego praca opiera się na przekształceniu wyniku reakcji biologicznej na sygnał analityczny. Biosensory mikrobiologiczne zawierają w swojej budowie całe komórki drobnoustrojów, np. bakterie *E. coli*. Obecnie urządzenia te odgrywają ważną rolę we wstępnym badaniu przesiewowym i detekcji szkodliwych dla zdrowia związków chemicznych w ściekach, wodach powierzchniowych i wodzie przeznaczonej do spożycia (Matejczyk, 2010; Matejczyk i Rosochacki, 2014).

Bakterie wystawione na działanie czynników stresogennych, np. związków chemicznych, uruchamiają szereg mechanizmów komórkowych mających na celu ochronę i naprawę ewentualnych uszkodzeń będących skutkiem ekspozycji na stres. Jedną z możliwości obrony i naprawy uszkodzeń jest bakteryjny regulon SOS, który stanowi przykład adaptacyjnej odpowiedzi bakterii na stres. Regulon SOS jest aktywowany w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane działaniem czynników genotoksycznych. Promotory genów bakteryjnego regulonu SOS w transkrypcyjnych fuzjach z genem reporterowym *luxCDABE* są wykorzystywane w konstrukcji mikrobiologicznych biosensorów znajdujących szerokie zastosowanie w ocenie potencjału genotoksycznego wielu związków chemicznych. BioczuJNIKI z genem reporterowym *luxCDABE* opierają się na wytwarzaniu luminescencji w wyniku działania enzymu lucyferazy (Kostrzyńska i wsp., 2002; Melamed i wsp., 2012; Lee i wsp., 2013). Promotor *recA* jest jednym z najczęściej stosowanych promotorów regulonu SOS ze względu na swoją bardzo znaczącą rolę w aktywacji odpowiedzi SOS. Bierze on udział w kilku różnych mechanizmach naprawczych DNA, w tym eliminacji luk w nici potomnej DNA, pęknięć podwójnej helisy, jak również w mechanizmie tolerancji na błędy replikacyjne (Matejczyk, 2010).

W badaniach zespołu prof. Shimshona Belkina z zastosowaniem szczepu *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* wykazano wysoki stopień indukcji promotora *recA* po ekspozycji hodowli bakterii na różne grupy leków, w tym antybiotyki oraz NSAIDs (Merkamm i Guyonvarch, 2001; Melamed i wsp., 2012). We wcześniejszych badaniach własnych zaobserwowaliśmy również znaczną indukcję promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*, po ich ekspozycji na DCF, jego metabolity (4'-OHDCF i 5-OHDCF) i wybrane produkty pośrednie AOPs (2,6-dichloroanilinę, kwas 2-hydroksyfenyloctowy oraz kwas 2,5-dihydroksyfenyloctowy). Indukcję promotora *recA* wykryto też po inkubacji hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* z mieszaninami DCF i jego metabolitów (4'-OHDCF, 5-OHDCF) z antybiotykami, jak ampicylina i kanamycyna (Matejczyk i wsp., 2020a; 2020b; 2020c).

Mikrobiologiczne biosensory oparte na różnych gatunkach drobnoustrojów, zawierające fuzję genetyczną genów reporterowych pod kontrolą wybranych promotorów reagujących na antybiotyki, stają się coraz popularniejsze w badaniach nad nowymi lekami przeciwbakteryjnymi oraz w walce z rozprzestrzenianiem się zjawiska oporności. W eksperymencie przeprowadzonym przez Urban i wsp. (2007) wykorzystano do konstrukcji bioczuJNIKÓW sekwencje promotorowe z *Bacillus subtilis* połączone z genem reporterowym lucyferazy. Biosensory reagowały na obecność inhibitorów głównych szlaków biosyntezy u bakterii: syntezy kwasów tłuszczowych (promotor *fabHB*), syntezy DNA (*yorB* promotor), syntezy ściany komórkowej (promotor *ypuA*), syntezy RNA (promotor *yvgS*) i syntezy białek (promotor *yheI*). Używając tych biosensorów, przetestowano pod kątem antybakteryjnej aktywności szereg związków pochodzenia naturalnego, z czego 6% wykazywało aktywność przeciw *Bacillus subtilis* w stężeniu $\leq 2,5$ mg/dm³. Biosensory te są obiecującym narzędziem w badaniach nad nowymi antybiotykami i poznaniem mechanizmów ich działania w komórce. W pracy Song i wsp. (2012) opisano zastosowanie mikrobiologicznych biosensorów

z genami reporterowymi *lacZ*, *selA* i *nuoA* oraz promotorem *tn10 tetA* w *Escherichia coli* do wykrywania tetracykliny (Tet). BioczuJNIKI z promotorami *lacZ* i *nuoA* reagowały na tetracyklinę przy granicach wykrywalności odpowiednio 110 µg/dm³ i 2,6 µg/dm³. Nie zaobserwowano odpowiedzi na tetracyklinę z użyciem bioczuJNIKA z promotorem *selA*.

W badaniach środowiskowych celem ustalenia mechanizmu działania zanieczyszczeń często wykonuje się oznaczenia genotoksyczności. Pomocne tutaj są mikrobiologiczne biosensory, zawierające w swojej budowie elementy wrażliwe na genotoksyny. Biran i wsp. (2011) skonstruowali bakteryjny szczep reporterowy do oceny genotoksyczności, w którym promotor *sulA* należący do systemu odpowiedzi SOS *Escherichia coli* został połączony z genem reporterowym fosfatazy alkalicznej – *phoA*. Biosensor *E. coli* pozytywnie reagował na czynniki uszkadzające DNA: nadtlenuk wodoru, kwas nalidyksowy (NA) i mitomycynę C (MMC), w sposób zależny od dawki i przy niskim stężeniu badanych związków – 0,15 µM dla MMC, 7,5 µM dla NA i 50 µM dla nadtlenuku wodoru. Kolejni autorzy (Yagur-Kroll i wsp., 2010) stworzyli dwa czuJNIKI bakteryjne z promotorami *sulA* i *grpE* z genem reporterowym *luxCDABE* (*sulA::luxCDABE* i *grpE::luxCDABE*), które reagowały na NA i etanol. Aby poprawić czułość tego układu, szczególnie by uzyskać wcześniejsze czasy odpowiedzi komórkowej i wzrost intensywności sygnału, wprowadzono manipulację molekularną regionu promotora.

Benzen, toluen, etylobenzen oraz *o*-, *m*- i *p*-ksylen, czyli BTEX, to grupa jednopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Są to związki chemiczne szeroko stosowane w przemyśle jako rozpuszczalniki, a także w produkcji smarów, farb, lakierów i tworzyw sztucznych. Występują również w dużych ilościach w paliwach oraz w produktach pochodnych, jak olej napędowy czy opały. Związki chemiczne należące do grupy BTEX są częstym zanieczyszczeniem wykrywanym w środowisku (Wojtowicz, 2018). Yu i wsp. (2011) skonstruowali bioczuJNIKI oparte na *Escherichia coli* reagujące na benzen, toluen, etylobenzen i ksyleny. W konstrukcjach genowych zastosowano promotor *Pu* i regulator XylR z plazmidu TOL *Pseudomonas putida* oraz gen reporterowy *lux*. Indukcja aktywności luminescencyjnej *E. coli* biosensorycznych szczepów przez 2-chlorotoluen wykazała znaczący wzrost intensywności emisji sygnału luminescencyjnego w porównaniu z kontrolą. Kolejną grupą związków aromatycznych są nitrotolueny będące pochodną toluenu. Behzadian i wsp. (2011) opisali rekombinowane bioczuJNIKI z plazmidowymi pGLPX konstrukcjami genowymi z genem reporterowym *luc* oraz promotorem *Pu*, które wykazywały wrażliwość na zróżnicowane stężenia nitrotolueny. Mikrobiologiczne biosensory znalazły także zastosowanie w badaniach nad biodegradacją benzoenu i pirokatechiny. Silva-Rocha i de Lorenzo (2012) opisali bicistroniczny konstrukt genowy zintegrowany z chromosomem bakteryjnym, który wykorzystuje sztuczny operon zawierający geny *gfp* i *lacZ*. Reporterowy konstrukt genowy zastosowano do monitorowania aktywności dwóch promotorów – *Pb* i *Pc*, odpowiedzialnych za ekspresję szlaków degradacji benzoenu i pirokatechiny u *Pseudomonas putida* KT2440.

Miedź ze względu na swoje szerokie zastosowanie szczególnie w przemyśle jest częstym zanieczyszczeniem wykrywanym w środowisku. Ng i wsp. (2012) w swoim eksperymencie stworzyli biosensor służący do detekcji miedzi, zawierający fuzję genetyczną operonu *cop* z *Achromobacter* sp. AO22. Tak skonstruowany mikrobiologiczny biosensor znalazł zastosowanie w detekcji miedzi w glebie.

Bakteryjne biosensory z genami reporterowymi są wykorzystywane w monitorowaniu biodegradacji fenantrenu. Zaprezentowano to w pracy Shin i wsp. (2011), w której bakterie degradujące fenantren, *Sphingomonas paucimobilis* EPA505, użyto do skonstruowania szczepu D z *gfp* jako reporterem. W szczepie tym podczas biodegradacji fenantrenu dochodziło do ekspresji genu *gfp* i pojawienia się zielonej fluorescencji. Tecon i wsp. (2009) stworzyli podwójnie znakowany szczep *Burkholderia sartisoli* RP037-mChe z genem reporterowym *gfp*, który był zdolny do mineralizacji fenantrenu (PHE) i indukcji ekspresji *gfp*.

W kolejnym eksperymencie Abd-El-Haleem i wsp. (2007) opracowali bioreporter bioluminescencyjny *Klebsiella oxytoca* oparty na *luxCDABE* do wykrywania biodostępności azotanów i azotynów w ściekach. Bazujący na Tn5 konstrukt genowy zawierał 500 pz fragment DNA aktywowany azotanami i azotynami promotor *nasR-like* w fuzji z genem reporterowym *luxCDABE*. W przeprowadzonym eksperymencie z zastosowaniem bioluminescencyjnego biosensora w *Klebsiella oxytoca* zauważono dodatnią korelację między stężeniami azotanów, azotynów i jonami amonu (od 1 do 11 ppm) a intensywnością bioluminescencji.

1.5. Procesy usuwania farmaceutyków ze ścieków

W oczyszczalni ścieków mechanizm usuwania mikrozanieczyszczeń jest oparty na procesach sorpcji i/lub biodegradacji. Sorpcja farmaceutyków zachodzi wskutek hydrofobowego oddziaływania grupy alifatycznej i aromatycznej, cząsteczek lipidów osadu lub błony komórkowej mikroorganizmów oraz w następstwie oddziaływania elektrostatycznego dodatnio naładowanego farmaceutyku z ujemnie naładowanymi drobnoustrojami i osadem. Oznacza to, że sorpcja zależy od wartości $\log K_{ow}$ (współczynnik podziału oktanol-woda, charakteryzujący farmaceutyk), K_d (współczynnik adsorpcji osadu) i pK_a (stała dysocjacji kwasu) [Tiwari i wsp., 2017]. Głównym mechanizmem eliminacji farmaceutyków w oczyszczalni ścieków jest biodegradacja, polegająca na rozkładzie farmaceutyku jako substratu stanowiącego główne źródło węgla i energii dla drobnoustrojów i z udziałem ich aparatu enzymatycznego. Kolejny mechanizm to kometabolizm zwany również biodegradacją kometaboliczną, czyli stan, w którym procesom biodegradacji farmaceutyków towarzyszą przemiany innych związków chemicznych stanowiących substraty podtrzymujące wzrost mikroorganizmów (Jelic i wsp., 2011; Greń, 2012; Kim i wsp., 2014). Badania wykazały, że grzyby *Trametes versicolor* skutecznie usuwały karbamazepinę dzięki wydzielaniu enzymów lakazy i peroksydazy (Jelic i wsp., 2011). Zidentyfikowano

także szczepy *Pseudomonas* wykorzystujące antybiotyk sulfametoksazol jako jedyne źródło węgla i energii (Jiang i wsp., 2020). Badania porównawcze między procesem degradacji kometabolicznej i pojedynczego substratu wykazały, że biodegradacja ta była głównym mechanizmem usuwania ibuprofenu, bezafibratu i naproksenu, podczas gdy ketoprofen był częściowo degradowany jako jedyny substrat. Takie czynniki, jak parametry operacyjne (czas retencji, temperatura, pH), skład ilościowy i gatunkowy mikroorganizmów, kompleksowość i biodostępność zanieczyszczeń farmaceutycznych, wpływają na szybkość i wydajność biodegradacji (Tiwari i wsp., 2017).

W procesach biologicznego rozkładu zanieczyszczeń organicznych wykorzystuje się populacje mikroorganizmów zawieszone w toni ścieków (metoda osadu czynnego) lub mikroorganizmy tworzące złoża biologiczne. Głównym zadaniem komunalnych oczyszczalni ścieków jest eliminacja rozpuszczalnych zanieczyszczeń organicznych i zawieszonych ciał stałych oraz oczyszczanie ścieków przed zrzutem do środowiska. Metody osadu czynnego stosuje się na całym świecie do oczyszczania ścieków, są one jednak niewystarczające do usunięcia trwałych mikrozanieczyszczeń. Typowym przykładem jest DCF, którego obecność wykryto w odpływach z oczyszczalni ścieków oraz rzekach odbierających. Oporność DCF na rozkład z udziałem mikroorganizmów osadu czynnego prawdopodobnie związana jest z obecnością atomów chloru w jego cząsteczkach (Kanakaraju i wsp., 2018). Stwierdzono także dosyć niską wydajność usuwania fenazonu, kwasu klofibrowego i karbamazepiny techniką osadu czynnego. Kolejnymi grupami leków stosunkowo opornych na rozkład z udziałem mikroorganizmów osadu czynnego są regulatory lipidów (gemfibrozil, bezafibrat, aktywne, polarne metabolity klofibratu, fenofibrat oraz etofibrat), DCF i IBU, β -blokery (metoprolol, propranolol, betaksolol). Obecność tych leków i metabolitów stwierdzono w rzekach i strumieniach, do których odprowadzano ścieki oczyszczone. Technika osadu czynnego pozwoliła na 70-procentową wydajność usunięcia ośmiu badanych farmaceutyków oraz hormonów ze ścieków. Z kolei dla IBU, NAP, 17 β -estradiolu oraz sulfametoksazolu wydajność eliminacji wynosiła odpowiednio 65, 50, 65 i 60%. W przypadku hormonów najwyższą wydajność usuwania techniką osadu czynnego stwierdzono dla estronu (E1), nawet do 99%. Dla 17 β -estradiolu (E2) oraz 17 α -etynyloestradiolu (EE2) wartości te wynosiły odpowiednio 98 i 94% (Nakada i wsp., 2008; Kanakaraju i wsp., 2018).

Yu i wsp. (2013) monitorowali sezonowe zmiany stężenia 13 związków zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (EDCs) i farmaceutyków w ściekach. Łączne stężenie farmaceutyków wpływających do oczyszczalni ścieków było o 10–15 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ wyższe w zimie niż w lecie. Różnice wynikały z ich dużego zużycia zimą i szybszej degradacji latem. Literatura wskazuje, że zmiany temperatury mogą mieć wpływ na wydajność degradacji. W badaniach dotyczących mechanizmów usuwania farmaceutyków takich jak IBU lub NAP stwierdzono, że sorpcja i biodegradacja odgrywają główną rolę w ich eliminacji w oczyszczalni ścieków. Kolejnym ważnym czynnikiem wpływającym na wydajność usuwania farmaceutyków, np. β -blokerów techniką osadu czynnego, jest wiek osadu w systemie (SRT) [Samaras i wsp., 2013].

W ostatnich latach większą uwagę zwrócono na nowy rodzaj osadu czynnego, okreśłany mianem tlenowego granulowanego osadu czynnego, który może być potencjalnie wykorzystywany do eliminacji farmaceutyków ze ścieków. International Water Association definiuje tlenowy osad granulowany jako agregaty o charakterze mikrobiologicznym (Cydzik-Kwiatkowska, 2017; Ofman, 2017). Do jego głównych cech należą sferyczny kształt granul, znaczne właściwości sedymentacyjne, gęsta i zwarta struktura mikrobiologiczna oraz wysoka retencja biomasy (Liu i wsp., 2009; Ofman, 2017). Powyższe właściwości tlenowego osadu granulowanego przyczyniają się do tego, że może być to obiecująca technologia w systemach biologicznego oczyszczania ścieków ze znacznym ładunkiem farmaceutyków. Do tej pory wykazano, że tlenowe granulule w porównaniu z osadem kłaczkowatym wykazują znacznie większą oporność na działanie związków toksycznych obecnych w ściekach. W literaturze opisano zastosowanie tlenowych granul do oczyszczania ścieków zawierających fenol, farmaceutyki, metale ciężkie lub barwniki (Zhao i wsp., 2014; Ofman i Struk-Sokołowska, 2019; Ofman i wsp., 2020). W badaniach przeprowadzonych przez Amorim i wsp. (2014) dokonano oceny usuwania fluorochinolonów (FQ; ofloksacyny, norfloksacyny i ciprofloksacyny) przy użyciu tlenowego granulowanego osadu i zbadano wpływ tych farmaceutyków na wydajność głównych procesów biochemicznych zachodzących w reaktorze. Oceniono także zmiany w składzie mikroorganizmów w tym osadzie narażonym na działanie farmaceutyków. W przeprowadzonym eksperymencie nie wykazano dowodów na biodegradację FQ, jednakże stwierdzono ich adsorpcję do tlenowych granul osadu i stopniowe uwalnianie farmaceutyków do ścieków. Ponadto przedstawiono hamujący wpływ FQ na denitryfikację oraz na aktywność organizmów gromadzących polifosforany, na co wskazywał spadek zdolności usuwania P podczas fazy tlenowej. Dodatkowo elektroforeza w gradiencie denaturującym ujawniła zmiany w składzie mikroorganizmów wynikające z ich ekspozycji na FQ (Amorim i wsp., 2014). W kolejnej pracy Wang i wsp. (2016) zbadali efektywność usuwania prednizolonu, norfloksacyny, naproksenu, sulfametoksazolu i ibuprofenu technologią tlenowego granulowanego osadu czynnego zaszczerpionego w bioreaktorach membranowych MBR (ang. *Membrane Bioreactors*). Wskaźniki usuwania prednizolonu, norfloksacyny i naproksenu osiągnęły odpowiednio wartości 98,5, 87,8 i 84%. Dla sulfametoksazolu i ibuprofenu efektywność degradacji była niższa, z wydajnością usuwania wynoszącą odpowiednio 79,8 i 63,3%. Podobne rezultaty otrzymali Zhao i wsp. (2014), którzy zastosowali tlenowy granulowany osad czynny do degradacji prednizolonu, naproksenu i ibuprofenu. W przypadku dwóch pierwszych wskaźniki usuwania leków wynosiły 98,46 i 84,02%, w przypadku ibuprofenu natomiast 63,32%.

Obiecującym rozwiązaniem w technologii usuwania farmaceutyków ze ścieków są bioreaktory membranowe MBR. Charakteryzują się one długim wiekiem osadu oraz wyższym stężeniem biomasy, co przyczynia się do zwiększenia wydajności biodegradacji farmaceutyków w porównaniu z metodami osadu czynnego. Technologia MBR to połączenie konwencjonalnego oczyszczania osadem czynnym z membraną niskociśnieniową, gdzie proces separacji membranowej stanowi fizyczną przeszkodę

dla zatrzymania mikroorganizmów. Uważa się, że system MBR w usuwaniu mikro-zanieczyszczeń jest wydajniejszy od konwencjonalnego procesu osadu czynnego (Sipma i wsp., 2010; Kanakaraju i wsp., 2018).

Wykorzystanie bioreaktorów membranowych (MBR) w oczyszczaniu ścieków szpitalnych było powszechną praktyką w poprzednich dekadach. W technologii MBR zaobserwowano 99-procentową eliminację 17 β -etynyloestradolu oraz spadek stężenia kofeiny, acetaminofenu, sulfametoksazolu, karbamazepiny i gemfibrozylu, z wysoką skutecznością usuwania wahającą się między 99,1% (sulfametoksazol) a 99,9% (acetaminofen). Wykryto także wyższą skuteczność usuwania ketoprofenu i naproksenu w systemie MBR w porównaniu z konwencjonalnym osadem czynnym (CAS), podczas gdy skuteczność usuwania kwasu klofibrynowego, ibuprofenu, diklofenaku i kwasu mefenamowego była podobna (Dawas-Massalha i wsp., 2014). Radjenović i wsp. (2009) porównali skuteczność degradacji farmaceutyków w technologii MBR oraz CAS. Wydajność degradacji takich związków jak diklofenak, metoprolol i kwas klofibrynowy wynosiła 87,4%, 58,7% i 71,8% w MBR, podczas gdy w procesie CAS tylko 50% dla diklofenaku i 27% dla kwasu klofibrynowego. Nie zaobserwowano usuwania metoprololu w technologii CAS.

W usuwaniu pozostałości farmaceutycznych z wód i ścieków obiecującym rozwiązaniem jest zastosowanie adsorpcji na węglach aktywowanych. Wzbogacenie nimi technologii MBR zapewnia dodatkową powierzchnię dla wzrostu bakterii, a także adsorbuje zanieczyszczenia o niskiej masie cząsteczkowej. Granulowany (GAC – ang. *granular activated carbon*) i sproszkowany węgiel aktywowany (PAC – ang. *powdered activated carbon*) zwykle stosowano do adsorpcji związków organicznych takich jak pestycydy. Zaobserwowano, że dodanie GAC w ilości 0,5 g/dm³ do zbiornika napowietrzania osadu czynnego zwiększało eliminację diazepam, diklofenaku i karbamazepiny (Ma i wsp., 2012).

Węgłe aktywowane ze względu na swoje właściwości, takie jak porowata struktura i chemiczna budowa ich powierzchni, wysoka pojemność adsorpcyjna, odporność chemiczna i termiczna oraz cechy katalityczne, są szeroko stosowane w usuwaniu zanieczyszczeń organicznych. W celu zwiększenia pojemności adsorpcyjnych w stosunku do określonych zanieczyszczeń prowadzi się modyfikację węgla aktywowanych (Szymonik i Lach, 2016). Wydajność usuwania farmaceutyków z zastosowaniem węgla aktywowanego zależy od wielu czynników, m.in. czasu kontaktu zanieczyszczenia z węglem aktywowanym i od jego struktury. W procesie adsorpcji ibuprofenu na węglu aktywowanym uzyskanym z odpadów z korka wykryto, że aktywacja chemiczna parą wodną i K₂CO₃ węgla aktywowanego skutkowałą większą szybkością adsorpcji i większą pojemnością adsorpcyjną w porównaniu z materiałem aktywowanym tylko K₂CO₃ (Mestre i wsp., 2007). W innych badaniach wykorzystano materiał wykonany z odpadów z moreli aktywowany ZnCl₂, który charakteryzował się wysoką skutecznością usuwania naproksenu (Önal i wsp., 2007). W badaniach przeprowadzonych przez Serrano i wsp. (2011) dodanie PAC w ilości 1 g/dm³ do bioreaktora membranowego do adsorbowania pozostałości farmaceutycznych ze ścieków miejskich zredukowało wartości parametru ChZT o 95%, azotu amonowego w 70–80%,

a fosforu o około 80%. Podane wartości procentowe odnoszą się do sumarycznego efektu eliminacji farmaceutyków na drodze biodegradacji MBR z dodatkiem PAC, co spowodowało 85-procentową redukcję zawartości karbamazepiny, diazepam, diklofenaku i trimetoprimu w badanym układzie. Wang i Wang (2016) w swojej pracy podają, że PAC znalazł zastosowanie w wydajnym usuwaniu farmaceutyków należących do grup hormonów (estriol, estron, estradiol), antybiotyków (sulfametoksazol, trimetoprim, tetracykliny), regulatorów gospodarki lipidowej (gemfibrozyl, kwas kłofibrowy), NSAIDs (ibuprofen, diklofenak, paracetamol, naproksen), β -blokerów (atenolol, propranolol), leków neuroaktywnych (diazepam, karbamazepina) z wód powierzchniowych i ścieków. W przypadku niektórych leków, jak naproksen, paracetamol, ibuprofen, wydajność ich usuwania z użyciem węgla aktywowanego wynosiła powyżej 90% (Wang i Wang, 2016).

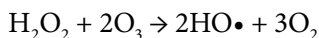
Kolejnymi procesami oczyszczania wody i ścieków z mikrozanieczyszczeń organicznych, w tym farmaceutyków, są ciśnieniowe procesy membranowe obejmujące ultrafiltrację (UF), nanofiltrację (NF) oraz odwróconą osmozę (RO) [Kudlek i wsp., 2015]. Ta ostatnia polega na wymuszonej dyfuzji rozpuszczalnika przez błonę półprzepuszczalną rozdzielającą dwa roztwory o różnym stężeniu. Zachodzi od roztworu o wyższym stężeniu substancji rozpuszczonej do roztworu o stężeniu niższym. Aby zapoczątkować proces odwróconej osmozy, konieczne jest przyłożenie ciśnienia (od 1 do 10 MPa) wymuszającego przenikanie cząstek przez membranę (Tałała, 2013; 2017). Do tej pory wykazano, że w procesie tym skutecznie usuwane są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, pestycydy oraz farmaceutyki (Kudlek i wsp., 2015). W pracy Alonso i wsp. (2018) zaprezentowano ponad 90-procentową wydajność usunięcia antybiotyku, ciprofloksacyny, z wody morskiej z zastosowaniem odwróconej osmozy. Podobne rezultaty otrzymano w badaniach przeprowadzonych przez Gholami i wsp. (2012), gdzie wydajność usunięcia wybranych antybiotyków, ampicyliny i amoksycyliny, z modelowych ścieków w procesie RO przekraczała 95%. Technika odwróconej osmozy okazała się również skuteczna w eliminacji hormonów płciowych oraz NSAIDs z wód powierzchniowych i ścieków. Dla diklofenaku i ibuprofenu metodą tą usunięto ponad 98% zanieczyszczeń (Kudlek i wsp., 2015).

Przeprowadzono również szereg badań dotyczących skuteczności zastosowania procesu filtracji membranowej, zwanej też nanofiltracją lub niskociśnieniową odwróconą osmozą, w usuwaniu pozostałości farmaceutycznych. W procesie nanofiltracji siłą napędową jest różnica ciśnień pomiędzy dwiema stronami membrany, tzw. ciśnienie transmembranowe. Na membranie w czasie filtracji zatrzymywane są związki organiczne o masie cząsteczkowej $> 200\text{--}300$ Da oraz jony dwu- i więcej wartościowe, a przepuszczane w dużym stopniu jony jednowartościowe. Nanofiltracja odbywa się pod ciśnieniem procesowym około 10–30 barów, czyli 1–3 MPa (Kudlek i wsp., 2015; Vona i wsp., 2015). Stosowano ją w procesie uzdatniania wody do skutecznego usuwania związków organicznych o niskiej masie cząsteczkowej, takich jak środki ochrony roślin i substancje zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego (Vona i wsp., 2015). Wykazano, że wydajność usuwania pozostałości farmaceutycznych techniką nanofiltracji zależy od pH oraz momentu dipolowego. W przypadku leków

często wykrywanych w matrycach środowiskowych, jak diklofenak, zaobserwowano ponad 90-procentową efektywność usuwania. Ibuprofen w mniejszym stopniu ulegał procesowi eliminacji na drodze nanofiltracji (Kimura i wsp., 2003). Z kolei w pracy Vergili (2013), dotyczącej usuwania wybranych związków farmaceutycznych z wody powierzchniowej, w układzie filtracji krzyżowej wykazano zaledwie ponad 50-procentowe usunięcie diklofenaku i ibuprofenu. Dla karbamazepiny wartości te były jeszcze niższe. Eksperymenty porównujące efektywność usuwania wybranych farmaceutyków z zastosowaniem nanofiltracji i odwróconej osmozy wykazały, że podczas tej pierwszej nie została zatrzymana nawet połowa paracetamolu, stosując natomiast RO efektywność eliminacji leku osiągnęła wartość 85% (Nghiem i wsp., 2005; Bogdanowicz i Wąsowski, 2018). Wysoki stopień usuwania farmaceutyków z zastosowaniem nanofiltracji zanotowano dla ketoprofenu oraz diklofenaku, wartość współczynnika retencji R (tj. efektywności eliminacji) dla obu farmaceutyków przekroczyła 95%. W przypadku gemfibrozylu efektywność usuwania była niższa szczególnie podczas nanofiltracji, gdzie jego cząsteczki przeniknęły przez membranę w 50%, a kwasu mefenamowego aż w 70%. Zaskakująco wysoki stopień eliminacji zarówno podczas NF, jak i RO otrzymano dla sulfametoksazolu, dla którego współczynnik retencji R wyniósł w przybliżeniu 100%. Podobne rezultaty z $R > 80\%$ zaobserwowano dla β -blokerów, sotalolu i metoprololu (Radjenović i wsp., 2008; Bogdanowicz i Wąsowski, 2018).

Dotychczas przeprowadzone badania wskazują na niską efektywność procesu koagulacji w usuwaniu farmaceutyków. Niezależnie od zastosowanego rodzaju koagulantu – FeCl_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ – a także warunków prowadzenia procesu (m.in. pH roztworu, stężenia poszczególnych leków czy dawki koagulantu), stopień usunięcia z wody badanych farmaceutyków nie przekroczył 24%. Jedynie dla diklofenaku stosowanego w stężeniu początkowym $30\text{--}40\text{ }\mu\text{g}/\text{dm}^3$ oraz koagulantu $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ uzyskano 30-procentową efektywność usunięcia (Lin i wsp., 2016; Bogdanowicz i Wąsowski, 2018).

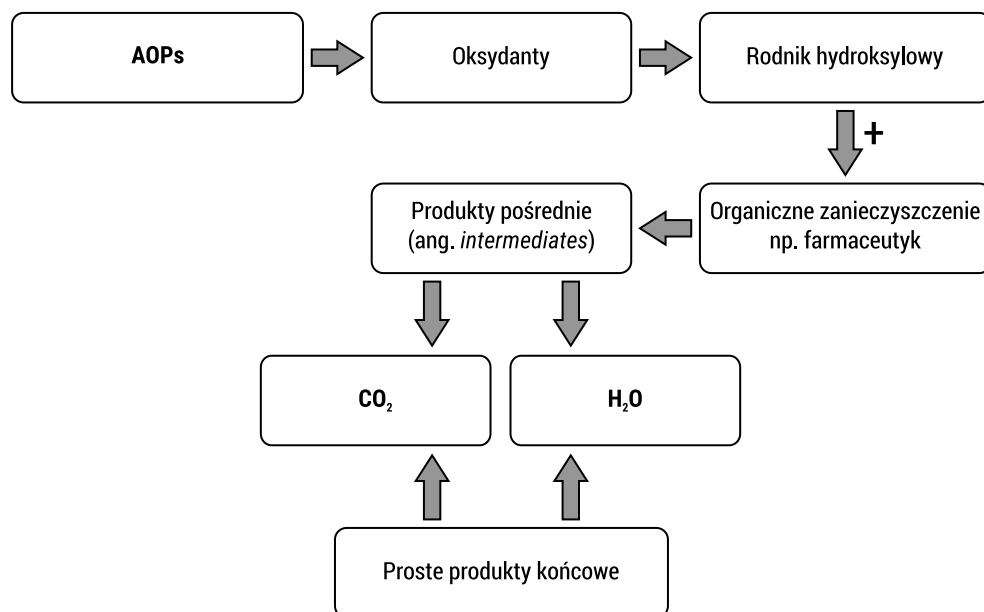
Proces ozonowania jest kolejną metodą eliminacji farmaceutyków. W metodzie utleniania ozonem wolne rodniki hydroksylowe ($\text{HO}\cdot$) powstają zgodnie z reakcją:



W procesie ozonowania w dawkach ozonu zawierających się w przedziałach $0,82\text{--}2,55\text{ mg O}_3/\text{mg DOC}$ (ang. *dissolved organic carbon*) usunięto ponad 99,9% farmaceutyków należących do różnych grup, jak antybiotyki, hormony sterydowe, regulatory gospodarki lipidowej, NSAIDs. Badania prowadzono w środowisku sztucznych ścieków, wodzie powierzchniowej oraz odpływach z oczyszczalni ścieków (Almomani i wsp., 2016). Podobne rezultaty całkowitego usunięcia leku osiągnięto z użyciem ozonowania w ciągu 8 minut dla propranololu oraz w ciągu 90 minut dla tetracykliny. Eksperyment prowadzono w środowisku wodnym. Całkowita degradacja poprzez ozonowanie sulfametoksazolu w wodzie ultraczystej wymagała dłuższego czasu oraz podwyższenia dawki ozonu do $4,5\text{ mg}/\text{dm}^3$ z powodu tworzenia reaktywnych produktów pośrednich. Badania prowadzone w zmiennym zakresie pH $3\text{--}10$ wykazały, że optymalne

warunki degradacji amoksycyliny były przy $\text{pH} = 10$. Eksperymenty te dowiodły, że do najważniejszych czynników wpływających na wydajność degradacji leków z użyciem ozonowania należą: pH , temperatura, dawka ozonu, rodzaj matrycy (woda, ścieki), obecność materii organicznej oraz jej oddziaływanie na proces usuwania farmaceutyków (Kanakaraju i wsp., 2018).

Alternatywą dla powszechnie stosowanych metod oczyszczania ścieków są zaawansowane procesy utleniania AOPs, które wykorzystuje się do rozkładu opornych na biodegradację związków organicznych, również pozostałości farmaceutycznych. W technologii AOPs czynnikiem utleniającym są wolne rodniki, a zwłaszcza charakteryzujące się bardzo wysokim potencjałem redoks (2,8 V) rodniki hydroksylowe ($\text{HO}\bullet$) [Kudlek i wsp., 2015]. Reagują one z wieloma związkami organicznymi, tworząc rodniki organiczne inicjujące dalsze łańcuchowe reakcje utleniania i degradacji. Do wytwarzania rodników stosuje się takie substancje chemiczne jak ozon i nadtlenek wodoru oraz czynniki fizyczne, jak promieniowanie UV, promieniowanie γ czy ultradźwięki. Efektem przebiegających procesów hydroksylacji lub dehydroksylacji jest mineralizacja do CO_2 oraz H_2O . Znacznym ograniczeniem w stosowaniu technologii AOPs jest powstawanie toksycznych produktów pośrednich. W wielu pracach wykazano, że produkty te charakteryzują się często wyższą trwałością i toksycznością niż leki macierzyste (Sharma i wsp., 2018; Matejczyk i wsp., 2020a). Na rycinie 1.8 przedstawiono mechanizm AOPs.



RYC. 1.8. Mechanizm AOPs

ŹRÓDŁO: opracowano na podstawie Sharma i wsp., 2018.

Do najczęściej stosowanych procesów zaawansowanego utleniania AOPs zaliczamy reakcję Fentona, fotokatalizę z wykorzystaniem katalizatorów pełniących funkcję półprzewodników oraz szereg metod elektrycznych i elektrochemicznych. Celem zwiększenia efektywności wytwarzania wolnych rodników wodorotlenowych, odgrywających rolę głównego utleniacza w procesach AOPs, stosuje się również procesy hybrydowe wykorzystujące ultradźwięki, ozonowanie i promieniowanie UV (Kudlek i wsp., 2015; Tałała, 2017; Kanakaraju i wsp., 2018). Na rycinie 1.9 przedstawiono główne procesy stosowane do degradacji farmaceutyków.



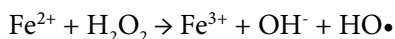
RYC. 1.9. Typy procesów stosowanych do degradacji farmaceutyków w ściekach

ŹRÓDŁO: Kanakaraju i wsp., 2018.

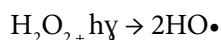
Procesy fotochemiczne polegają na wspomaganiu chemicznego utleniania promieniami UV. Fotoliza UV jest zależna od intensywności promieniowania, absorpcji UV przez farmaceutyki oraz wydajności kwantowej promieniowania. Dodanie H₂O₂ generuje powstawanie wolnych rodników i zwiększa wydajność procesu degradacji farmaceutyków (Kanakaraju i wsp., 2018). Promieniowanie UV zastosowano do eliminacji takich leków jak ketoprofen i diklofenak w środowisku ultraczystej wody i metanolu. Uzyskano znacznie powolniejsze tempo degradacji diklofenaku w porównaniu z ketoprofenem. Stwierdzono również wyższą toksyczność produktów transformacji ketoprofenu, porównując go do leku macierzystego (Li i wsp., 2017).

Promieniowania UV użyto także do degradacji sulfametoksazolu oraz ibuprofenu w roztworach wodnych przy różnych wartościach pH badanych układów. Zaobserwowano, że optymalne tempo degradacji sulfametoksazolu i ibuprofenu uzyskano dla dwóch różnych wartości pH – równego 3 dla sulfametoksazolu oraz 7,55 dla ibuprofenu. Stwierdzono, że proces UV/H₂O₂ jest bardzo efektywny w degradacji 12 antybiotyków w środowisku ścieków miejskich, skąd usunięto 90% tych leków. Z zastosowaniem procesu UV/H₂O₂ uzyskano całkowitą degradację diklofenaku w ciągu 2 minut w roztworze wodnym (Kanakaraju i wsp., 2018).

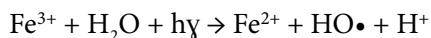
Podstawą reakcji Fentona jest powstawanie rodników hydroksylowych (HO•) pod wpływem odczynnika Fentona:



Z kolei w reakcji foto-Fentona wykorzystuje się promieniowanie UV celem inicjacji dodatkowych rodników HO•. Pod jego wpływem powstawanie rodników hydroksylowych zachodzi według reakcji:

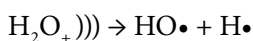


Jednocześnie następuje fotoredukcja jonów Fe^{3+} do Fe^{2+} z utworzeniem rodników HO•:



Zarówno reakcję Fentona, jak i foto-Fentona wykorzystano do degradacji antybiotyków, NSAIDs oraz wybranych leków antynowotworowych (Kanakaraju i wsp., 2018). Z użyciem reakcji Fentona w środowisku wody zdejonizowanej otrzymano całkowitą i szybką (w ciągu 5 minut) degradację amoksycyliny. Wysoki stopień usuwania 5-fluorouracylu, nawet do 40%, osiągnięto z zastosowaniem reakcji Solar foto-Fentona w środowisku wody zdejonizowanej (Koltsakidou i wsp., 2017). Reakcję foto-Fentona wykorzystano także do degradacji 15 farmaceutyków w kombinacji z innymi mikrozanieczyszczeniami w środowisku ścieków miejskich. W metodzie tej osiągnięto 83-procentową eliminację zanieczyszczeń. Degradację karbamazepiny, ibuprofenu oraz sulfametoksazolu w ciągu 45 minut w ponad 96% uzyskano w środowisku ścieków miejskich i z zastosowaniem reakcji Solar foto-Fentona (De la Cruz i wsp., 2013).

Do degradacji pozostałości farmaceutycznych wykorzystuje się również ultradźwięki. Proces ten oparty jest na generowaniu rodników HO• pod wpływem działania ultradźwięków.



gdzie: $\text{H}\bullet$ – ultradźwięki.

Głównymi czynnikami wpływającymi na degradację farmaceutyków z użyciem ultradźwięków są ich moc i częstotliwość. Proces ten zastosowano do usuwania ciprofloksacyny, diklofenaku, karbamazepiny, ibuprofenu i piroksikamu w środowisku ultraczystej wody oraz ścieków miejskich. Stosowano różną moc i częstotliwość ultradźwięków, uzyskując dobre efekty eliminacji poszczególnych farmaceutyków z badanych układów. Dodanie związków żelaza znacznie podwyższało wydajność degradacji diklofenaku i skracało jej czas do 60 minut (Naddeo i wsp., 2013). Również połączenie procesu sonolizy z fotolizą ($\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$) dało dobre efekty w procesie usuwania diklofenaku, paracetamolu, kwasu salicylowego oraz chloramfenikolu. Uzyskano 91-procentową eliminację farmaceutyków (Ghafoori i wsp., 2015).

W procesie elektrooksydacji wykorzystuje się elektryczność i zidentyfikowano tu dwa mechanizmy oksydacyjne prowadzące do degradacji farmaceutyków w badanym układzie. Pierwszy polega na bezpośredniej oksydacji na anodzie i oddziaływaniu

między powierzchnią anody a farmaceutykiem. Drugi mechanizm to *in-situ* generacja reaktywnych form tlenu przez utleniacze na powierzchni elektrody. W porównaniu ze stosowaniem konwencjonalnych anod, jak Pt, IrO₂ oraz PbO₂, znacznie lepsze rezultaty usuwania farmaceutyków uzyskuje się z użyciem anod diamentowych z domieszką boru BDD (ang. *Boron-Doped Diamond*) [Kanakaraju i wsp., 2018]. Elektrochemiczna oksydacja z anodą BDD znalazła zastosowanie w usuwaniu diklofenaku, sulfametoksazolu i 17 α -etynyloestradiolu ze ścieków szpitalnych oraz ścieków syntetycznych (Loos i wsp., 2018).

Badania ostatnich lat wykazały, że pH środowiska, dawka promieniowania oraz charakter matrycy decydują o efektywności promieniowania jonizującego w degradacji farmaceutyków. Porównując do technologii AOPs opartych na UV, promieniowanie gamma daje lepsze rezultaty w usuwaniu pozostałości farmaceutycznych z badanych układów. Wykazano, że doprowadziło ono do 100% degradacji karbamazepiny w ciągu 10 minut w środowisku wody destylowanej. Promieniowanie wiązki elektronów spowodowało 90-procentową degradację fluoksetyny w środowisku wodnym (Wang i Wang, 2018).

W licznych pracach zaobserwowano znaczny wzrost wydajności degradacji farmaceutyków z zastosowaniem mieszanych technologii AOPs. Wzmocnienie procesu ozonowania mieszaniny czterech farmaceutyków – atenololu, hydrochlorotiazidu, ofloksacyny i trimetoprimu – fotokatalizą solar TiO₂ znacznie podwyższyło ich degradację z 10 do 80% w porównaniu z samym ozonowaniem (Márquez i wsp., 2014). Połączenie ultradźwięków z reakcją Fentona doprowadziło do 95-procentowej eliminacji ibuprofenu w ciągu 60 minut w środowisku ścieków miejskich. Zastosowanie ultradźwięków z ozonowaniem znacznie podwyższyło proces degradacji diklofenaku, sulfametoksazolu oraz karbamazepiny w środowisku wodnym. Podobnie kombinacja sonolizy z fotolizą UV/H₂O₂ istotnie wzmocniła efektywność degradacji diklofenaku, paracetamolu, kwasu salicylowego oraz chloramfenikolu do 91% w środowisku sztucznych ścieków farmaceutycznych (Kanakaraju i wsp., 2018).

Badania ostatnich lat wykazały, że dużą nadzieję pokłada się w zaawansowanej technologii utleniania opartej na wytwarzaniu rodnika siarczanowego (SO₄[•]). W porównaniu z HO[•] rodniki te mają wysoki potencjał redoks wynoszący 2,5–3,1 V. Ponadto pod względem utleniania wielu zanieczyszczeń organicznych rodniki siarczanowe wykazują wyższą selektywność. Technologię tę m.in. zastosowano do degradacji diklofenaku (Lu i wsp., 2017).

1.6. Regulacje prawne w zakresie występowania pozostałości farmaceutycznych w środowisku

W ciągu ostatniej dekady obserwuje się lawinowy wzrost zainteresowania obecnością leków i możliwościami ich usuwania z matryc środowiskowych. Aktualny stan wiedzy uświadamia nam, że farmaceutyki występujące w wodach wywierają

negatywny wpływ na żyjące tam organizmy, a obecność leków w wodzie wodociągowej może mieć poważne skutki dla zdrowia ludzkiego. Woda przeznaczona do spożycia zanieczyszczona lekami jest niebezpieczna dla niemowląt, małych dzieci, osób starszych i osób z niewydolnością wątroby czy nerek (Nikolau i wsp., 2007; Szymonik i Lach, 2016).

Jeżeli chodzi o regulacje prawne w Polsce w zakresie substancji farmaceutycznych w środowisku, podstawowym aktem prawnym jest prawo farmaceutyczne uchwalone 6 września 2011 roku wraz z poprawkami z 2016 roku (Dz.U. z 2016 r., poz. 2142 z późn. zm.), które dostosowuje polskie prawo do norm Unii Europejskiej. Ważnym dokumentem dotyczącym oczyszczania ścieków komunalnych jest dyrektywa 91/271/EWG, której głównym celem jest ochrona środowiska przed niekorzystnymi skutkami zanieczyszczeń komunalnych i przemysłowych. Dyrektywa dotyczy ochrony i zrównoważonego użytkowania środowiska będącego przeciwdziałaniem skutkom działalności człowieka (<http://www.europarl.europa.eu>). Fundamentalnym dokumentem w zakresie zagospodarowania zasobów wodnych i ich ochrony jest opracowana w ramach Wspólnoty ramowa dyrektywa wodna 2000/60/WE, która włączyła 17 β -estradiol i 17 α -etynyloestradiol do listy substancji priorytetowych dla jakości wód powierzchniowych. Zaproponowano w niej dopuszczalne stężenia E2 wynoszące $4 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{dm}^3$, a stężenie EE2 nie może przekraczać $3,5 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{dm}^3$ dla rzek, jezior oraz silnie zmodyfikowanych lub sztucznych zbiorników wodnych. Takie działania mają na celu m.in. zapobieganie zanieczyszczeniom wód lub/i ich ograniczeniom. W kolejnej dyrektywie 2013/39/UE zmieniającej dyrektywę 2008/105/WE do dotychczasowej listy 33 substancji priorytetowych i 8 innych substancji zanieczyszczających dodano 15 nowych. W odpowiedzi na wprowadzenie dodatkowej listy Komisja Europejska utworzyła wykaz substancji monitorowanych we wszystkich państwach członkowskich, tzw. lista obserwacyjna (<http://www.europarl.europa.eu>). Wskazana w dyrektywie Parlamentu Europejskiego i Rady 2013/39/UE z 12 sierpnia 2013 roku lista obserwacyjna obejmuje substancje, których monitoring będzie prowadzony w całej Unii (<http://eurlex.europa.eu>). Oprócz innych związków chemicznych, takich jak związki wykorzystywane w przemyśle, substancje zawarte w środkach biobójczych, ochrony roślin, na liście tej znajdują się także substancje farmaceutyczne. Na pierwszej liście obserwacyjnej znalazł się diklofenak, nadal też podtrzymano konieczność monitorowania 17 β -estradiolu i 17 α -etynyloestradiolu w wodach powierzchniowych.

Na szczególną uwagę zasługują estrogeny wykrywane w wodzie przeznaczonej do spożycia, gdyż mogą być one przyczyną częstszego zapadania na nowotwory piersi czy jąder. W południowych Niemczech stężenie estriolu w wodzie pitnej wynosiło $0,3 \text{ ng}/\text{dm}^3$, a 17 β -estradiolu $2,1 \text{ ng}/\text{dm}^3$. W Hiszpanii stwierdzono obecność naturalnych estrogenów w wodzie pitnej w stężeniu $0,93\text{--}11,6 \text{ ng}/\text{dm}^3$ (Szymonik i Lach, 2016; Boroń i Pawlas, 2015).

W krajach UE wykorzystanie estrogenów w rolnictwie i akwakulturach jest regulowane dyrektywą 96/22/EC, która została zastąpiona kolejną dyrektywą 2003/74/EC, restrykcyjnie ograniczającą aplikację E2 w weterynarii. Brak natomiast regulacji prawnych dotyczących dopuszczalnych zawartości estrogenów steroidowych w wodzie pitnej.

Wprowadzenie na rynek nowych produktów aktywnych farmakologicznie (PACs – ang. *Pharmaceutically Active Compounds*) podlega regulacji dwiema głównymi dyrektywami – 2001/82/EC i 2001/83/EC. Według nich wymagane jest oszacowanie ryzyka oddziaływania środowiskowego dla każdego wprowadzonego na rynek produktu aktywnego farmakologicznie.

11 marca 2019 roku pojawił się komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady i Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego dotyczący strategicznego podejścia Unii Europejskiej do substancji farmaceutycznych w środowisku. W dokumencie tym wyraźnie podkreślono, że kilka państw członkowskich (np. Holandia, Szwecja), Parlament Europejski, państwa trzecie (np. Szwajcaria), organizacje międzynarodowe (np. ONZ, HELCOM, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju), stowarzyszenia branżowe i organizacje pozarządowe wyraziły obawy dotyczące rosnącego poziomu farmaceutyków w środowisku i podjęły działania w celu zaradzenia temu problemowi. Międzynarodowe zobowiązania zawarto w Agendzie 2030 Organizacji Narodów Zjednoczonych, w szczególności w ramach celu zrównoważonego rozwoju nr 6, oraz w deklaracji ministerialnej Zgromadzenia ONZ ds. Ochrony Środowiska z 2017 roku, a działania w zakresie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe zostały uzgodnione przez grupę G-7/G-20 i Światową Organizację Zdrowia. Komunikat ten podkreśla, że obecnie wody powierzchniowe i podziemne są monitorowane pod kątem obecności wybranych substancji na podstawie ramowej dyrektywy wodnej 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z 23 października 2000 roku ustanawiającej ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej (Dz.Urz. L 327 z 22 grudnia 2000, s. 1). Innym ważnym dokumentem jest decyzja wykonawcza Komisji (UE) 2018/840 z 5 czerwca 2018 roku ustanawiająca listę obserwacyjną substancji do celów monitorowania obejmującego całą Unię w zakresie polityki wodnej na podstawie dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE i uchylająca decyzję wykonawczą Komisji (UE) 2015/495 (Dz.Urz. L 141 z 7 czerwca 2018, s. 9).

2. Cel i zakres pracy

W kontekście przedstawionych w przeglądzie literatury informacji za najważniejsze cele badań uznano:

1. Określenie i porównanie toksyczności, cytotoksyczności i genotoksyczności substancji czynnych wybranych leków antydepresyjnych – SER, FLU i CIT, ich metabolitów – Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT, ich mieszanin oraz mieszanin z substancjami czynnymi leków antynowotworowych, CIS i 5-FU, w medium hodowlanym, ściekach surowych oraz ściekach oczyszczonych.
2. Ocenę wpływu ścieków surowych i oczyszczonych na toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność wyżej wymienionych substancji czynnych leków antydepresyjnych, antynowotworowych, metabolitów oraz ich mieszanin.

W związku z wyżej wymienionymi celami hipotezy badawcze są następujące:

1. Toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność mieszanin wieloskładnikowych substancji czynnych, występujących w wyżej wymienionych lekach antydepresyjnych i antynowotworowych oraz ich metabolitach, jest wyższa w porównaniu z sumaryczną toksycznością, cytotoksycznością i genotoksycznością składników tej mieszaniny, niezależnie od badanego środowiska (ścieki surowe, oczyszczone lub medium hodowlane).
2. Zarówno ścieki surowe, jak i oczyszczone zwiększają toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność powyższych substancji czynnych leków antydepresyjnych, antynowotworowych, ich metabolitów oraz ich mieszanin.

Przyjęty zakres pracy obejmował **określenie toksyczności, cytotoksyczności i genotoksyczności** substancji czynnych leków antydepresyjnych – SER, FLU i CIT, ich metabolitów – Nor-SER, Nor-FLU, D-CIT, ich mieszanin oraz mieszanin z substancjami czynnymi leków antynowotworowych, CIS i 5-FU, w medium hodowlanym, ściekach surowych oraz ściekach oczyszczonych.

Toksyczność i cytotoksyczność określono na podstawie:

- inhibicji żywotności hodowli *E. coli* K-12 po ekspozycji na badane substancje czynne leków, metabolity oraz mieszaniny,
- inhibicji fluorescencji białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP po ekspozycji na badane substancje czynne leków, metabolity i mieszaniny.

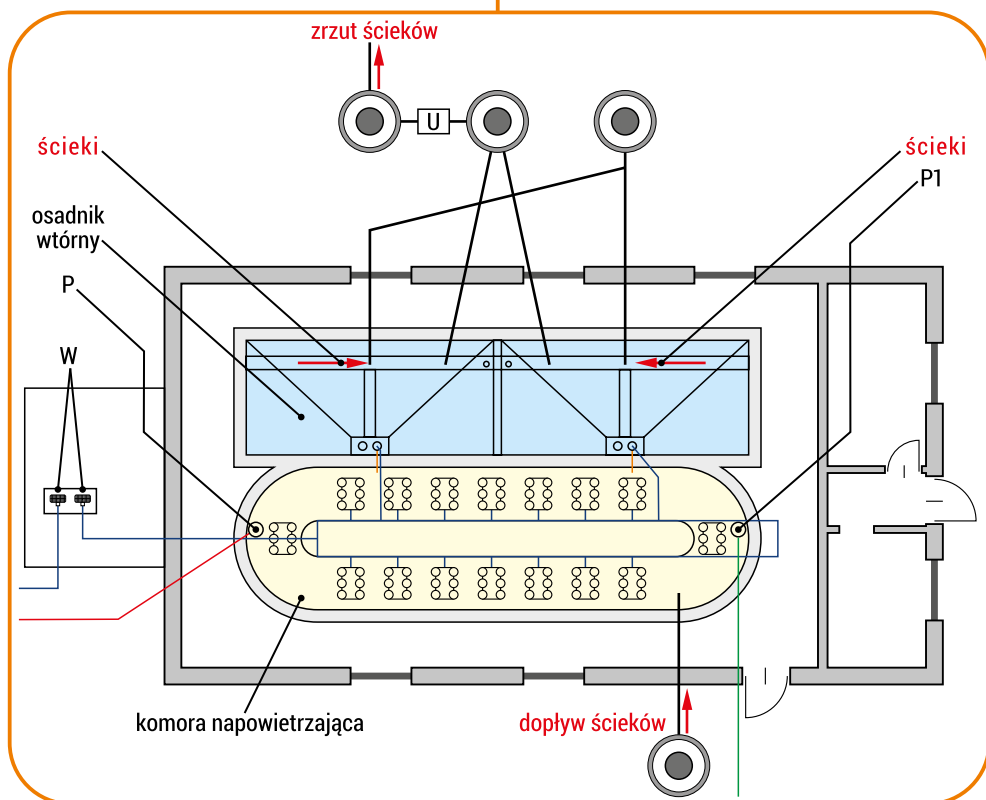
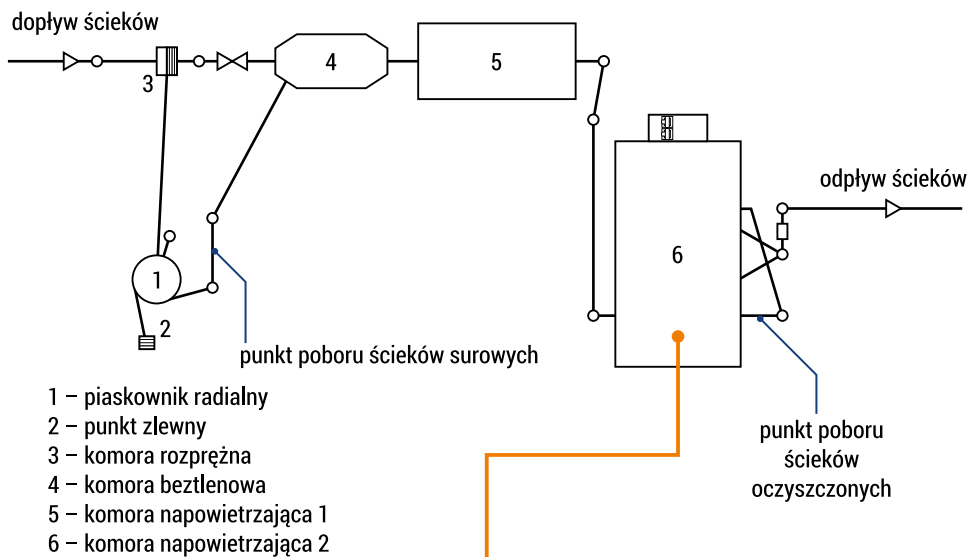
Genotoksyczność określono na podstawie indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* po ekspozycji na badane substancje czynne leków, metabolity i mieszaniny.

3. Materiały i metodyka badań

Toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność substancji czynnych leków antydepresyjnych SER, FLU oraz CIT, ich metabolitów – Nor-SER, Nor-FLU, D-CIT oraz ich mieszanin i mieszanin z substancjami czynnymi leków antynowotworowych, CIS i 5-FU, badano w środowisku medium hodowlanego, ścieków surowych i ścieków oczyszczonych. Badania prowadzono w latach 2019–2020 z wykorzystaniem rzeczywistych ścieków surowych oraz ścieków oczyszczonych pobranych z oczyszczalni ścieków w Stawiskach, porównując je do medium hodowlanego na podstawie określenia żywotności hodowli *E. coli* K-12, inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 oraz indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*.

3.1. Próbkę do badań

Do badań wykorzystano ścieki pochodzące z oczyszczalni ścieków w Stawiskach. Jej schemat z zaznaczonymi miejscami poboru próbek przedstawiono na rycinie 3.1. Do tej oczyszczalni trafiają ścieki bytowe dowożone taborem asenizacyjnym i ścieki komunalne z obszaru miasta. Dopływające ścieki są transportowane systemem rurociągów do komór krat. Następnie kierowane są na piaskownik radialny, gdzie usuwa się z nich części ciężkie i piasek. Z piaskownika radialnego ścieki przepływają do komory beztlenowej. Jej zadaniem jest selekcja metaboliczna dla bakterii nitkowatych oraz wstępna faza usuwania fosforu na drodze biologicznej. Dalej ścieki transportowane są do komory tlenowej 1, w której następuje proces napowietrzania za pośrednictwem systemu napowietrzania drobnopęcherzykowego. Ta komora ma za zadanie odebrać większe ładunki związków węgla trafiające do oczyszczalni wraz ze ściekami dowożonymi. Z komory napowietrzającej 1 ścieki trafiają do komory napowietrzającej 2, która również wyposażona jest w system napowietrzania drobnopęcherzykowego. W obu tych komorach utrzymywane są warunki naprzemiennej denitryfikacji i nityfikacji, które uzyskuje się za pomocą sterowania stężeniem tlenu rozpuszczonego w przedziale od 0,5 do 2,0 mg/dm³. Po procesie napowietrzania ścieki przepływają do osadników wtórnych, z których odprowadzane są jako ścieki oczyszczone do odbiornika. Próbkę ścieków surowych pobrano po procesach mechanicznego oczyszczania, w miejscu doprowadzenia ścieków do komory beztlenowej, w celu wyeliminowania z próbki ciał stałych, które mogłyby być odpowiedzialne



RYC. 3.1. Schemat miejskiej oczyszczalni ścieków w Stawiskach z zaznaczonymi miejscami poboru próbek

ŹRÓDŁO: opracowanie własne.

za procesy sorpcji i desorpcji zanieczyszczeń w ściekach. Dzięki temu uzyskano mniejszą zmienność parametrów ścieków surowych w trakcie transportu próbki do laboratorium. Z kolei próbkę ścieków oczyszczonych pobrano za miejscem ich odpływu z osadników wtórnych, dzięki czemu pobrano ścieki w takiej postaci, w jakiej trafiają one do środowiska.

W tabeli 3.1 przedstawiono wybrane wskaźniki zanieczyszczeń w ściekach surowych i oczyszczonych użytych w badaniach w latach 2019–2020.

TABELA 3.1. Wybrane wskaźniki zanieczyszczeń w ściekach surowych i oczyszczonych

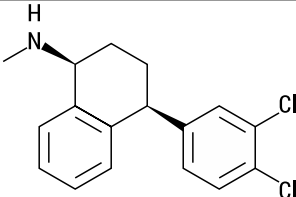
Wskaźnik zanieczyszczeń [mg/dm ³]	Ścieki surowe	Ścieki oczyszczone
BZT ₅	od 300 do 600	od 5 do 10
ChZT _{Cr}	od 650 do 900	od 27,5 do 75
Zawiesiny ogólne	od 250 do 530	od 5 do 10

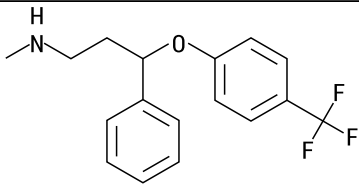
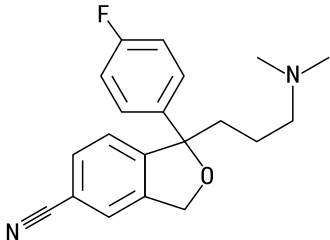
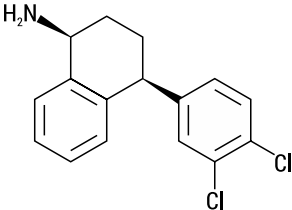
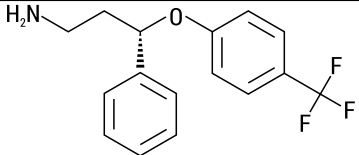
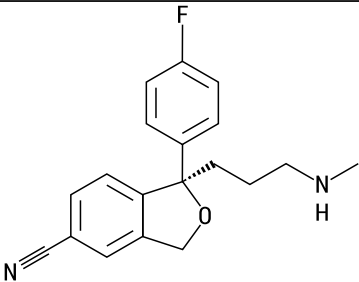
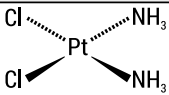
ŹRÓDŁO: badania własne.

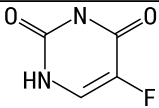
Pobrane próbki transportowane były do laboratorium, gdzie podzielono je na mniejsze objętości i przechowywano w temperaturze –20°C, tak aby zminimalizować zachodzenie w nich procesów chemicznych i biologicznych. Ścieki surowe i oczyszczone dwukrotnie przefiltrowano przez bibułę filtracyjną, następnie poddano je autoklawowaniu przez 20 minut w temperaturze 121°C.

W badaniach zastosowano substancje czynne leków antydepresyjnych –SER, FLU i CIT, ich metabolity – Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT oraz substancje czynne leków antynowotworowych, CIS i 5-FU – wszystkie zakupiono w Sigma-Aldrich. Wykorzystane w badaniach substancje czynne leków i metabolitów przedstawiono w tabeli 3.2. Z kolei w tabeli 3.3 zaprezentowano skład analizowanych próbek oraz stężenie badanych związków podane w mg/dm³. Próbkę o takim samym składzie badano w trzech różnych środowiskach: medium hodowlanym, ściekach surowych oraz ściekach oczyszczonych.

TABELA 3.2. Substancje czynne leków i metabolitów wykorzystane w badaniach

Substancja czynna, wzór sumaryczny	Wzór strukturalny	Nazwa chemiczna
Inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny		
Sertralina (SER) C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N		chlorowodorek sertraliny CAS 79559-97-0

Substancja czynna, wzór sumaryczny	Wzór strukturalny	Nazwa chemiczna
Fluoksetyna (FLU) $C_{17}H_{18}F_3NO$		chlorowodorek fluoksetyny CAS 56296-78-7
Citalopram (CIT) $C_{20}H_{21}FN_2O$		bromowodorek citalopramu CAS 59729-32-7
Metabolity Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT		
Norsertralina (Nor-SER) $C_{16}H_{15}Cl_2N$		chlorowodorek norsertraliny CAS 91797-57-8
Norfluoksetyna (Nor-FLU) $C_{16}H_{16}F_3NO$		szczawian norfluoksetyny CAS 107674-50-0
Desmetyl- citalopram (D-CIT) $C_{19}H_{19}FN_2O$		chlorowodorek desmetylcitalopramu CAS 144025
Leki antynowotworowe		
Cisplatyna (CIS) $PtCl_2(NH_3)_2$		cisplatyna CAS 15663-271

Substancja czynna, wzór sumaryczny	Wzór strukturalny	Nazwa chemiczna
5-fluorouracyl (5-FU) $C_4H_3FN_2O_2$		5-fluorouracyl CAS 51-21-8

ŹRÓDŁO: opracowanie własne.

TABELA 3.3. Skład analizowanych prób oraz stężenie badanych związków podane w mg/dm³

Lp.	SER	FLU	CIT
1.	SER (0,01; 0,1; 1)	FLU (0,01; 0,1; 1)	CIT (0,01; 0,1; 1)
2.	Nor-SER (0,01; 0,1; 1)	Nor-FLU (0,01; 0,1; 1)	D-CIT (0,01; 0,1; 1)
3.	SER (0,01; 0,1; 1) + Nor-SER (0,1)	FLU (0,01; 0,1; 1) + Nor-FLU (0,1)	CIT (0,01; 0,1; 1) + D-CIT (0,1)
4.	CIS (0,1)		
5.	5-FU (0,1)		
6.	SER (0,01; 0,1; 1) + CIS (0,1)	FLU (0,01; 0,1; 1) + CIS (0,1)	CIT (0,01; 0,1; 1) + CIS (0,1)
7.	SER (0,01; 0,1; 1) + 5-FU (0,1)	FLU (0,01; 0,1; 1) + 5-FU (0,1)	CIT (0,01; 0,1; 1) + 5-FU (0,1)
8.	Nor-SER (0,1) + CIS (0,1)	Nor-FLU (0,1) + CIS (0,1)	D-CIT (0,1) + CIS (0,1)
9.	Nor-SER (0,1) + 5-FU (0,1)	Nor-FLU (0,1) + 5-FU (0,1)	D-CIT (0,1) + 5-FU (0,1)
10.	SER (0,01; 0,1; 1) + Nor-SER (0,1) + CIS (0,1)	FLU (0,01; 0,1; 1) + Nor-FLU (0,1) + CIS (0,1)	CIT (0,01; 0,1; 1) + D-CIT (0,1) + CIS (0,1)
11.	SER (0,01; 0,1; 1) + Nor-SER (0,1) + 5-FU (0,1)	FLU (0,01; 0,1; 1) + Nor-FLU (0,1) + 5-FU (0,1)	CIT (0,01; 0,1; 1) + D-CIT (0,1) + 5-FU (0,1)

ŹRÓDŁO: opracowanie własne.

Analizy toksyczności, cytotoksyczności oraz genotoksyczności wykonano z zastosowaniem czytnika płytek GloMax®-Multi Detection System firmy Promega. Wszystkie z badanych leków i ich metabolitów oraz mieszanin rozpuszczano w dimetylosulfotlenku (DMSO; Chempur). Celem zminimalizowania jego oddziaływania na *E. coli* przygotowane roztwory badanych związków chemicznych w DMSO mieszano ze stosowanymi w analizach mediami hodowlanymi lub ściekami surowymi i oczyszczonymi w proporcjach 1 : 9.

Do badań wybrano trzy szczepy *E. coli* pochodzące z kolekcji prof. Shimshona Belkina z Uniwersytetu Hebrajskiego z Jerozolimy oraz z laboratorium prof. Imricha Baráka ze Słowackiej Akademii Nauk w Bratysławie: *E. coli* K-12, *E. coli* MM294-GFP oraz *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. Toksyczność i cytotoksyczność oznaczono odpowiednio na podstawie inhibicji żywotności *E. coli* K-12 i inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP. Genotoksyczność oznaczono na podstawie parametru indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. W tabeli 3.4 przedstawiono wykorzystane w badaniach szczepy *E. coli*, analizowane parametry oraz stosowane metody.

TABELA 3.4. Modelowe szczepy *E. coli* wykorzystane w badaniach oraz stosowane metody

Badany parametr	Mikroorganizm modelowy	Metoda badań
Inhibicja żywotności <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> K-12	luminometria, spektrofotometria UV
Inhibicja fluorescencji białka GFP	<i>E. coli</i> MM294-GFP	fluorymetria, spektrofotometria UV
Indukcja promotora <i>recA</i>	<i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i>	luminometria, spektrofotometria UV

ŹRÓDŁO: opracowanie własne.

3.2. Metodyka badań

3.2.1. Toksyczność substancji czynnych leków antydepresyjnych, antynowotworowych, metabolitów i ich mieszanin

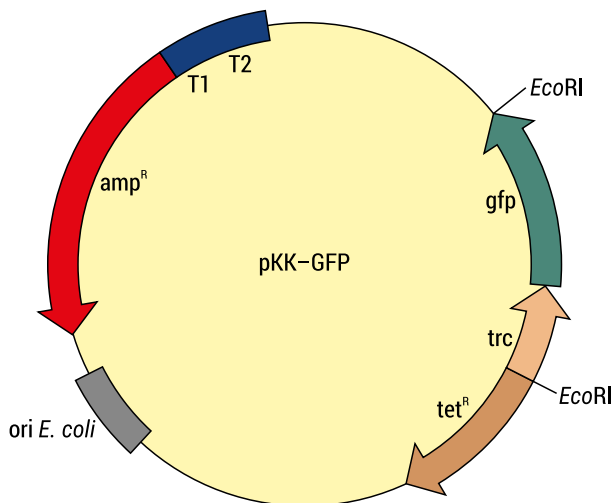
Żywotność hodowli *E. coli* K-12 po inkubacji z wymienionymi wyżej badanymi lekami, metabolitami i mieszaninami leków i metabolitów określono z użyciem testu żywotności bakterii BacTiter-Glo™ (Promega). Zgodnie z tą metodą określenie liczby żywych komórek drobnoustrojów opiera się na oznaczeniu ilościowym obecnego ATP. Skład odczynnika wspomaga lizę komórek bakteryjnych i generowanie sygnału luminescencyjnego. Stabilny sygnał luminescencyjny jest proporcjonalny do ilości obecnego

ATP, który jest wprost proporcjonalny do liczby żywych komórek w hodowli. Szczep *E. coli* K-12 hodowano w bulionie Müeller Hinton II (MH II), w ściekach surowych oraz ściekach oczyszczonych w 37°C przez 24 godziny. Następnie hodowle *E. coli* rozcieńczano w świeżym bulionie MH II, ściekach surowych i ściekach oczyszczonych i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem (150 rpm). Liczbę bakterii określono metodą płytkową przez zliczenie jednostek tworzących kolonię (JTK), na płytkach z agarem Luria-Bertani. Liczebność bakterii w hodowlach w bulionie MH II, ściekach surowych i ściekach oczyszczonych doprowadzano do 10^7 JTK/ml na podstawie wyników z metody płytkowej po 24 godzinach oraz pomiarów gęstości optycznej (OD) hodowli bakterii przy długości fali 600 nm.

Następnie do tak przygotowanych hodowli *E. coli* dodawano w odpowiednim stężeniu badane substancje czynne leków, metabolity i mieszaniny i inkubowano przez 24 godziny. Próbką kontrolna zawierała testową hodowlę bakterii zawieszoną w MH, ŚS i ŚO oraz rozpuszczalnik (DMSO wymieszany w odpowiednich proporcjach z MH, ŚS i ŚO), w którym przygotowano roztwory substancji czynnych leków i metabolitów, nie zawierała zaś badanych substancji czynnych leków i metabolitów. Test przeprowadzono zgodnie z dołączonym protokołem firmy Promega. We wszystkich testach wartości luminescencji normalizowano do stężenia bakterii mierzonego spektrofotometrycznie, jako wartość OD przy 600 nm. Z aparatu dla każdej badanej próbki jednocześnie odczytywano dwa parametry, wartość luminescencji (L_A) oraz wartość gęstości optycznej (OD). Wartości luminescencji końcowej (L) dla każdej próbki wyliczono według wzoru: $L = L_A / OD_{600}$. Dla próbki kontrolnej wartość L przyjęto jako 100% i na potrzeby dalszych wyliczeń określono jako żywotność próbki kontrolnej (ŻPK). Z kolei żywotność próbki badanej (ŻPB, %) wyliczono na podstawie wartości L dla próbek badanych i z proporcji względem kontroli (100%). Wyniki przedstawiono jako wartości inhibicji żywotności (IŻ), którą w hodowli *E. coli* K-12 po 24 godzinach inkubacji z badanymi substancjami czynnymi leków, metabolitami i ich mieszaninami obliczono według wzoru: $I\check{Z} (\%) = \check{Z}PK (\%) - \check{Z}PB (\%)$.

3.2.2. Cytotoksyczność substancji czynnych leków antydepresyjnych, antynowotworowych, metabolitów i ich mieszanin

Kolejnym analizowanym parametrem w ocenie toksyczności wymienionych wyżej substancji czynnych leków antydepresyjnych, ich metabolitów oraz mieszanin z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU było określenie inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294. Szczep ten zawiera plazmidowy konstrukt genowy pKK233-2 (GenBank, nr X70478), w którym gen *gfp* (ang. *green fluorescent protein*) jest pod kontrolą silnego *trc* promotora. Markerem selekcyjnym znajdującym się na plazmidzie jest gen oporności na ampicylinę (*amp^R*). Mapę genetyczną plazmidu przedstawiono na rycinie 3.2.



RYC. 3.2. Mapa genetyczna plazmidu pKK-GFP z genem reporterowym *gfp* znajdującym się pod kontrolą *trc* promotora

ŹRÓDŁO: Lukáčová i wsp., 1999.

Produktem ekspresji genu *gfp* jest białko GFP, które emituje fluorescencję w świetle UV. Zgodnie z tą metodą określenie efektu cytotoksycznego opiera się na oznaczeniu ilościowym intensywności fluorescencji hodowli *E. coli* MM294-GFP zawierającej plazmidowy konstrukt genowy z genem *gfp* po jej 24-godzinnej inkubacji z badanymi substancjami czynnymi leków, metabolitami i ich mieszaninami. Inhibicja sygnału fluorescencyjnego jest proporcjonalna do efektu cytotoksycznego badanych związków chemicznych i ich mieszanin. Efekt ten w powyższej hodowli badano z zastosowaniem metody spektrofлуorymetrycznej opartej na pomiarze intensywności emitowanej fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294.

Zawiesinę *E. coli* MM294 inkubowano w bulionie Luria-Bertani (LB), w ściekach surowych i ściekach oczyszczonych z ampicyną w stężeniu 100 mg/dm³ w 37°C przez 24 godziny. Następnie hodowlę bakterii rozcieńczano w bulionie LB, ściekach surowych i ściekach oczyszczonych z ampicyną (100 mg/dm³) i inkubowano w 37°C z wytrząsaniem (150 rpm). Hodowlę szczepu *E. coli* MM294 doprowadzano do gęstości 10⁷ JTK/ml w bulionie LB, ściekach surowych i ściekach oczyszczonych, zgodnie z metodą opisaną powyżej, dotyczącą pomiaru toksyczności. Próbkę inkubowano w 37°C przez 24 godziny. Próbkę kontrolną zawierała testową hodowlę bakterii zawieszoną w MH, ŚS i ŚO, rozpuszczalnik (DMSO wymieszany w odpowiednich proporcjach z MH, ŚS oraz ŚO), w którym przygotowano roztwory substancji czynnych leków i metabolity, oraz ampicynę (100 mg/dm³). Próbkę ta nie zawierała natomiast badanych substancji czynnych leków i metabolitów.

Intensywność fluorescencji białka GFP w hodowlach *E. coli* MM294 inkubowanych z substancjami czynnymi leków, metabolitami i mieszaninami oraz w hodowli kontrolnej mierzono przy długości fali wzbudzenia 405 nm i długości fali emisji

505 nm. Celem standaryzacji fluorescencyjnej odpowiedzi hodowli *E. coli* MM294-GFP dla wszystkich badanych próbek i próbki kontrolnej spektrofotometrycznie określano OD przy długości fali 600 nm. Wartości fluorescencji dla każdej próby wyliczano według wzoru: $F = F_A / OD_{600}$, gdzie: F – fluorescencja, F_A – intensywność fluorescencji odczytana z aparatu, OD_{600} – gęstość optyczna próbki mierzona spektrofotometrycznie przy 600 nm. Dla próbki kontrolnej wartość F przyjęto jako 100% i na potrzeby dalszych wyliczeń określono jako fluorescencja próbki kontrolnej (FPK). Z kolei fluorescencję próbki badanej (FPB, w %) wyliczono na podstawie wartości F dla próbek badanych i z proporcji względem kontroli (100%). Wyniki przedstawiono jako wartości inhibicji fluorescencji (IF), którą po 24 godzinach inkubacji *E. coli* MM294 z badanymi związkami chemicznymi i ich mieszaninami obliczono według wzoru: $IF (\%) = FPK (\%) - FPB (\%)$. Ze względu na wykrytą autofluorescencję CIS wynoszącą 3,75% w przeprowadzonych wyliczeniach wartości fluorescencji GFP wszystkich próbek zawierających CIS pomniejszono o 3,75%. Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych seriach.

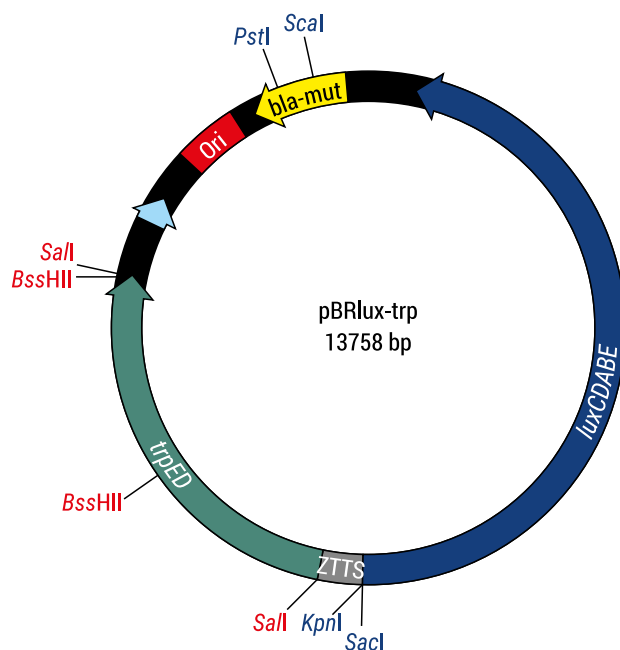
3.2.3. Genotoksyczność substancji czynnych leków antydepresyjnych, antynowotworowych, metabolitów i ich mieszanin

W badaniach zastosowano bakteryjny biosensor *E. coli* SM342/pBRLux-trp:*recA:luxCDABE* z konstruktem genowym i fuzją promotora *recA* z genem reporterym *luxCDABE* w plazmidowym wektorze pBRLux-trp. Mapę genetyczną plazmidu pBRLux-trp przedstawiono na rycinie 3.3.

Promotor *recA* należy do grupy indukowanych uszkodzeniami DNA promotorów genów biorących udział w systemie naprawy SOS. Zgodnie z tą metodą określenie efektu genotoksycznego opiera się na oznaczeniu ilościowym intensywności luminescencji hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* inkubowanej przez trzy godziny z badanymi substancjami czynnymi leków, metabolitów i ich mieszaninami w porównaniu z hodowlą kontrolną nietraktowaną związkami chemicznymi. Sygnał luminescencyjny jest proporcjonalny do poziomu indukcji promotora *recA* i siły genotoksycznej badanych substancji czynnych leków, metabolitów i ich mieszanin.

Szczep *E. coli* SM342/pBRLux-trp:*recA:luxCDABE* hodowano przez 24 godziny w bulionie LB w 37°C. Pomiar luminescencji i analizę danych przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Melamed i wsp. (2012) oraz Kessler i wsp. (2012). Po 24-godzinnej inkubacji hodowlę rozcieńczono w świeżym bulionie LB, w ściekach surowych i ściekach oczyszczonych oraz inkubowano w 37°C z wytrząsaniem (150 rpm). Hodowlę doprowadzano do gęstości 10^7 JTK/ml według metody opisanej powyżej i dotyczącej analizy toksyczności i cytotoksyczności. Liczbę bakterii określono metodą płytkową przez zliczenie jednostek tworzących kolonie JTK, na płytkach z agarem Luria-Bertani. Następnie do prowadzonych w bulionie LB, w ściekach surowych i oczyszczonych hodowli *E. coli* SM342/pBRLux-trp:*recA:luxCDABE* dodawano

badane substancje czynne leków, metabolity i ich mieszaniny i inkubowano trzy godziny w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (150 rpm). Potem dla każdej badanej próbki i kontroli wykonywano pomiar luminescencji.



RYC. 3.3. Mapa genetyczna plazmidu pBRlux-trp z genem reporterowym *luxCDABE*

ŹRÓDŁO: Melamed i wsp., 2012.

Celem standaryzacji luminescencyjnej odpowiedzi hodowli *E. coli* SM342/pBRlux-trp:*recA:lucCDABE* dla wszystkich badanych próbek i próbki kontrolnej spektrofotometrycznie określono OD przy długości fali 600 nm. W każdym eksperymencie równolegle prowadzono kontrolę ujemną, wolną od związków chemicznych wodę Mili-Q, która stanowiła próbkę ślepą. Uzyskane zaś wyniki odnoszono do próbki kontrolnej. W jej skład wchodziły hodowla *E. coli* SM342/pBRlux-trp:*recA:lucCDABE* zawieszona w MH, ŚS i ŚO oraz rozpuszczalnik (DMSO wymieszany w odpowiednich proporcjach z MH, ŚS i ŚO), w którym przygotowano roztwory substancji czynnych leków i metabolitów. Próbką kontrolna nie zawierała badanych substancji czynnych leków i metabolitów. Intensywność luminescencji dla każdej próbki wyliczono według wzoru: $L = IL_A / OD_{600}$, gdzie: L – luminescencja, IL_A – intensywność luminescencji odczytana z aparatu, OD_{600} – gęstość optyczna próbki mierzona spektrofotometrycznie przy 600 nm. Wartości indukcji promotora *recA* po trzech godzinach inkubacji hodowli *E. coli* SM342/pBRlux-trp:*recA:lucCDABE* z badanymi substancjami czynnymi leków, metabolitami i ich mieszaninami przedstawiono jako procent wzrostu luminescencji w porównaniu z próbką kontrolną. Eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

3.2.4. Ocena statystyczna wyników badań

Weryfikacja prac badawczych poświęconych analizie aktywności mikroorganizmów jest zadaniem złożonym i przysparzającym trudności w jednoznacznej ocenie uzyskanych rezultatów. Stąd też, aby precyzyjnie wskazać i opisać zjawiska, w pracach tych wykorzystywana jest statystyczna weryfikacja różnic występujących pomiędzy poszczególnymi zmiennymi. Do jednej z takich metod zaliczana jest analiza wariancji, której celem jest wskazanie najmniejszych istotnych różnic między poszczególnymi zmiennymi w bazie danych, przy uwzględnieniu tak zwanych czynników jakościowych. Najczęściej wykorzystuje się do tego test Najmniejszych Istotnych Różnic (NIR) Tukeya. Ze względu na swoją uniwersalność oraz jakość uzyskiwanych wyników jest on często używany do weryfikacji wyników badań laboratoryjnych prowadzonych w kontrolowanych warunkach. Należy w tym miejscu podkreślić, że przeprowadzenie tego testu związane jest ze spełnieniem warunków kryterialnych zbioru danych. Pierwszym z nich jest normalność rozkładu poszczególnych zmiennych ujętych w analizie, drugim natomiast jednorodność wariancji. Zgodnie z testem Shapiro–Wilka wszystkie zmienne ujęte w analizie charakteryzowały się rozkładem normalnym, z kolei jednorodność wariancji oceniono na podstawie testu Bartletta. Wszystkie zmienne, jakie uwzględniono w tej analizie, charakteryzowały się jednorodnością wariancji. Wyniki szczegółowe powyższych testów zestawiono w załączniku B w tabelach 1–29.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem testu Tukeya. Jego głównym celem było wykazanie istotnych statystycznie różnic w wartościach inhibicji żywotności *E. coli*, inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP oraz indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* pomiędzy roztworami pojedynczych substancji czynnych SER, FLU, CIT, CIS, 5-FU, Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT a ich odpowiednimi mieszaninami wieloskładnikowymi w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO). Za poziom istotności statystycznej w dalszej weryfikacji wyników przyjęto $\alpha = 0,05$. Analizę przeprowadzono dla wartości inhibicji żywotności hodowli *E. coli*, inhibicji fluorescencji białka GFP oraz indukcji promotora *recA* uzyskanych w opisywanych w monografii eksperymentach, jak również dla hipotetycznych mieszanin otrzymanych po zsumowaniu wartości wymienionych parametrów dla poszczególnych pojedynczych składników mieszanin.

Drugim elementem badań statystycznych było wskazanie podobieństw w mechanizmie działania poszczególnych mieszanin na inhibicję żywotności *E. coli* K-12, inhibicję fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 oraz indukcję promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. Do tego celu wykorzystano analizę skupień prowadzoną przy aglomeracji Warda. Metoda ta określana jest jako metoda redukcji zmiennych na skutek grupowania ich w pojedyncze skupienia. Dzięki temu możliwe jest uzyskanie ogólniejszych informacji, pozwalających na wnioskowanie w kierunku ogólnej prawidłowości obserwowanej w zbiorze danych. Kluczowym warunkiem poprawnego przeprowadzenia tego typu analizy jest jednorodność jednostek, w jakich wyrażone są poszczególne zmienne. Dodatkowo przyjęto, że ilość skupień określono na podstawie ilości odnóg dendrogramu w 2/3 odległości wiązania.

Analiza skupień z metodą aglomeracji Warda przeprowadzona dla uzyskanych wyników badań laboratoryjnych pozwoliła na wyodrębnienie podobieństw w działaniu wybranych mieszanin SER, FLU, CIT i ich konfiguracji (składu mieszanin) na inhibicję żywotności *E. coli* K-12, inhibicję fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 oraz indukcję promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* w poszczególnych środowiskach prowadzonych badań (MH, ŚS oraz ŚO).

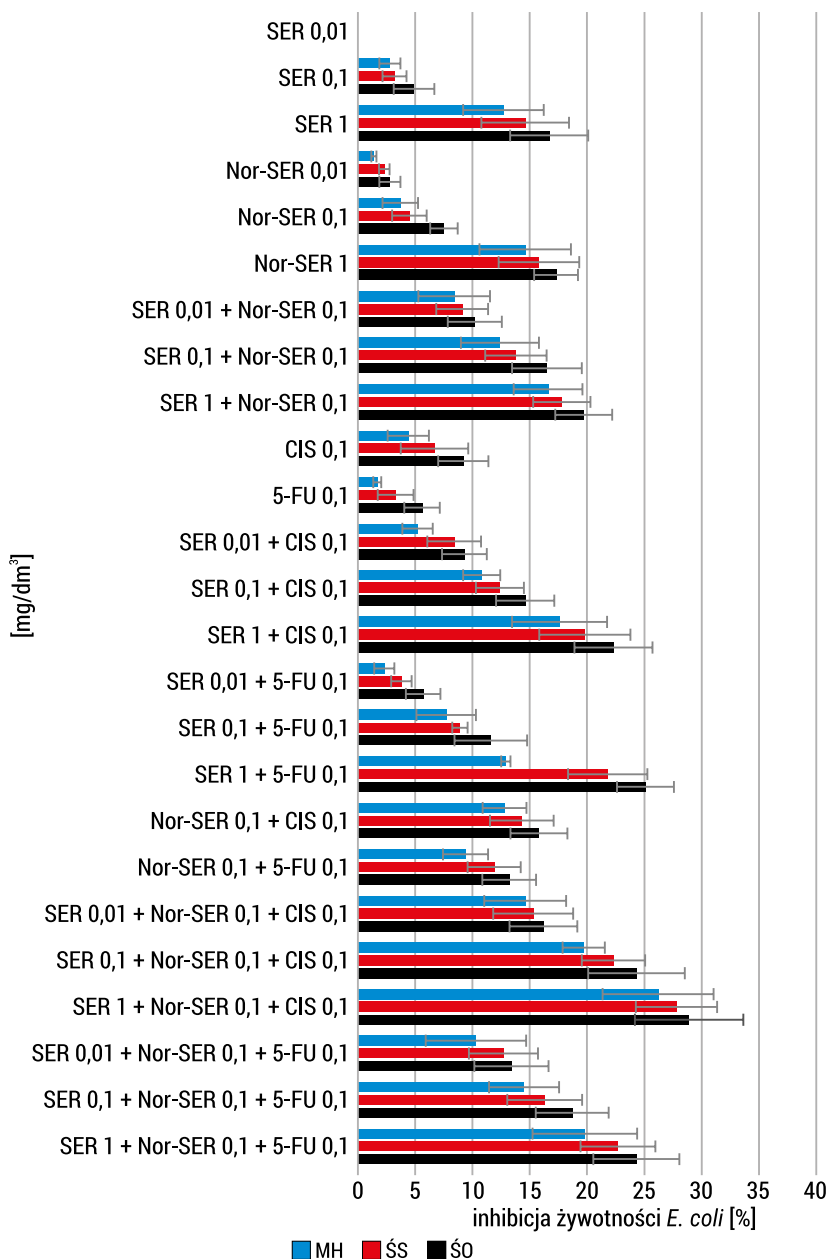
Dendrogramy obrazujące podobieństwo działania badanych w pracy substancji czynnych leków antydepresyjnych – SER, FLU, CIT, ich metabolitów – Nor-SER, Nor-FLU, D-CIT, ich mieszanin oraz mieszanin z lekami antynowotworowymi, CIS i 5-FU, na parametry inhibicji żywotności *E. coli*, inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP oraz indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* zamieszczono w załączniku C i oznaczono rycinami 1–27.

4. Wyniki badań

4.1. Toksyczność substancji czynnych leków antydepresyjnych i antynowotworowych, metabolitów oraz ich mieszanin

W przypadku SER, jej metabolitu oraz ich mieszanin i mieszanin z lekami antynowotworowymi zauważono wyższą toksyczność w ŚO niż w ŚS i najniższą w MH. Stwierdzono, że w porównaniu z kontrolą SER hamuje żywotność bakterii *E. coli* w stężeniu 0,1 i 1 mg/dm³ (ryc. 4.1). W załączniku A zamieszczono tabelę 1 przedstawiającą wartości inhibicji żywotności *E. coli* K-12 po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU.

Sertralina w stężeniu 0,01 mg/dm³ w porównaniu z kontrolą nie wykazywała aktywności przeciwbakteryjnej względem testowego szczepu *E. coli*. Niezależnie od badanego środowiska (MH, ŚS, ŚO) najwyższy stopień inhibicji żywotności *E. coli* K-12 stwierdzono w stężeniu SER 1 mg/dm³. Wartości inhibicji żywotności hodowli bakterii dla trzech badanych środowisk zawierały się w granicach od 12,7% w MH do 16,7% w ŚO i były najwyższe w ŚO. Metabolit Nor-SER w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ z podobną intensywnością jak SER oddziaływał na żywotność hodowli bakterii. Najwyższą jej inhibicję, wynoszącą 17,3% i spowodowaną działaniem Nor-SER, wykryto w ŚO i w najwyższym stężeniu metabolitu 1 mg/dm³. Niezależnie od badanego środowiska (MH, ŚS oraz ŚO) w mieszaninach SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ po dodaniu Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ uzyskano efekt potencjacji toksyczności SER w tym stężeniu. Obecność w mieszaninie metabolitu Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ spowodowała wzmocnienie toksycznego działania SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ do 12,4% w MH, 13,8% w ŚS i 16,5% w ŚO. Z kolei dodanie do SER w stężeniu 1 mg/dm³ metabolitu Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołało pojawienie się efektu antagonizmu i osłabienie działania toksycznego składników mieszanin w ŚS i ŚO. Sugeruje to zmienność mechanizmu interakcji SER i Nor-SER w zależności od stężenia SER. Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że nie można jasno ocenić mechanizmu interakcji SER i Nor-SER w całym zakresie badanych stężeń.



RYC. 4.1. Różnice w inhibicji żywotności *E. coli* K-12 po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń. **Objaśnienia:** SER 0,01 – SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, Nor-SER 0,01 – Nor-SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, SER 0,01 + CIS 0,1 – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1 – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

Leki antynowotworowe CIS i 5-FU stosowane w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ zarówno w MH, jak i w ŚS oraz ŚO oddziaływały na żywotność testowego szczepu *E. coli* K-12. Ekspozycja badanej hodowli *E. coli* na CIS doprowadziła do maksymalnej wartości inhibicji żywotności hodowli bakterii wynoszącej 9,2% w ŚO. Z kolei traktowanie hodowli bakteryjnej 5-FU wywołało inhibicję jej żywotności do 5,6% w ŚO. Z mieszanin SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm^3 z CIS w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ najwyższy poziom inhibicji żywotności hodowli *E. coli* wykryto dla mieszaniny SER w stężeniu 1 mg/dm^3 z CIS w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ w ŚO, z wartością inhibicji 22,3%. W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano zależność, że dodanie do SER, Nor-SER oraz mieszanin SER z Nor-SER leku antynowotworowego 5-FU w większości prowadziło do wzmocnienia ich toksyczności. W porównaniu z kontrolą najwyższy efekt toksyczny, wynoszący 25,1%, uzyskano w mieszaninie SER w stężeniu 1 mg/dm^3 z 5-FU w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$. W przypadku zastosowania mieszanin metabolitu Nor-SER w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z CIS w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ i Nor-SER w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z 5-FU w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ zaobserwowano podobny stopień inhibicji żywotności hodowli *E. coli* K-12 w porównaniu z odpowiednimi mieszaninami z SER. W większości badanych mieszanin w trzech środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO) zauważono zależność, że dodatek do mieszanin CIS i 5-FU powodował synergistyczny efekt oddziaływania składników mieszanin i wzmocnienie ich toksyczności względem szczepu *E. coli*. Wyjątki stanowią mieszaniny w ŚO – SER w stężeniu 1 mg/dm^3 z Nor-SER w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z CIS w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ oraz SER w stężeniu 1 mg/dm^3 z Nor-SER w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z 5-FU w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$, w przypadku których po dodaniu CIS i 5-FU zaobserwowano efekt antagonistycznego oddziaływania składników w mieszaninach i zmniejszenie ich toksyczności względem *E. coli*.

Zauważono także, że w badanych mieszaninach efekt synergistycznego oddziaływania składników pojawiał się częściej w MH oraz ŚS niż w ŚO. Głównie w ŚO, a w mniejszym stopniu w ŚS wykryto efekt osłabienia działania toksycznego składników mieszanin (efekt antagonizmu). We wszystkich badanych środowiskach najwyższe wartości inhibicji żywotności *E. coli* K-12 stwierdzono po ekspozycji bakterii na mieszaniny SER w stężeniu 0,1 i 1 mg/dm^3 z Nor-SER w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ i z CIS w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ oraz SER w stężeniu 1 mg/dm^3 z Nor-SER w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ i z 5-FU w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$. Największy wzrost wartości inhibicji żywotności do 26,2% w MH, 27,8% w ŚS oraz 28,9% w ŚO wykryto w mieszaninie SER w stężeniu 1 mg/dm^3 z Nor-SER w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ i z CIS w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$. Mieszaniny SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm^3 z Nor-SER w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ i z 5-FU w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ w trzech badanych środowiskach w mniejszym stopniu oddziaływały na żywotność hodowli *E. coli*, wywołując ponad 19-procentową inhibicję.

Wzmocnienie toksyczności w mieszaninach w porównaniu z sumarycznym efektem toksyczności pojedynczych składników mieszanin stwierdzono w następujących przypadkach:

- SER w stężeniu $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z CIS $0,1 \text{ mg/dm}^3$,

- SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³,
- SER 1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³,
- Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH i ŚS),
- Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH i ŚS),
- SER 0,01 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH i ŚS),
- SER 0,1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³,
- SER 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH i ŚS),
- SER 0,01 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³,
- SER 0,1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³,
- SER 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH i ŚS).

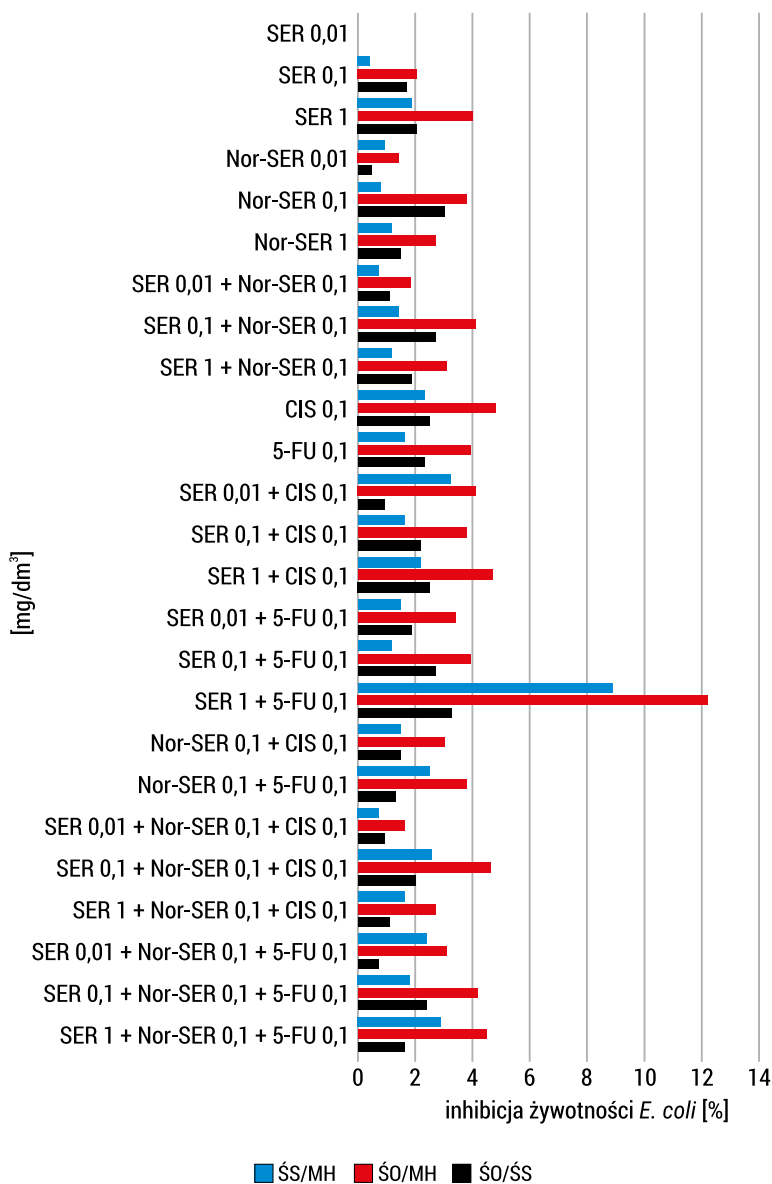
W załączniku B w tabelach 3–5 oraz 30–32 zaprezentowano wyniki analizy statystycznej działania SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na żywotność hodowli *E. coli*. Wykonana analiza wykryła w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS i ŚO) istotne statystycznie różnice w inhibicji żywotności hodowli *E. coli* pomiędzy różnymi stężeniami SER, między SER i Nor-SER, CIS i 5-FU a mieszaninami SER z Nor-SER i mieszaninami SER i Nor-SER zawierającymi w swoim składzie CIS i 5-FU. Ponadto wykazano, że niezależnie od badanego środowiska tylko w przypadku mieszaniny SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ wykryto istotne statystycznie różnice w wartościach inhibicji żywotności hodowli *E. coli* pomiędzy mieszaniną a jej pojedynczymi składnikami. Sumując zaś wartości inhibicji żywotności hodowli bakterii przez pojedyncze składniki dla hipotetycznych mieszanin wykazano znacznie więcej istotnych statystycznie różnic w wartościach inhibicji żywotności hodowli *E. coli* pomiędzy mieszaninami a ich pojedynczymi składnikami (załącznik B, tabele 30–32). Te różnice wykryto między hipotetycznymi mieszaninami SER w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO); SER 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO); Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO); SER 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO); Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w ŚO) oraz SER 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS); SER 0,01 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w ŚO) a ich pojedynczymi składnikami. Więcej różnic wykryto w ŚO w porównaniu z MH i ŚS.

Analiza podobieństwa działania SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na żywotność *E. coli* wykryła w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO) dwa skupienia charakteryzujące się podobieństwem wyników inhibicji żywotności hodowli *E. coli* (załącznik C, ryc. 1–3). Niezależnie od badanego środowiska w pierwszym skupieniu znajdowały się leki i metabolit oraz mieszaniny dwuskładnikowe, w drugim natomiast dominowały mieszaniny dwu- i trójskładnikowe. Na tej podstawie stwierdzono, że w trzech badanych środowiskach ilość składników mieszanin wpływała na podobieństwo ich działania na żywotność hodowli bakterii.

W prezentowanej monografii porównano różnice w wartościach inhibicji żywotności *E. coli* K-12 eksponowanej na SER, Nor-SER, CIS i 5-FU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU pomiędzy MH a ŚS, pomiędzy MH a ŚO oraz pomiędzy ŚO a ŚS (ryc. 4.2). W załączniku A w tabeli 2 przedstawiono porównanie wartości inhibicji żywotności *E. coli* między ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i między ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Wyższe wartości różnic w inhibicji żywotności bakterii zaobserwowano pomiędzy ŚO a MH w porównaniu z różnicami pomiędzy ŚS a MH. Największe różnice w wartościach inhibicji żywotności bakterii w ŚS i ŚO, porównując do MH, wykryto dla mieszaniny SER w stężeniu 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ i wynosiły one odpowiednio 8,9 i 12,2%. Po ekspozycji hodowli *E. coli* na SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ różnice w inhibicji żywotności bakterii pomiędzy środowiskami prowadzonych analiz były najwyższe między ŚO a MH (ŚO/MH) i wynosiły 4%. Dla badanych stężeń Nor-SER 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ wartości inhibicji żywotności *E. coli* K-12 były wyższe w ŚS i ŚO niż MH z maksymalną wartością różnic pomiędzy ŚO a MH wynoszącą 3,8%.

Największe różnice w inhibicji żywotności bakterii po ich ekspozycji na CIS i 5-FU wykryto między ŚO a MH i były one wyższe dla CIS w porównaniu z 5-FU. Porównując ŚS do MH, różnice w inhibicji żywotności bakterii inkubowanych z CIS i 5-FU wynosiły 2,3% dla CIS i 1,6% dla 5-FU. Podobne różnice wykryto dla CIS i 5-FU w ŚO w porównaniu z ŚS.

W przypadku inkubacji hodowli *E. coli* z mieszaninami SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ różnice w wartościach inhibicji żywotności *E. coli* K-12 były najwyższe, z maksymalną wartością 4,7% pomiędzy ŚO a MH (ŚO/MH). Nieco wyższe wartości różnic w oddziaływaniu środowisk prowadzonych analiz na parametr żywotności wykryto po inkubacji *E. coli* K-12 z mieszaninami SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³. Z kolei po inkubacji *E. coli* K-12 z mieszaninami metabolitu Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ i Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ różnice w inhibicji żywotności hodowli *E. coli* osiągnęły maksymalną wartość 3,8% między ŚO a MH. Nieznacznie wyższą aktywność bakteriobójczą badanych związków i ich mieszanin w porównaniu z MH zaobserwowano w ŚS i ŚO i po ekspozycji badanej hodowli bakterii na mieszaniny SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³. Maksymalne różnice wynoszące 4,6% wykryto dla mieszanin SER z Nor-SER i z CIS pomiędzy ŚO a MH. Uzyskane w pracy wyniki wykazały, że w większości badanych leków, metabolitów i ich mieszanin wykryto między badanymi środowiskami niewielkie różnice w wartościach toksyczności wynoszące maksymalnie około 4%.



RYC. 4.2. Różnice w wartościach inhibicji żywotności *E. coli* K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i między ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. **Objaśnienia:** ŚS/MH – różnice w wartościach inhibicji żywotności pomiędzy ŚS a MH, ŚO/MH – różnice w wartościach inhibicji żywotności pomiędzy ŚO a MH, ŚO/ŚS – różnice w wartościach inhibicji żywotności pomiędzy ŚO a ŚS. **SER 0,01** – SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, **Nor-SER 0,01** – Nor-SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, **SER 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

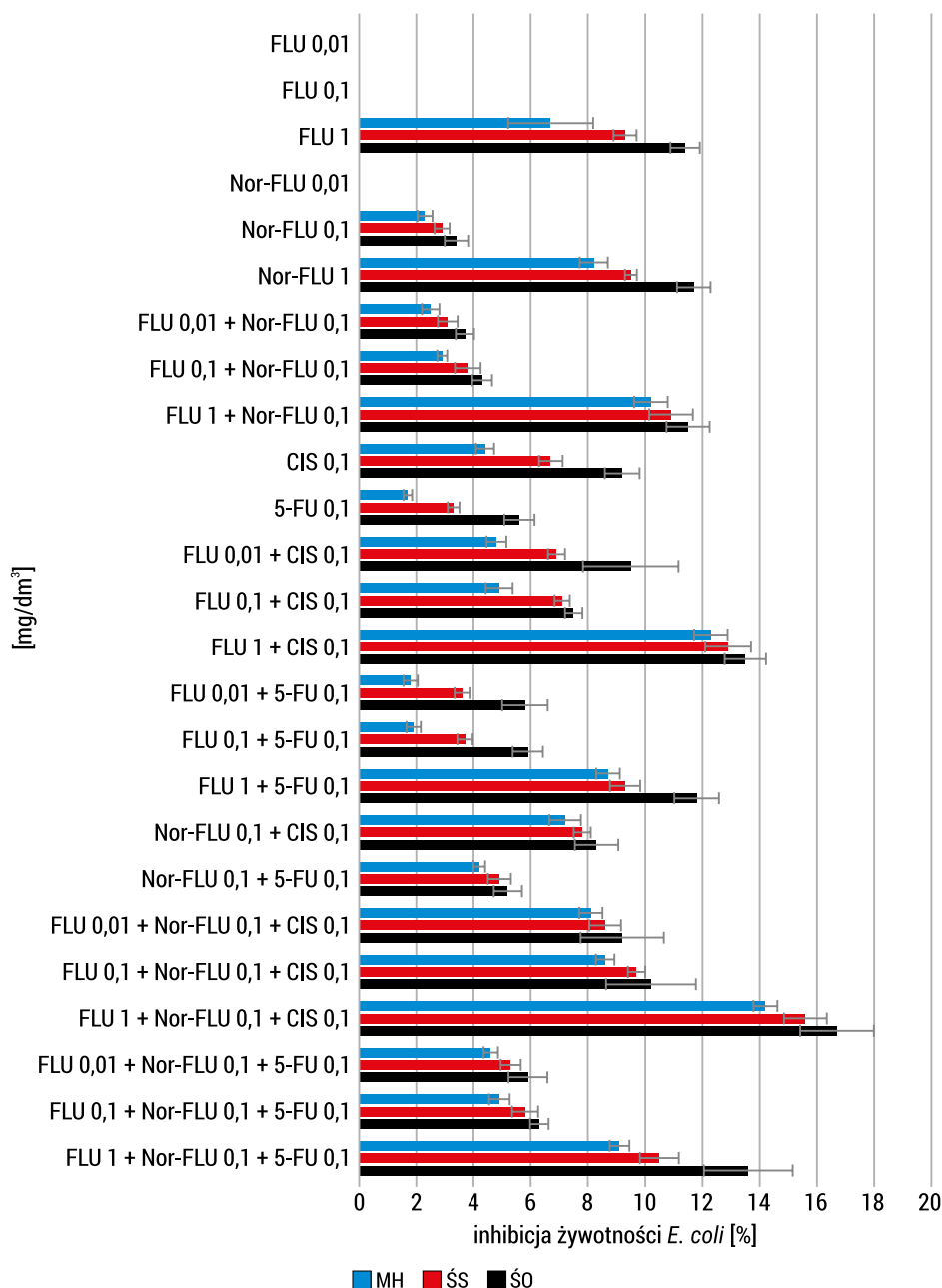
W przeprowadzonym eksperymencie zaobserwowano, że FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaniny charakteryzowały się najwyższą toksycznością w ŚO, niższą w ŚS i najniższą w MH. W wykonanych badaniach w porównaniu z kontrolą wykazano inhibicję żywotności *E. coli* K-12 po 24-godzinnej inkubacji z FLU badaną w stężeniu 1 mg/dm³ (ryc. 4.3). W załączniku A w tabeli 3 przedstawiono wartości inhibicji żywotności *E. coli* K-12 po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Nie wykryto wpływu substancji czynnej FLU, badanej w niższych stężeniach 0,01; 0,1 mg/dm³, na parametr żywotności *E. coli*.

W porównaniu z kontrolą dla najwyższego badanego stężenia FLU 1 mg/dm³ wartości inhibicji żywotności hodowli *E. coli* były wyższe o 6,7% w MH, o 9,3% w ŚS oraz o 11,4% w ŚO. Przeprowadzone badania wykazały podobne wartości inhibicji żywotności *E. coli* K-12 po ekspozycji bakterii na Nor-FLU w stężeniu 1 mg/dm³ w porównaniu z analogicznym stężeniem FLU. W przypadku Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ inhibicja żywotności hodowli *E. coli* osiągnęła wartość około 4% w ŚO i ponad 2% w MH i ŚS. W mieszaninach FLU w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wykryto efekt potencjacji toksyczności FLU w obecności metabolitu Nor-FLU. Porównując z kontrolą, dla mieszaniny FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wartości toksyczności wynosiły 10,2% w MH, 10,9% w ŚS oraz 11,5% w ŚO. Dla mieszaniny tej zauważono zróżnicowaną toksyczność składników mieszaniny w zależności od środowiska prowadzonych badań. W MH składniki mieszaniny wykazywały efekt synergizmu, w ŚS oraz ŚO natomiast efekt antagonizmu.

W badanych środowiskach efekt potencjacji toksyczności FLU w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/dm³ wykryto pod wpływem dodania CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. Wyjątkiem jest mieszanina FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ w ŚO, gdzie wykazano antagonistyczne działanie składników mieszaniny. W większości pozostałych mieszanin dwu- i trójskładnikowych dodanie do FLU, Nor-FLU oraz mieszanin FLU z Nor-FLU leków antynowotworowych CIS i 5-FU wywoływało w MH efekt synergistycznego, a w ŚS i ŚO efekt antagonistycznego działania składników mieszanin. Wskazuje to na możliwość oddziaływania środowiska prowadzonych badań na toksyczność składników mieszanin. W porównaniu z kontrolą w mieszaninach FLU, Nor-FLU i FLU z Nor-FLU z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU maksymalne wartości inhibicji żywotności hodowli bakterii były wyższe o 14,2% w MH, 15,6% w ŚS oraz 16,7% w ŚO dla mieszaniny FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³.

Wzmocnienie toksyczności w mieszaninach w porównaniu z sumarycznym efektem toksyczności pojedynczych składników mieszanin stwierdzono w następujących przypadkach:

- FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH),
- Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH),
- FLU 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH),
- FLU 0,01 i 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH).



RYC. 4.3. Różnice w inhibicji żywotności *E. coli* K-12 po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń. **Objaśnienia:** FLU 0,01 – FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, Nor-FLU 0,01 – Nor-FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, FLU 0,01 + CIS 0,1 – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1 – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

W załączniku B w tabelach 12–14 i 39–41 zaprezentowano wyniki analizy statystycznej działania FLU, Nor-FLU, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin na żywotność hodowli *E. coli*. W trzech badanych środowiskach wykryto istotne statystycznie różnice pomiędzy różnymi stężeniami FLU, Nor-FLU, pomiędzy CIS a 5-FU, pomiędzy FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU a mieszaninami FLU z Nor-FLU oraz mieszaninami FLU i Nor-FLU zawierającymi CIS i 5-FU. Te różnice w wartościach inhibicji żywotności hodowli bakterii zaobserwowano pomiędzy mieszaninami FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ (w MH); FLU 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH i ŚS); Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH i ŚS); FLU 0,01 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH); FLU 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS); FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO) a ich pojedynczymi składnikami.

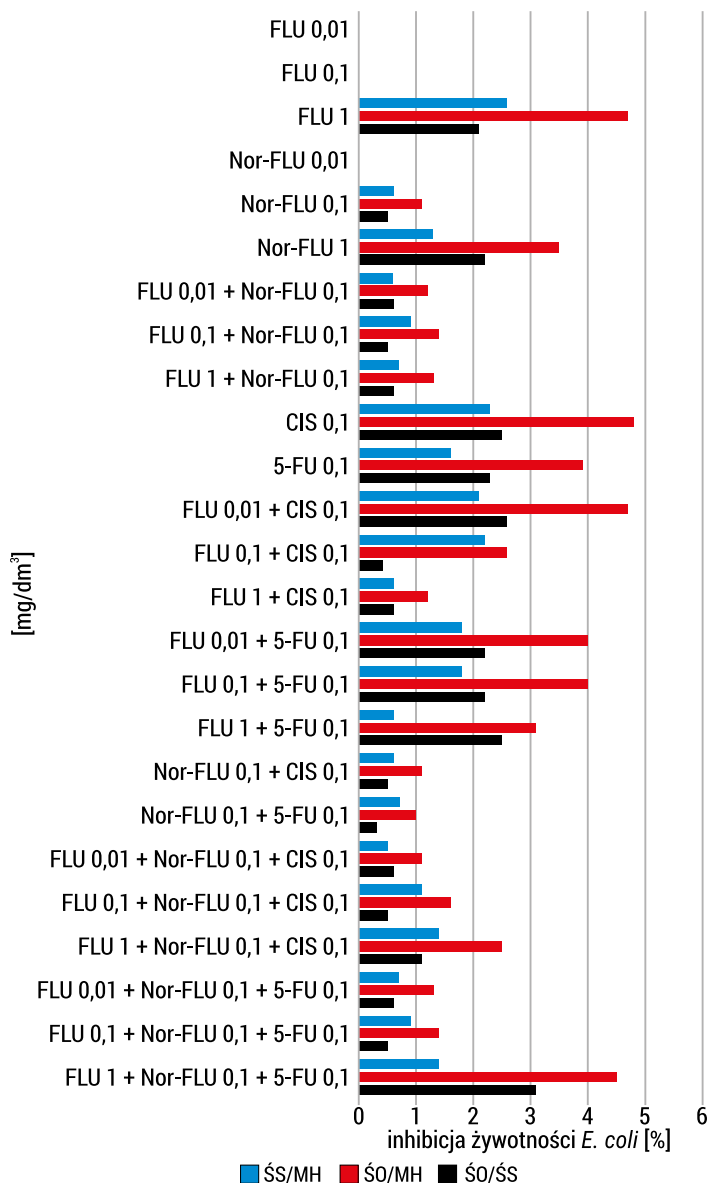
Najwięcej istotnych statystycznie różnic wykryto w MH i ŚS, mniej zaś w ŚO. Było ich także więcej dla hipotetycznych mieszanin w przypadku zsumowania wartości inhibicji żywotności hodowli bakterii przez pojedyncze składniki FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS); FLU 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ (w ŚS); FLU 0,01 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH); FLU 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w ŚS); FLU 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w ŚO); FLU 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w ŚS); FLU 1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH); Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS); Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS); FLU 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS); FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³ (w ŚS); FLU 0,01; 0,1; 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS); FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w ŚO). Więcej istotnych statystycznie różnic wykryto w ŚS i MH niż w ŚO.

Analiza podobieństwa działania FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na żywotność *E. coli* wykazała, że w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO) ze względu na podobieństwo otrzymanych wyników inhibicji żywotności hodowli bakterii badane leki, metabolity oraz ich mieszaniny podzielono na dwa skupienia (załącznik C, ryc. 4–6). W MH w obu skupieniach znajdowały się zarówno pojedyncze roztwory leków, metabolitów, jak i mieszaniny dwu- i trójskładnikowe. W pierwszym skupieniu wykryto więcej pojedynczych roztworów leków i metabolitów. W przypadku mieszanin znajdowały się tutaj te zawierające w swoim składzie CIS i 5-FU. W drugim natomiast skupieniu zauważono więcej mieszanin trójskładnikowych (załącznik C, ryc. 4). W ŚS oraz ŚO stwierdzono inny skład poszczególnych skupień, w pierwszym skupieniu nie wykazano obecności CIS w mieszaninach. Otrzymane wyniki wskazują, że rodzaj badanego środowiska miał wpływ na podobieństwo działania FLU, Nor-FLU, CIS oraz 5-FU oraz ich mieszanin na żywotność hodowli bakterii. Zauważono również, że w ŚS i ŚO obecność CIS w mieszaninach wpływała na zróżnicowanie ich działania na żywotność hodowli *E. coli*.

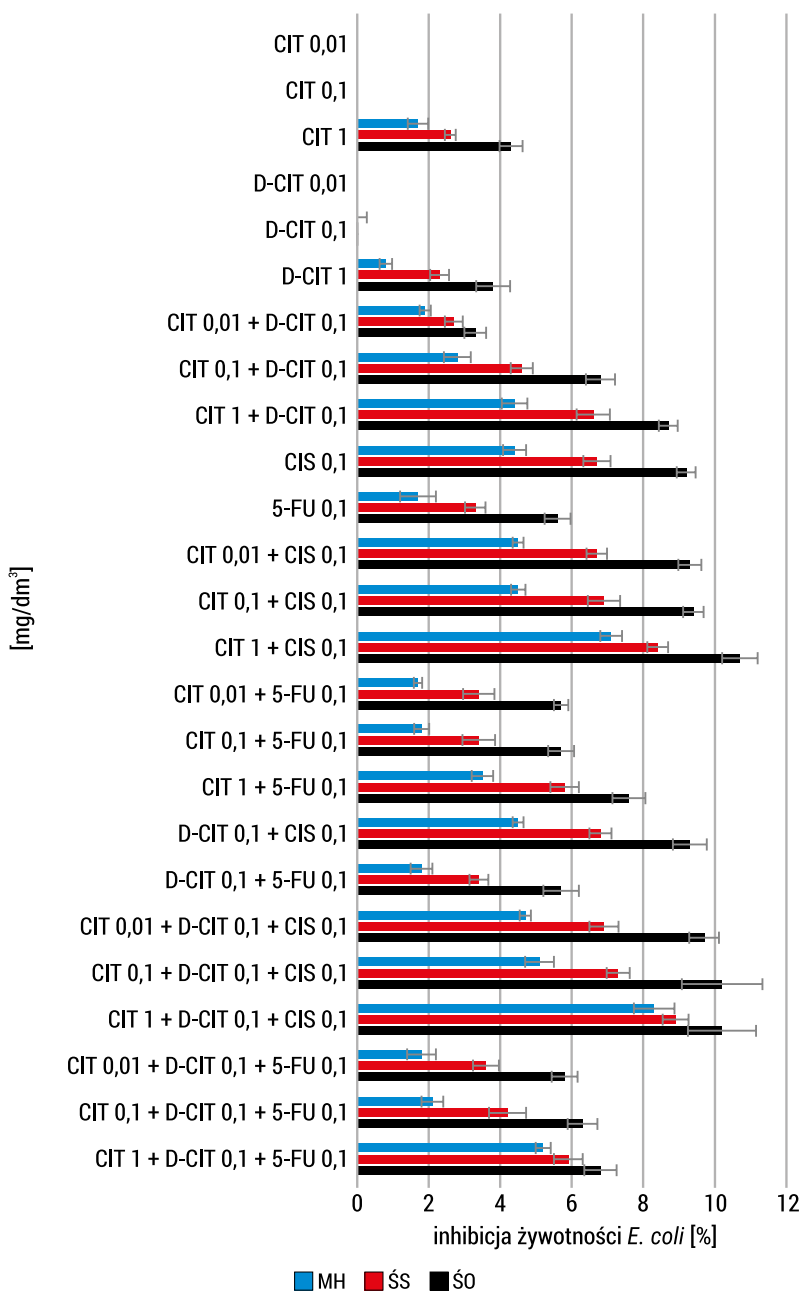
W załączniku A w tabeli 4 przedstawiono różnice w wartościach inhibicji żywotności *E. coli* K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS

i 5-FU. W przypadku FLU największe różnice w inhibicji żywotności bakterii zaobserwowano między ŚO a MH (ŚO/MH) oraz ŚŚ a MH w najwyższym stosowanym stężeniu FLU 1 mg/dm³ (ryc. 4.4). Przy FLU w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/dm³ nie stwierdzono różnic w inhibicji żywotności bakterii pomiędzy wszystkimi badanymi środowiskami. Z kolei stosowana w tym samym stężeniu 1 mg/dm³ Nor-FLU wywołała różnice do 3,5% w inhibicji żywotności *E. coli* K-12 pomiędzy ŚO a MH. W przypadku CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ różnice w inhibicji żywotności bakterii między ŚŚ, ŚO a MH wynosiły maksymalnie do 4,8%, pomiędzy zaś ŚO a ŚŚ do 2,5%. Dla 5-FU wartości tych różnic zawierały się w przedziałach od 1,6 do 3,9% i były najwyższe pomiędzy ŚO a MH. Zaobserwowano także różnice w potencjale bakteriobójczym FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³, Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz ich mieszanin z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ w ŚŚ i ŚO w porównaniu z MH oraz pomiędzy ŚO a ŚŚ. Nieco wyższy potencjał bakteriobójczy badanych związków i ich mieszanin w porównaniu z MH zaobserwowano w ŚŚ i ŚO i po ekspozycji bakterii na mieszaninę FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. Dla mieszanin tych różnice w inhibicji żywotności pomiędzy ŚO a MH wynosiły 4,7%. Nieco niższe wartości różnic wykryto dla mieszanin FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ między ŚŚ, ŚO a MH oraz między ŚO a ŚŚ z maksymalną wartością do 4% pomiędzy ŚO a MH. Z kolei dla mieszanin Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ różnice w inhibicji żywotności bakterii pomiędzy ŚŚ, ŚO a MH oraz pomiędzy ŚO a ŚŚ były nieznaczne. Mieszaniny FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywoływały różnice w inhibicji żywotności bakterii w ŚŚ, ŚO w porównaniu z MH z najwyższą wartością do 4,5% pomiędzy ŚO a MH. Uzyskane w pracy wyniki wykazały niewielkie różnice wynoszące maksymalnie około 5% w wartościach toksyczności FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin między badanymi środowiskami (MH, ŚŚ oraz ŚO).

Najwyższą aktywność toksyczną CIT, D-CIT, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin wykryto w ŚO, niższą w ŚŚ i najniższą w MH. Dla CIT maksymalną wartość inhibicji żywotności wynoszącą 4,3% zaobserwowano w ŚO i w najwyższym badanym stężeniu 1 mg/dm³ (ryc. 4.5). W załączniku A w tabeli 5 przedstawiono wartości inhibicji żywotności *E. coli* K-12 po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. W przeprowadzonym eksperymencie wykryto, że zarówno CIT, jak i D-CIT w stężeniu 1 mg/dm³ wykazują podobną aktywność przeciwbakteryjną względem szczepu *E. coli* w MH, ŚŚ oraz ŚO. Dla D-CIT najwyższą wartość inhibicji żywotności bakterii zanotowano po ich inkubacji z 1 mg/dm³ metabolitu w ŚO i wynosiła ona 3,8%. W mieszaninach CIT w stężeniach 0,01 i 0,1 z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ – pod wpływem dodania tego metabolitu – wykryto potencjację toksyczności CIT, a w stężeniu 1 mg/dm³ CIT niewielki synergizm toksycznego oddziaływania obu składników. Dla mieszanin tych najwyższą toksyczność względem hodowli *E. coli* zaobserwowano w mieszaninie CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i wynosiła ona odpowiednio 4,4% w MH, 6,6% w ŚŚ oraz 8,7% w ŚO.



RYC. 4.4. Różnice w wartościach inhibicji żywotności *E. coli* K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. **Objaśnienia:** ŚS/MH – różnice w wartościach inhibicji żywotności pomiędzy ŚS a MH, ŚO/MH – różnice w wartościach inhibicji żywotności pomiędzy ŚO a MH, ŚO/ŚS – różnice w wartościach inhibicji żywotności pomiędzy ŚO a ŚS. **FLU 0,01** – FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, **Nor-FLU 0,01** – Nor-FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, **FLU 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³



RYC. 4.5. Różnice w inibicji żywotności *E. coli* K-12 po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń. **Objaśnienia:** CIT 0,01 – CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, D-CIT 0,01 – DCIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, CIT 0,01 + CIS 0,1 – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1 – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

W tych trzech badanych środowiskach zarówno CIS, jak i 5-FU wywoływały inhibicję żywotności hodowli *E. coli* z maksymalnymi wartościami 9,2% w ŚO dla CIS oraz 5,6% w ŚO dla 5-FU. Po ekspozycji bakterii na mieszaniny CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ w zależności od badanego środowiska zauważono efekt potencjacji, synergizmu, jak również antagonistycznego oddziaływania składników mieszanin. Efekt antagonizmu pojawiał się głównie w ŚO oraz w mieszaninach zawierających najwyższe stężenie CIT 1 mg/dm³. Synergistyczne natomiast działanie składników zaobserwowano dla mieszaniny CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. W tej samej mieszaninie jej toksyczność względem hodowli bakterii wynosiła 7,1% w MH, 8,4% w ŚS oraz 10,7% w ŚO.

Z kolei w mieszaninie CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ inhibicja żywotności hodowli *E. coli* osiągnęła wartość 3,5% w MH, 5,8% w ŚS i 7,6% w ŚO. W mieszaninach D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ nie wykryto istotnych zmian toksyczności mieszanin w porównaniu z sumaryczną wartością toksyczności składników mieszanin. Dla mieszaniny D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ inhibicja żywotności hodowli bakterii wynosiła 4,5% w MH, 6,8% w ŚS oraz 9,3% w ŚO. W mieszaninie D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wartości inhibicji żywotności były niższe. W mieszaninach CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ mechanizmami toksyczności były potencjacja, synergizm i antagonistyczne działanie składników mieszanin. Efekt antagonizmu występował częściej w ŚO niż w ŚS i MH, potencjację zaś wykrywano we wszystkich badanych środowiskach. Ponadto zauważono, że antagonistyczne działanie składników mieszanin pojawiało się w mieszaninach zawierających w swoim składzie CIT w najwyższym badanym stężeniu 1 mg/dm³. Uzyskane wyniki nie pozwalają na sformułowanie ogólnych wniosków odnośnie do oddziaływania CIT i D-CIT w mieszaninach.

Z mieszanin CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ najintensywniejszym działaniem toksycznym w porównaniu z kontrolą odznaczała się mieszanina zawierająca CIT w najwyższym badanym stężeniu 1 mg/dm³ w MH, ŚS oraz ŚO, w której inhibicja żywotności hodowli bakterii osiągnęła wartości 8,3% w MH, 8,9% w ŚS oraz 10,2% w ŚO. Niższe wartości, porównując do mieszanin CIT z D-CIT i z CIS, uzyskano w mieszaninach CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³. Najwyższe wartości toksyczności w porównaniu z kontrolą wykryto w mieszaninach CIT w stężeniu 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³.

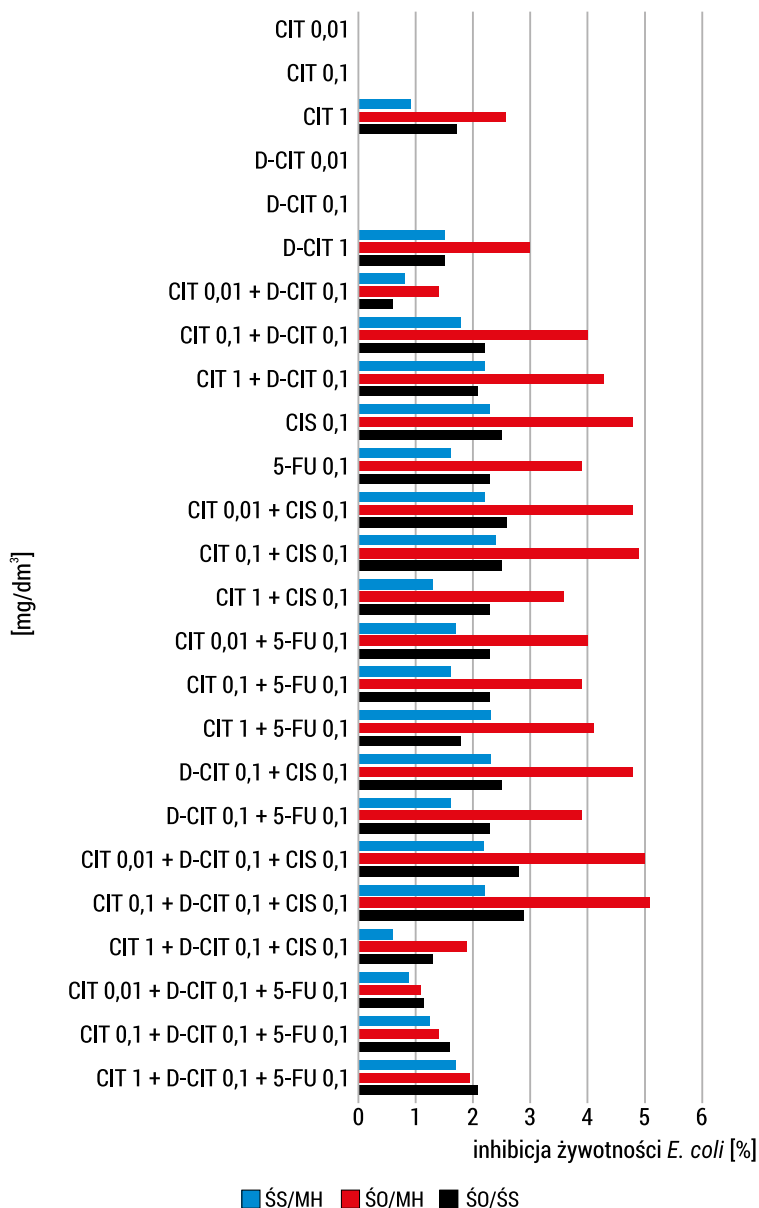
Wzmocnienie toksyczności w mieszaninach w porównaniu z sumarycznym efektem toksyczności pojedynczych składników mieszanin stwierdzono w następujących przypadkach:

- CIT w stężeniu 1 mg/dm^3 z CIS $0,1 \text{ mg/dm}^3$ (w MH),
- CIT 1 mg/dm^3 z D-CIT $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z 5-FU $0,1 \text{ mg/dm}^3$ (w MH).

W załączniku B w tabelach 21–23 oraz 48–50 przedstawiono wyniki analizy statystycznej działania CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na żywotność hodowli *E. coli*. W trzech badanych środowiskach (MH, ŚS, ŚO) stwierdzono istotne statystycznie różnice w wartościach inhibicji żywotności hodowli *E. coli* pomiędzy różnymi stężeniami CIT, D-CIT, pomiędzy CIS a 5-FU, pomiędzy CIT, D-CIT, CIS i 5-FU a mieszaninami CIT z D-CIT oraz mieszaninami CIT i D-CIT zawierającymi w swoim składzie CIS i 5-FU. Uzyskane wyniki wykazały istotne statystycznie różnice w wartościach inhibicji żywotności hodowli *E. coli* pomiędzy mieszaninami CIT w stężeniu 1 mg/dm^3 z D-CIT $0,1 \text{ mg/dm}^3$ (w MH, ŚS, ŚO); CIT 1 mg/dm^3 z CIS $0,1 \text{ mg/dm}^3$ (w MH); CIT 1 mg/dm^3 z 5-FU $0,1 \text{ mg/dm}^3$ (w MH, ŚS); CIT 1 mg/dm^3 z D-CIT $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z CIS $0,1 \text{ mg/dm}^3$ (w MH, ŚS) oraz CIT 1 mg/dm^3 z D-CIT $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z 5-FU $0,1 \text{ mg/dm}^3$ (w MH, ŚS) a ich pojedynczymi składnikami. Najwięcej tych różnic wykryto w MH i ŚS, mniej w ŚO, mniej zaś w przypadku hipotetycznych mieszanin. Niezależnie od badanego środowiska stwierdzono istotne statystycznie różnice w wartościach inhibicji żywotności hodowli *E. coli* pomiędzy mieszaninami hipotetycznymi CIT 1 mg/dm^3 z CIS $0,1 \text{ mg/dm}^3$; CIT 1 mg/dm^3 z 5-FU $0,1 \text{ mg/dm}^3$; CIT 1 mg/dm^3 z D-CIT $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z CIS $0,1 \text{ mg/dm}^3$ oraz CIT 1 mg/dm^3 z D-CIT $0,1 \text{ mg/dm}^3$ z 5-FU $0,1 \text{ mg/dm}^3$ a ich pojedynczymi składnikami.

Analiza podobieństwa działania CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na żywotność *E. coli* wykryła, że w trzech badanych środowiskach w zależności od podobieństwa otrzymanych wyników inhibicji żywotności hodowli bakterii badane leki, metabolity oraz ich mieszaniny podzielono na dwa skupienia (załącznik C, ryc. 7–9). W pierwszym znajdowały się leki, metabolity oraz mieszaniny dwu- i trójskładnikowe i nie stwierdzono w nim obecności CIS. W skład drugiego skupienia wchodziły natomiast lek oraz mieszaniny dwu- i trójskładnikowe. Zauważono w nim brak metabolitów oraz dominację CIS w mieszaninach (załącznik C, ryc. 7). Otrzymane wyniki wskazują, że niezależnie od badanego środowiska (MH, ŚS oraz ŚO) obecność CIS w mieszaninach miała wpływ na zróżnicowanie ich działania na żywotność hodowli *E. coli*.

W załączniku A w tabeli 6 przedstawiono różnice w wartościach inhibicji żywotności *E. coli* K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Po inkubacji bakterii z CIT największe różnice w inhibicji żywotności bakterii zaobserwowano pomiędzy ŚO i MH (2,6%) oraz ŚS i ŚO (1,7%) w stężeniu 1 mg/dm^3 (ryc. 4.6). Z kolei w ŚS, porównując do MH, wzrost w inhibicji żywotności bakterii po inkubacji z CIT 1 mg/dm^3 wyniósł 0,9%. W pozostałych badanych stężeniach CIT nie wykryto różnic w aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanego leku względem *E. coli*.



RYC. 4.6. Różnice w wartościach inhibicji żywotności *E. coli* K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. **Objaśnienia:** ŚS/MH – różnice w wartościach inhibicji żywotności pomiędzy ŚS a MH, ŚO/MH – różnice w wartościach inhibicji żywotności pomiędzy ŚO a MH, ŚO/ŚS – różnice w wartościach inhibicji żywotności pomiędzy ŚO a ŚS. **CIT 0,01** – CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, **D-CIT 0,01** – D-CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, **CIT 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

W przypadku ekspozycji *E. coli* na D-CIT w stężeniu 1 mg/dm³ zanotowano różnice w intensywności inhibicji żywotności bakterii wynoszące 3% pomiędzy ŚO a MH. W pozostałych stężeniach D-CIT nie stwierdzono różnic w inhibicji żywotności *E. coli* pomiędzy MH a ŚS i ŚO oraz pomiędzy ŚS a ŚO. Wartości różnic w inhibicji żywotności *E. coli* w ŚO i ŚS w porównaniu z MH, zanotowane po inkubacji hodowli bakterii z mieszaninami CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³, osiągnęły maksymalną wartość 4,3% między ŚO a MH. Bardziej zróżnicowane wartości różnic w inhibicji żywotności *E. coli* uzyskano po inkubacji hodowli z CIS w ŚS i ŚO w porównaniu z MH i wynosiły one odpowiednio 2,3 i 4,8%, z kolei pomiędzy ŚS a ŚO wynosiły 2,5%. Różnicę w inhibicji żywotności bakterii pomiędzy ŚO a MH, wynoszącą 3,9%, wywołał 5-FU. Ekspozycja *E. coli* na mieszaniny CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ spowodowała natomiast zróżnicowanie wartości inhibicji żywotności bakterii o 4,9% między ŚO a MH. W ŚS w porównaniu z MH oraz pomiędzy ŚO a ŚS różnice w inhibicji żywotności były niższe. Mieszaniny CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU spowodowały pojawienie się różnic w inhibicji żywotności wynoszących 4,1% pomiędzy ŚO a MH i w najwyższym stężeniu CIT 1 mg/dm³ w mieszaninie. Ekspozycja *E. coli* K-12 na mieszaniny trójskładnikowe CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ spowodowała nieznaczne podwyższenie wartości różnic w inhibicji żywotności bakterii pomiędzy ŚS a MH, ŚO a MH oraz ŚO a ŚS z maksymalną wartością do 5,1% między ŚO a MH. Otrzymane wyniki wykazały, że dla CIT, D-CIT, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin maksymalne wartości różnic w inhibicji żywotności hodowli *E. coli* pomiędzy badanymi środowiskami wynosiły około 5%.

4.2. Cytotoksyczność substancji czynnych leków antydepresyjnych i antynowotworowych, metabolitów oraz ich mieszanin

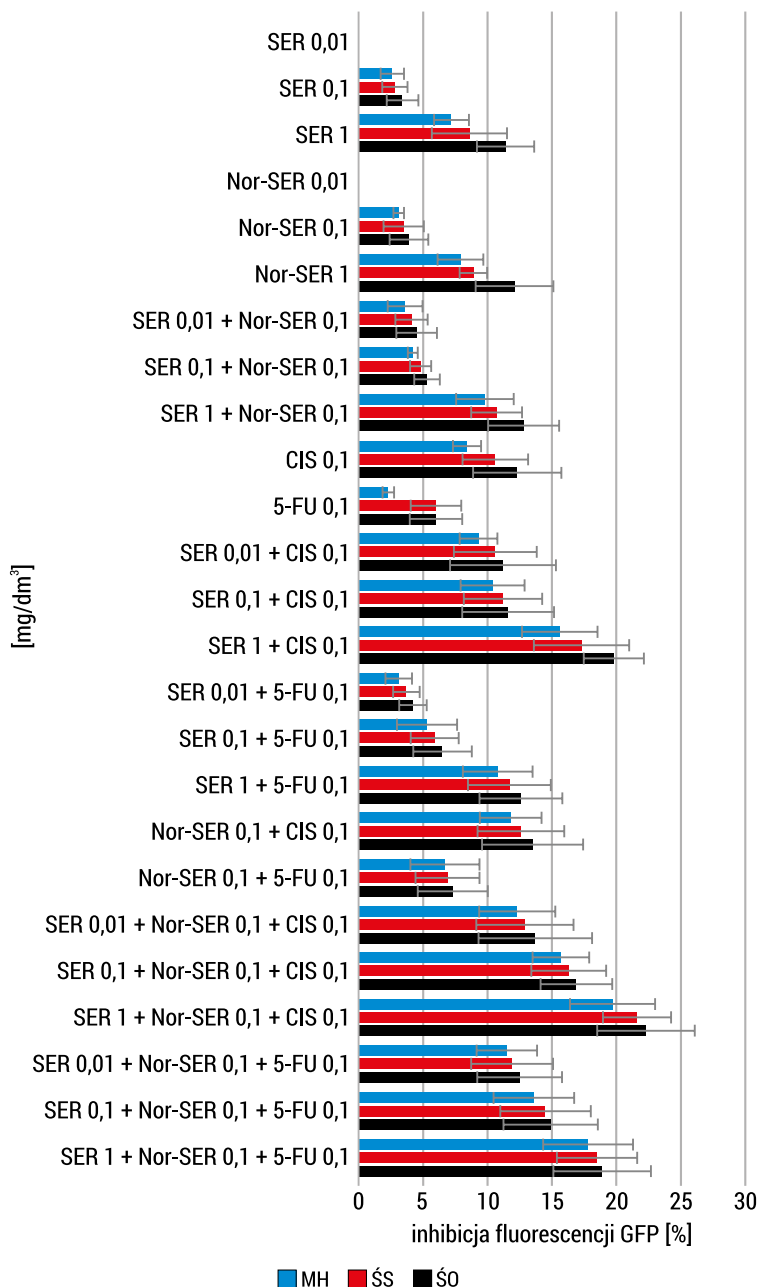
Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że SER, Nor-SER, CIS, 5-FU oraz ich mieszaniny charakteryzują się wyższą cytotoksycznością w stosunku do *E. coli* MM294-GFP w ŚO niż ŚS, a najniższą w MH. Zaobserwowano, że w porównaniu z kontrolą 24-godzinna inkubacja bakterii z SER stosowaną w stężeniu 1 mg/dm³ spowodowała inhibicję fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 do 11,4% w ŚO (ryc. 4.7). W załączniku A w tabeli 7 zaprezentowano wyniki inhibicji fluorescencji białka GFP po ekspozycji hodowli *E. coli* MM294-GFP na SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaniny. W niższym badanym stężeniu SER 0,1 mg/dm³ oraz w MH, ŚS i ŚO zaobserwowano mniej intensywną inhibicję fluorescencji GFP. Metabolit Nor-SER w stężeniu 1 mg/dm³ wywołał podobną do analogicznego stężenia SER inhibicję fluorescencji GFP wynoszącą 12,1% w ŚO. W niższym stężeniu Nor-SER 0,1 mg/dm³ wykryto niższe wartości inhibicji fluorescencji GFP, które wahały się w granicach od 3,1% w MH

do 3,9% w ŚO. Zarówno SER, jak i jej metabolit Nor-SER stosowane w najniższym stężeniu 0,01 mg/dm³ nie oddziaływały na fluorescencję białka GFP w *E. coli* MM294-GFP.

Inkubacja *E. coli* MM294-GFP z CIS i 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała inhibicję fluorescencji GFP wynoszącą maksymalnie 12,3% dla CIS i 6% dla 5-FU w ŚO. W mieszaninie SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO) wykryto, że dodanie metabolitu Nor-SER wywołało efekt potencjacji cytotoksyczności SER. Z kolei w cytotoksyczności mieszanin SER w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ niezależnie od badanego środowiska pod wpływem dodania do SER metabolitu Nor-SER pojawiał się efekt antagonistycznego oddziaływania składników mieszanin. W porównaniu z kontrolą najwyższy poziom inhibicji fluorescencji GFP odnotowano w mieszaninie SER w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³, gdzie inhibicja osiągnęła wartości 9,8% w MH, 10,7% w ŚS i 12,8% w ŚO.

Badania wykazały, że z mieszanin SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ najintensywniejszą inhibicję fluorescencji białka GFP w MH, ŚS oraz ŚO wykryto po ekspozycji hodowli *E. coli* MM294-GFP na mieszaninę zawierającą SER w stężeniu 1 mg/dm³. Dla mieszaniny tej inhibicja fluorescencji GFP wynosiła 15,6% w MH, 17,3% w ŚS oraz 19,8% w ŚO. W mieszaninach tych głównym mechanizmem cytotoksyczności w stosunku do hodowli *E. coli* było antagonistyczne działanie ich składników, szczególnie w ŚS i w ŚO, oraz addytywność w MH. Po dodaniu CIS do mieszaniny zawierającej najniższe stężenie SER 0,01 mg/dm³ w MH wykryto potencjację cytotoksyczności SER.

Inkubacja *E. coli* MM294-GFP z mieszaninami SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała inhibicję fluorescencji GFP z najwyższą wartością dla mieszaniny zawierającej SER w stężeniu 1 mg/dm³ i wynosiła ona 10,8% w MH, 11,7% w ŚS oraz 12,6% w ŚO. W przypadku cytotoksyczności tych mieszanin w ŚS i ŚO wykryto głównie antagonistyczne działanie ich składników. W MH natomiast pojawił się efekt potencjacji toksyczności SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ pod wpływem dodania 5-FU. W przypadku mieszaniny SER w stężeniu 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ w MH stwierdzono synergistyczne działanie jej składników. W porównaniu z kontrolą inhibicja fluorescencji GFP po inkubacji hodowli bakterii z mieszaniną Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ wynosiła 11,8% w MH, 12,6% w ŚS oraz 13,5% w ŚO. W przypadku mieszaniny Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wartości inhibicji były niższe. W ŚS i ŚO dominującym mechanizmem toksyczności mieszanin metabolitu z CIS lub 5-FU było antagonistyczne działanie ich składników. Z kolei w MH i w przypadku mieszaniny Nor-SER z 5-FU wykryto efekt synergistycznego działania składników. Najsilniejsze oddziaływanie na parametr fluorescencji białka GFP pojawiło się po inkubacji *E. coli* MM294-GFP z mieszaniną SER w stężeniu 1 mg/dm³ z metabolitem Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z lekiem antynowotworowym CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, gdzie zanotowane wartości inhibicji fluorescencji białka GFP wynosiły 19,7% w MH, 21,6% w ŚS oraz 22,3% w ŚO. W przypadku niższych stężeń SER 0,01 i 0,1 mg/dm³ w mieszaninach z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu



RYC. 4.7. Różnice w inhibicji fluorescencji GFP w *E. coli* MM294 po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń. **Objaśnienia:** SER 0,01 – SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, Nor-SER 0,01 – Nor-SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, SER 0,01 + CIS 0,1 – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1 – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

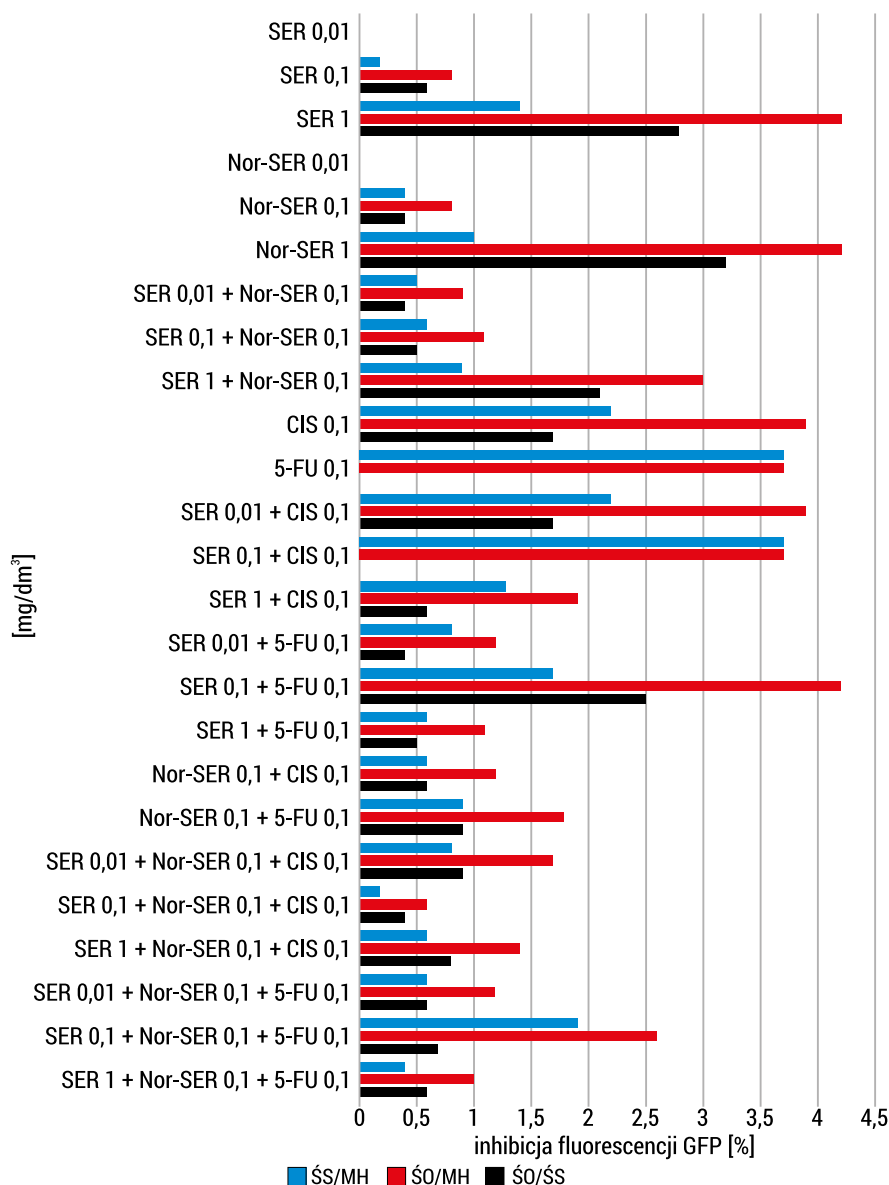
0,1 mg/dm³ zanotowano niższe wartości inhibicji fluorescencji GFP w trzech środowiskach prowadzonych badań. Podobne wartości inhibicji fluorescencji białka GFP w porównaniu z mieszaninami SER z Nor-SER i z CIS uzyskano po ekspozycji *E. coli* MM294-GFP na mieszaniny SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³. Porównując z kontrolą, najintensywniej z tych mieszanin działała mieszanina SER w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³, która spowodowała inhibicję fluorescencji białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP wynoszącą 17,8% w MH, 18,5% w ŚS oraz 18,9% w ŚO.

W cytotoksyczności mieszanin SER 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz SER 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ w ŚS oraz ŚO głównie dominował efekt antagonistycznego oraz synergistycznego oddziaływania składników mieszanin, rzadziej efekt potencjacji. W MH natomiast częściej pojawiał się efekt synergizmu i potencjacji. Potencjację toksyczności zaobserwowano w mieszaninach z najniższym stężeniem SER 0,01 mg/dm³ i pod wpływem dodania do leku i jego metabolitu leków antynowotworowych CIS i 5-FU. Biorąc pod uwagę mechanizmy cytotoksyczności mieszanin zawierających SER i Nor-SER, zaobserwowano dominację antagonistycznego działania ich składników. Uzyskane rezultaty wskazują na możliwość oddziaływania środowiska prowadzonych badań (MH, ŚS oraz ŚO) na mechanizmy cytotoksyczności mieszanin zawierających w swoim składzie CIS i 5-FU.

Wzmocnienie cytotoksyczności w mieszaninach w porównaniu z sumarycznym efektem cytotoksyczności pojedynczych składników mieszanin stwierdzono w następujących przypadkach:

- SER w stężeniu 1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH),
- Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH),
- SER 0,1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH),
- SER 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH),
- SER 0,1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS oraz ŚO),
- SER 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS oraz ŚO).

Wyniki analizy statystycznej działania SER, Nor-SER, CIS i 5-FU na fluorescencję białka GFP w *E. coli* MM294-GFP zaprezentowano w załączniku B w tabelach nr 6–8 oraz 33–35. Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono istotne statystycznie różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP pomiędzy SER, Nor-SER, CIS, 5-FU, mieszaninami SER z Nor-SER, SER z CIS i SER z 5-FU a mieszaninami SER i Nor-SER zawierającymi w swoim składzie CIS i 5-FU. Najwięcej tych różnic zauważono w MH. Ponadto analiza otrzymanych wyników wykryła istotne statystycznie zróżnicowanie w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP pomiędzy mieszaniną SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ (w MH) a wszystkimi składnikami wchodzącymi w skład mieszaniny. Przeanalizowano też mieszaniny hipotetyczne, uzyskane w wyniku zsumowania wartości inhibicji fluorescencji białka GFP ich pojedynczych składników. W tych hipotetycznych mieszaninach w trzech badanych



RYC. 4.8. Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji GFP w *E. coli* MM294 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. **Objaśnienia:** ŚS/MH – różnice w wartościach inhibicji fluorescencji pomiędzy ŚS a MH, ŚO/MH – różnice w wartościach inhibicji fluorescencji pomiędzy ŚO a MH, ŚO/ŚS – różnice w wartościach inhibicji fluorescencji pomiędzy ŚO a ŚS. **SER 0,01** – SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, **Nor-SER 0,01** – Nor-SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, **SER 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

środowiskach wykryto znacznie więcej istotnych statystycznie różnic (załącznik B, tabele 33–35) w inhibicji fluorescencji białka GFP w hodowli *E. coli* MM-294-GFP. Stwierdzono je pomiędzy hipotetycznymi mieszaninami SER w stężeniu 0,01 i 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS); SER 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO); SER 1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w ŚS, ŚO); Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH); SER 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO); SER 0,01 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH); SER 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO) a ich pojedynczymi składnikami.

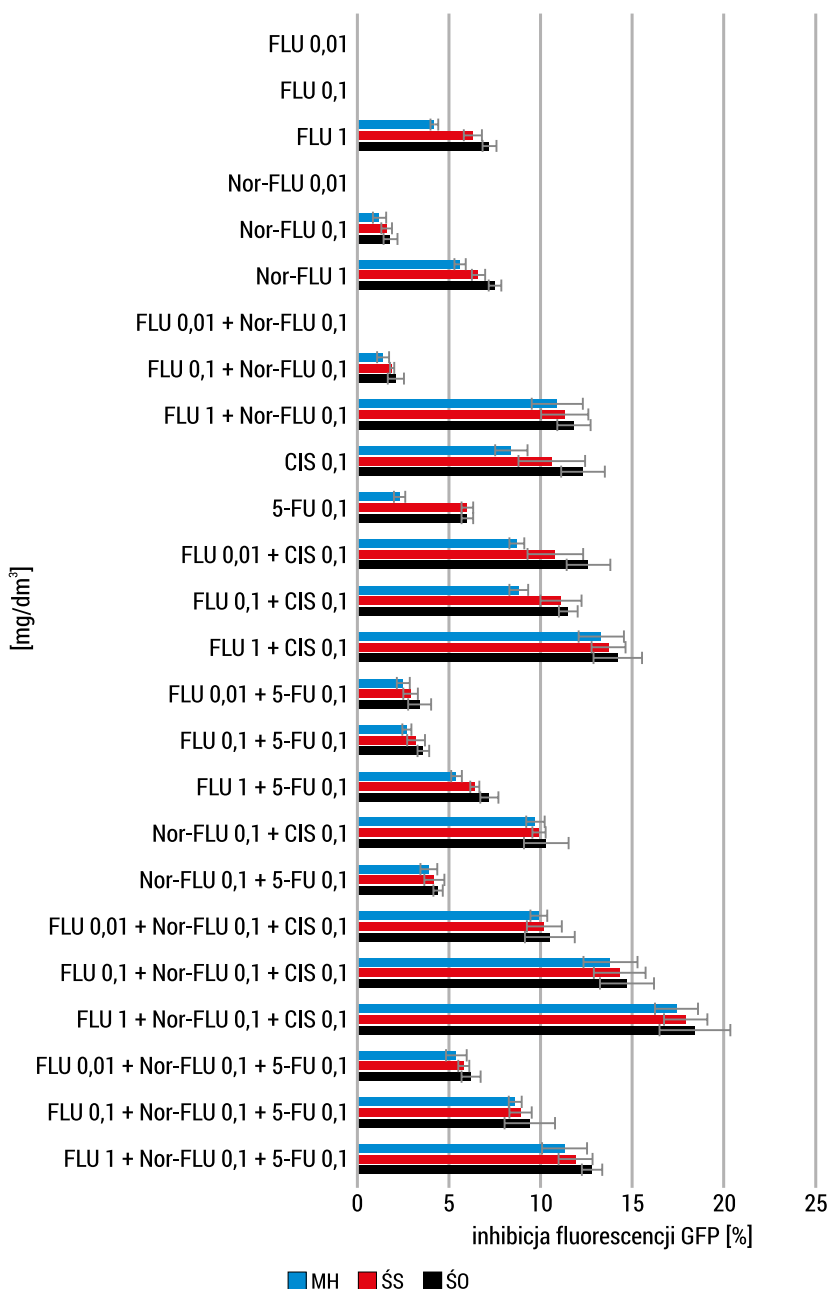
Analiza podobieństwa działania SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na fluorescencję białka GFP w *E. coli* MM294-GFP wykryła w trzech badanych środowiskach dwa główne skupienia, które charakteryzowały się podobnymi wartościami inhibicji fluorescencji białka GFP (załącznik C, ryc. 10–12). Niezależnie od badanego środowiska w pierwszym skupieniu znajdowały się leki, metabolity oraz mieszaniny dwuskładnikowe, nie zaobserwowano zaś mieszanin trójskładnikowych oraz zawierających w swoim składzie CIS. W drugim skupieniu obok leków i metabolitów znajdowały się również mieszaniny dwu- i trójskładnikowe zawierające w swoim składzie CIS. Na tej podstawie stwierdzono, że ilość składników mieszanin oraz obecność w nich CIS wpływała na zróżnicowanie ich działania na fluorescencję białka GFP.

W załączniku A w tabeli 8 przedstawiono różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji GFP wykazano między ŚO a MH, między ŚS a MH oraz między ŚO a ŚS (ryc. 4.8). Pomędzy ŚO a MH największe wartości różnic, powyżej 4% w inhibicji fluorescencji GFP, wykryto po inkubacji szczepu *E. coli* MM294-GFP z SER w stężeniu 1 mg/dm³, Nor-SER w stężeniu 1 mg/dm³ oraz z mieszaniną SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³. Nieco niższe wartości różnic, maksymalnie do 3% pomiędzy ŚO a MH w inhibicji fluorescencji białka GFP, zanotowano po inkubacji testowego szczepu *E. coli* MM294-GFP z mieszaniną SER w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³. Z kolei ekspozycja bakterii na CIS i 5-FU spowodowała pojawienie się różnic w poziomie inhibicji fluorescencji GFP, wynoszących około 4% między ŚO a MH. Pomędzy ŚS a MH i ŚO a ŚS wartości różnic w inhibicji fluorescencji GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP były znacznie niższe w przypadku CIS w porównaniu z 5-FU. W wyniku ekspozycji *E. coli* MM294-GFP na mieszaniny SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ pojawiły się różnice w wartościach inhibicji fluorescencji GFP pomiędzy ŚS a MH, ŚO a MH i ŚO a ŚS z maksymalną wartością do 3,9% między ŚO a MH. Ekspozycja bakterii na mieszaniny Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ spowodowała pojawienie się różnic powyżej 1% w wartościach inhibicji GFP w przypadku obu badanych mieszanin oraz pomiędzy ŚS a MH, ŚO a MH i ŚO a ŚS. Podobne wartości różnic w inhibicji fluorescencji białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP między badanymi środowiskami ŚS i ŚO w porównaniu

z MH oraz między ŚO a ŚS wykryto po inkubacji bakterii z mieszaninami SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. Mieszaniny SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołały różnice w wartościach inhibicji fluorescencji GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP wynoszące 1,9% pomiędzy ŚS a MH oraz 2,6% pomiędzy ŚO a MH dla stężenia SER 0,1 mg/dm³ w mieszaninie. Przeprowadzone badania wykazały, że dla SER, Nor-SER, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin maksymalne różnice w inhibicji fluorescencji białka GFP pomiędzy badanymi środowiskami wynosiły około 4%.

W przeprowadzonym eksperymencie w porównaniu z kontrolą wykazano inhibicyjny wpływ FLU stosowanej w stężeniu 1 mg/dm³ na poziom fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294. Wartość inhibicji fluorescencji białka GFP była najwyższa w ŚO i wynosiła 7,2% (ryc. 4.9). W załączniku A w tabeli 9 zaprezentowano inhibicję fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. W niższym stosowanym stężeniu FLU – 0,01 i 0,1 mg/dm³ – nie wykazano cytotoksycznego wpływu substancji czynnej leku na białko GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP. Dwudziestoczerogodzinna inkubacja *E. coli* MM294 z metabolitem Nor-FLU w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ wywołała inhibicję fluorescencji GFP do 6,6% w ŚS oraz do 7,5% w ŚO w najwyższym badanym stężeniu metabolitu. W najniższym badanym stężeniu Nor-FLU 0,01 mg/dm³ nie zaobserwowano oddziaływania na poziom fluorescencji białka GFP. W mieszaninach FLU w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wykryto zarówno potencjację cytotoksyczności FLU pod wpływem dodania metabolitu – Nor-FLU, jak i synergistyczne działanie składników mieszanin, prowadzące do wzmocnienia ich cytotoksyczności w stosunku do hodowli *E. coli* MM294-GFP. Dla mieszanin tych najwyższe wartości inhibicji fluorescencji białka GFP, wynoszące 10,9% w MH, 11,3% w ŚS oraz 11,8% w ŚO, uzyskano przy najwyższym stężeniu FLU 1 mg/dm³ w mieszaninie.

Pośród badanych mieszanin najwyższe wartości inhibicji fluorescencji białka GFP zanotowano po ekspozycji *E. coli* MM294-GFP na mieszaniny FLU w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ z maksymalnymi wartościami inhibicji wynoszącymi 17,4% w MH, 17,9% w ŚS oraz 18,4% w ŚO dla stężenia 1 mg/dm³ w mieszaninie. Biorąc pod uwagę mechanizm cytotoksyczności tych mieszanin, wykryto zarówno potencjację cytotoksyczności mieszanin FLU z Nor-FLU pod wpływem dodania CIS, jak i synergistyczne działanie składników mieszaniny. Kolejnymi silnie działającymi na białko GFP mieszaninami były FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, w przypadku których zarejestrowano głównie antagonistyczne oddziaływanie ich składników. Dla mieszaniny z najwyższym stężeniem FLU 1 mg/dm³ wartości inhibicji fluorescencji białka GFP wynosiły 13,3% w MH, 13,7% w ŚS oraz 14,2% w ŚO. W porównaniu z kontrolą mieszaniny FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ w trzech badanych środowiskach w znacznie mniejszym stopniu oddziaływały na białko GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP. Do głównych mechanizmów ich cytotoksyczności, szczególnie w ŚS oraz ŚO, zaliczono antagonizm.



RYC. 4.9. Różnice w inhibicji fluorescencji GFP w *E. coli* MM294 po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń. **Objaśnienia:** FLU 0,01 – FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, Nor-FLU 0,01 – Nor-FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, FLU 0,01 + CIS 0,1 – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1 – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

Z mieszanin metabolitu Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ intensywniejszym działaniem cytotoksycznym względem białka GFP odznaczała się mieszanina Nor-FLU z CIS, która wywołała inhibicję fluorescencji GFP wynoszącą 9,7% w MH, 9,9% w ŚŚ oraz 10,3% w ŚO. W przypadku mieszanin FLU z CIS, FLU z 5-FU, Nor-FLU z CIS oraz Nor-FLU z 5-FU głównie w ŚŚ i ŚO zaobserwowano zależność, że dodanie do FLU lub Nor-FLU leków antynowotworowych CIS lub 5-FU wywoływało pojawienie się antagonistycznego działania składników mieszanin i osłabienie ich cytotoksyczności. W MH natomiast dominowały efekty potencjacji, synergizmu i addytywności. Otrzymane wyniki wskazują na możliwy wpływ badanego środowiska (MH, ŚŚ oraz ŚO) na mechanizmy cytotoksyczności składników mieszanin. Pośród badanych mieszanin zawierających w swoim składzie FLU i Nor-FLU dominującymi mechanizmami ich cytotoksyczności były potencjacja i antagonistyczne działanie ich składników. Mieszaniny FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z mniejszą intensywnością w porównaniu z mieszaninami FLU z Nor-FLU i z CIS oddziaływały na białko GFP, wywołując inhibicję jego fluorescencji maksymalnie do wartości 11,3% w MH, 11,9% w ŚŚ oraz 12,8% w ŚO i dla najwyższego stężenia FLU 1 mg/dm³ w mieszaninie. W mieszaninach tych głównymi mechanizmami ich cytotoksyczności były antagonizm (w ŚŚ i ŚO), potencjacja (w MH i ŚŚ) oraz synergizm (w MH). Sugeruje to, że środowisko prowadzonych badań mogło mieć wpływ na mechanizm cytotoksyczności tych mieszanin.

Wzmocnienie cytotoksyczności w mieszaninach w porównaniu z sumarycznym efektem cytotoksyczności ich pojedynczych składników stwierdzono w następujących przypadkach:

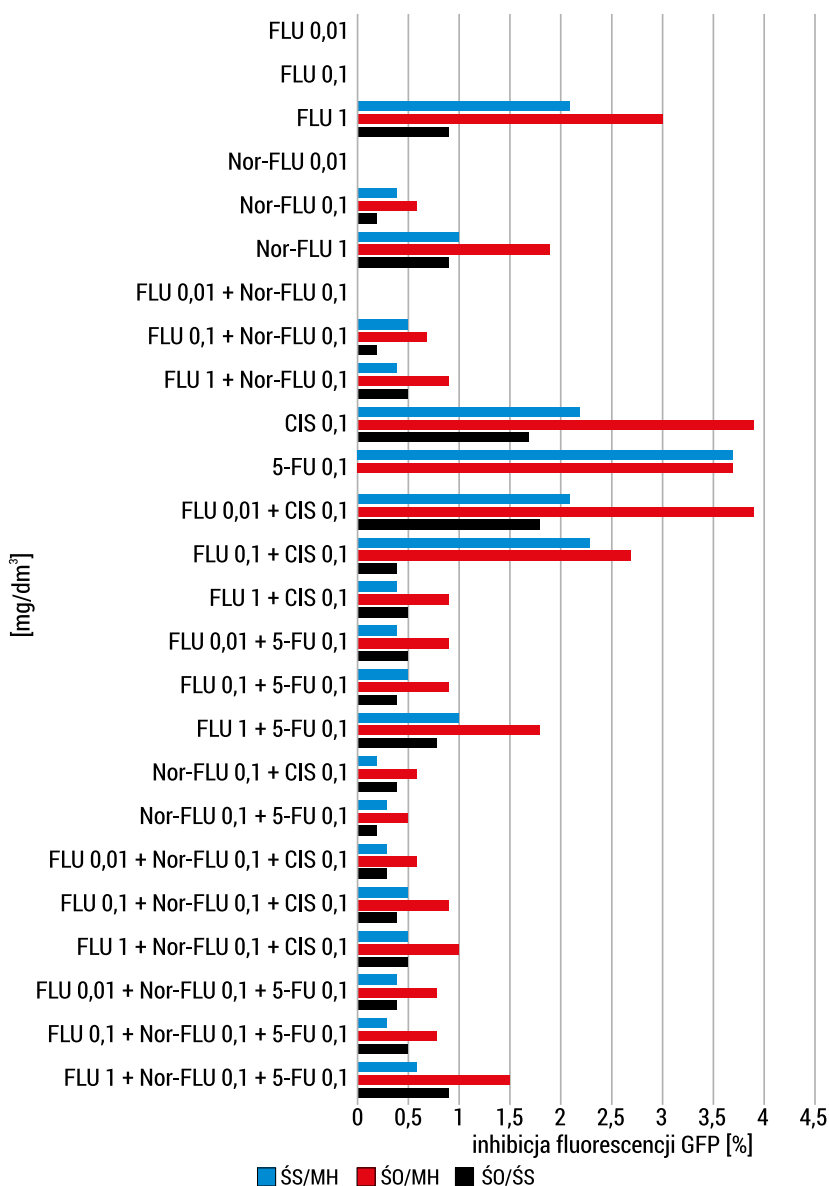
- FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ (MH, ŚŚ, ŚO),
- FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (MH, ŚŚ, ŚO),
- FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (MH).

W załączniku B w tabelach 15–17 oraz 42–44 przedstawiono wyniki analizy statystycznej wartości inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH, ŚŚ i ŚO. W tych trzech badanych środowiskach istotne statystycznie różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP wykryto pomiędzy różnymi stężeniami FLU, Nor-FLU, pomiędzy CIS a 5-FU, pomiędzy FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU a mieszaninami FLU z Nor-FLU oraz mieszaninami FLU i Nor-FLU zawierającymi CIS i 5-FU. Różnice te stwierdzono także między mieszaninami FLU z CIS, FLU z 5-FU, Nor-FLU z CIS, Nor-FLU z 5-FU, FLU z Nor-FLU i z CIS a mieszaninami FLU i Nor-FLU zawierającymi CIS i 5-FU. Ponadto istotne statystycznie różnice wykazano w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP pomiędzy mieszaninami FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ (MH, ŚŚ); FLU 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (MH, ŚŚ); FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (MH, ŚŚ, ŚO); FLU 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (MH);

FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO); FLU 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (MH) a ich pojedynczymi składnikami. Najwięcej istotnych statystycznie różnic wykryto w MH, mniej w ŚS i ŚO. W hipotetycznych mieszaninach stwierdzono podobną ilość tych różnic (załącznik B, tabele 42–44). Wykazano istotne statystycznie różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP między hipotetycznymi mieszaninami FLU 0,01 i 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ (w MH); FLU 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO); FLU 1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO); FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO); FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO) a ich pojedynczymi składnikami. Więcej istotnych statystycznie różnic wykryto w MH, mniej w ŚS i ŚO.

Analiza podobieństwa działania FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na fluorescencję białka GFP w *E. coli* MM294-GFP wykryła w trzech badanych środowiskach dwa główne skupienia, które charakteryzowały się podobnymi wartościami inhibicji fluorescencji białka GFP (załącznik C, ryc. 13–15). Niezależnie od badanego środowiska w pierwszym skupieniu znajdowały się leki, metabolity oraz mieszaniny dwuskładnikowe, nie stwierdzono w nim mieszanin trójskładnikowych oraz zawierających w swoim składzie CIS. W drugim skupieniu wykryto leki, metabolit, mieszaniny dwu- i trójskładnikowe, a wśród nich te, które zawierają w swoim składzie CIS. Na tej podstawie ustalono, że niezależnie od rodzaju środowiska prowadzonych badań (MH, ŚS, ŚO) ilość składników mieszanin oraz obecność w nich CIS miały wpływ na zróżnicowanie ich cytotoksycznego działania względem białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP.

W załączniku A w tabeli 10 przedstawiono różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Inkubacja *E. coli* MM294-GFP z FLU wywołała pojawienie się różnic w inhibicji fluorescencji GFP między ŚO a ŚS (ŚO/ŚS), ŚO a MH (ŚO/MH) oraz ŚS a MH (ŚO/ŚS) w najwyższym stosowanym stężeniu FLU 1 mg/dm³ (ryc. 4.10). Maksymalne wartości różnic wynosiły 3% między ŚO a MH. Pomiedzy badanymi środowiskami ŚO a MH, ŚS a MH i ŚO a ŚS, w niższym stężeniu FLU 0,01 i 0,1 mg/dm³, nie stwierdzono różnic w inhibicji fluorescencji GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP. Ekspozycja *E. coli* MM294-GFP na Nor-FLU w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ doprowadziła do pojawienia się niewielkich różnic o maksymalnej wartości 1,9% pomiędzy ŚO a MH. Wyższe wartości różnic w inhibicji fluorescencji GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP między ŚO a MH, ŚS a MH oraz ŚO a ŚS zauważono po inkubacji bakterii z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³. W przypadku CIS największe różnice wykryto pomiędzy ŚO a MH i wynosiły one 3,9%. Ekspozycja *E. coli* MM294-GFP na mieszaniny FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała niewielkie (0,9% pomiędzy ŚO a MH) różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP w testowej hodowli bakterii. Wyższe wartości różnic, do 3,9% pomiędzy ŚO a MH w inhibicji fluorescencji GFP, wykryto po inkubacji *E. coli* MM294-GFP z mieszaninami FLU w stężeniach

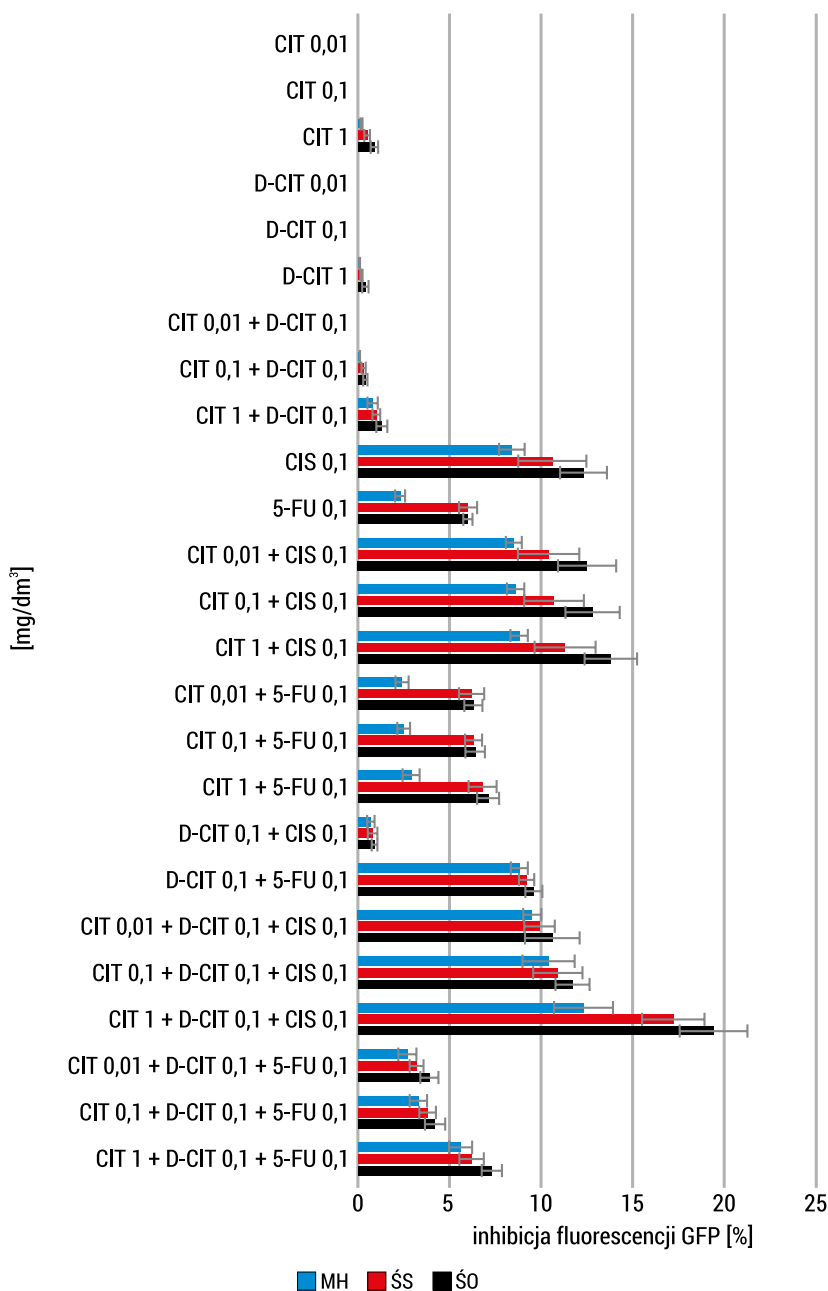


RYC. 4.10. Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji GFP w *E. coli* MM294 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. **Objaśnienia:** ŚS/MH – różnice w wartościach inhibicji fluorescencji pomiędzy ŚS a MH, ŚO/MH – różnice w wartościach inhibicji fluorescencji pomiędzy ŚO a MH, ŚO/ŚS – różnice w wartościach inhibicji fluorescencji pomiędzy ŚO a ŚS. **FLU 0,01** – FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, **Nor-FLU 0,01** – Nor-FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, **FLU 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. Dwudziestoczworgodzinne traktowanie hodowli *E. coli* MM294-GFP mieszaninami Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ spowodowało pojawienie się nieznacznych różnic w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP pomiędzy ŚS, ŚO a MH oraz pomiędzy ŚO a ŚS. Mieszaniny FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywoływały nieznaczne różnice (maksymalnie do 1%) w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP między badanymi środowiskami. Podobne wartości różnic, do 1,5% w inhibicji fluorescencji białka GFP, wykryto w mieszaninach FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ pomiędzy ŚO a MH. Największe różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP wykryto po inkubacji hodowli *E. coli* MM294-GFP z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z mieszaniną FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ pomiędzy ŚO a MH i wynosiły one 3,9%.

W trzech badanych środowiskach i w porównaniu z kontrolą zarówno CIT, jak i D-CIT w stężeniach 0,01; 0,1; 1 mg/dm³ oraz ich mieszaniny nie wykazywały istotnego efektu cytotoksycznego względem białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP (ryc. 4.11). W załączniku A w tabeli 11 przedstawiono inhibicję fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. W przypadku CIS i 5-FU i ich mieszanin z CIT i D-CIT wykryto wyższą cytotoksyczność w ŚO i ŚS niż w MH. Porównując do kontroli, inkubacja hodowli bakterii z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała inhibicję fluorescencji GFP wynoszącą 8,4% w MH, 10,6% w ŚS oraz 12,3% w ŚO. Z kolei badany w tym samym stężeniu 5-FU oddziaływał w mniejszym stopniu na białko GFP, prowadząc do inhibicji jego fluorescencji do 2,3% w MH i 6% w ŚS i ŚO. Mieszaniny CIT w stężeniach 0,01; 0,1; 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz CIT w stężeniach 0,01; 0,1; 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ nie wywoływały istotnego wzrostu inhibicji fluorescencji GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP w MH, ŚS oraz ŚO, w porównaniu z sumarycznym efektem cytotoksyczności ich odpowiednich składników. W porównaniu z kontrolą mieszaniny CIT w stężeniach 0,01; 0,1; 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywoływały inhibicję fluorescencji białka GFP z maksymalnymi wartościami 8,8% w MH, 11,3% w ŚS oraz 13,8% w ŚO i dla najwyższego stężenia CIT 1 mg/dm³ w mieszaninie. Natomiast ekspozycja *E. coli* MM294-GFP na mieszaniny CIT w stężeniach 0,01; 0,1; 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ oddziaływała w mniej intensywnym stopniu na fluorescencję białka GFP. Mieszanina D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO) nie wpływała w istotnym stopniu na białko GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP. Z kolei mieszanina D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała silniejszy efekt cytotoksyczny, prowadzący do inhibicji fluorescencji białka GFP wynoszącej 8,8% w MH, 9,2% w ŚS oraz 9,6% w ŚO.

Niezależnie od badanego środowiska w przypadku obu mieszanin metabolitu – D-CIT z lekami antynowotworowymi CIT i 5-FU – wykryto odmienne mechanizmy ich cytotoksyczności w hodowli *E. coli* MM294-GFP. W mieszaninie D-CIT z CIS

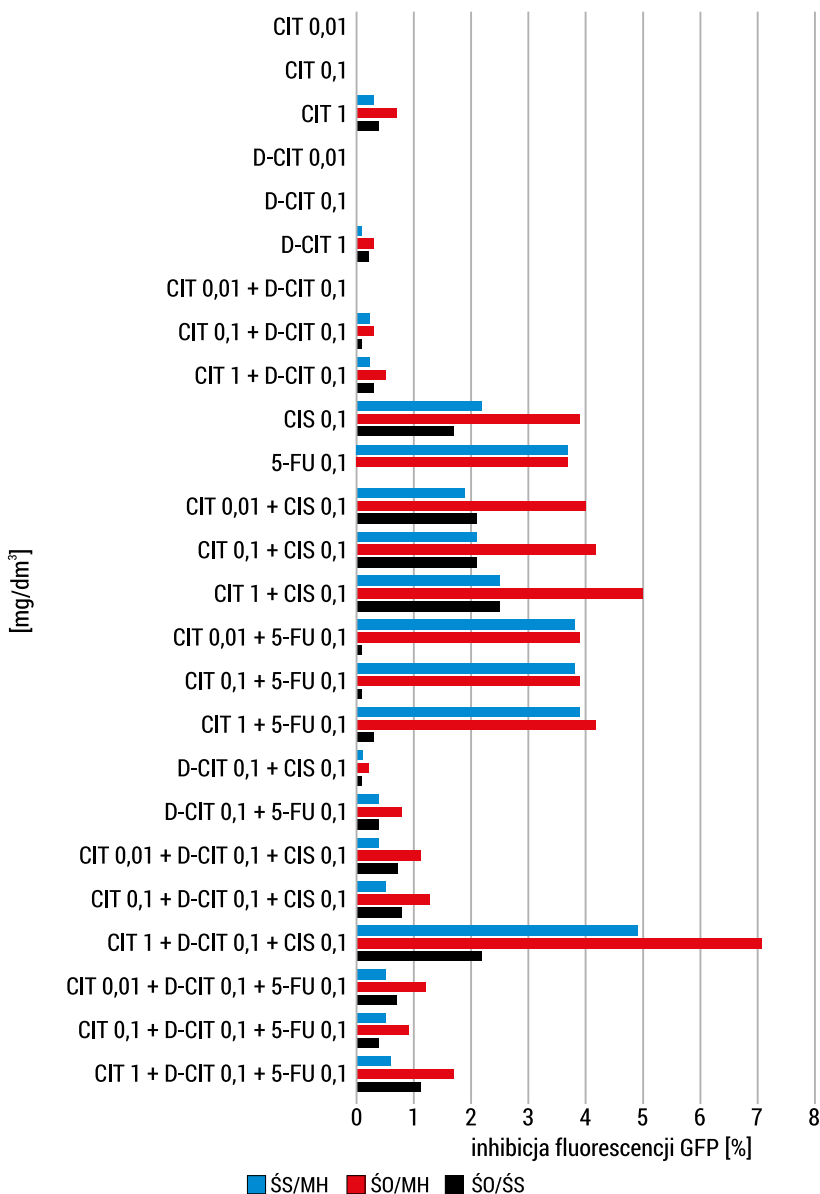


RYC. 4.11. Różnice w inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń. **Objaśnienia:** CIT 0,01 – CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, D-CIT 0,01 – D-CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, CIT 0,01 + CIS 0,1 – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1 – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

stwierdzono efekt antagonistycznego działania jej składników. A w mieszaninie D-CIT z 5-FU po dodaniu do metabolitu leku antynowotworowego wykryto potencjację cytotoksyczności metabolitu D-CIT. W porównaniu z kontrolą najsilniejszym efektem cytotoksycznym w hodowli *E. coli* MM294-GFP odznaczała się mieszanina CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, która wywołała wyższą o 12,3% w MH, o 17,2% w ŚS oraz o 19,4% w ŚO inhibicję fluorescencji białka GFP. Dla mieszanin CIT w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ uzyskano w trzech badanych środowiskach niższe wartości inhibicji fluorescencji białka GFP. Mieszaniny CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ w znacznie mniejszym stopniu oddziaływały na białko GFP, wywołując inhibicję jego fluorescencji maksymalnie do 7,3% w ŚO. W mieszaninach CIT z D-CIT i z CIS oraz CIT z D-CIT i z 5-FU dominującymi mechanizmami cytotoksyczności w ŚS oraz ŚO były antagonizm i potencjacja w MH, ŚS oraz ŚO. Wskazuje to na możliwość oddziaływania badanego środowiska na mechanizm cytotoksyczności składników mieszanin. Ponadto antagonistyczne działanie ich składników zaobserwowano głównie w mieszaninach z niższym stężeniem CIT – 0,01 i 0,1 mg/dm³. Potencjację cytotoksyczności wykryto natomiast niezależnie od stężenia badanego leku i badanego środowiska.

W załączniku B w tabelach 24–26 przedstawiono wyniki analizy statystycznej wartości inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH, ŚS oraz ŚO. Na podstawie uzyskanych wyników analizy w trzech badanych środowiskach stwierdzono istotne statystycznie różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP pomiędzy CIT i D-CIT a CIS, pomiędzy CIS a 5-FU, pomiędzy mieszaninami CIT z D-CIT, CIT z CIS, CIT z 5-FU, D-CIT z CIS, D-CIT z 5-FU, CIT z D-CIT i z CIS a mieszaninami CIT i D-CIT zawierającymi CIS i 5-FU. Ponadto takie różnice wykryto między mieszaninami D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH); CIT 1 mg/dm³ z D-CIT 0,1 mg/dm³ oraz z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO); CIT 1 mg/dm³ z D-CIT 0,1 mg/dm³ oraz z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH) a ich pojedynczymi składnikami. Więcej istotnych statystycznie różnic wykryto w MH, mniej w ŚŚ i ŚO. Nie stwierdzono ich natomiast w wartościach inhibicji fluorescencji GFP w *E. coli* MM294-GFP pomiędzy hipotetycznymi mieszaninami a ich pojedynczymi składnikami.

Analiza podobieństw działania CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na fluorescencję białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP wykryła w trzech badanych środowiskach dwa skupienia charakteryzujące się podobnymi wartościami inhibicji fluorescencji białka GFP. W MH w skupieniu pierwszym znajdowały się leki, metabolity oraz mieszaniny dwu- i trójskładnikowe, w drugim zaś zauważono brak metabolitów i dominację mieszanin zawierających w swoim składzie CIS (załącznik C, ryc. 16–18). W ŚS oraz ŚO w pierwszym skupieniu nie wykryto mieszanin trójskładnikowych, nie stwierdzono też mieszanin z 5-FU. W drugim skupieniu wykazano brak metabolitu. Uzyskane wyniki wskazują, że środowisko prowadzonych badań MH w porównaniu z ŚS i ŚO miało wpływ na wartości inhibicji fluorescencji



RYC. 4.12. Różnice w inhibicji fluorescencji GFP w *E. coli* MM294 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. **Objaśnienia:** ŚS/MH – różnice w wartościach inhibicji fluorescencji pomiędzy ŚS a MH, ŚO/MH – różnice w wartościach inhibicji fluorescencji pomiędzy ŚO a MH, ŚO/ŚS – różnice w wartościach inhibicji fluorescencji pomiędzy ŚO a ŚS. **CIT 0,01** – CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, **D-CIT 0,01** – D-CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, **CIT 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **CIT 0,01 + DCIT 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

białka GFP w *E. coli* MM294 poddanej działaniu badanych leków, metabolitów oraz ich mieszanin. Wykryto również, że w ŚS i ŚO obecność w mieszaninach 5-FU oddziaływała na zróżnicowanie wartości inhibicji fluorescencji GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP.

W załączniku A w tabeli 12 przedstawiono różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Po inkubacji hodowli *E. coli* MM294-GFP z CIT w stężeniu 1 mg/dm³ zaobserwowano bardzo niewielkie różnice, zawierające się w granicach błędów w inhibicji fluorescencji białka GFP między ŚO a MH (0,7%), między ŚS a MH (0,3%) oraz między ŚO a ŚS (0,4%) [ryc. 4.12].

W przypadku niższego badanego stężenia CIT 0,01 i 0,1 mg/dm³ nie stwierdzono różnic w wartościach parametru inhibicji fluorescencji białka GFP pomiędzy badanymi środowiskami. Podobne wartości tych różnic uzyskano po ekspozycji hodowli bakterii na D-CIT w stężeniu 1 mg/dm³. Również nieznaczne wartości różnic pomiędzy ŚS a MH, ŚO a MH oraz pomiędzy ŚO a ŚS zaobserwowano po 24-godzinnej inkubacji *E. coli* MM294-GFP z mieszaninami CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³. Niewielki wzrost, maksymalnie do 3,9% pomiędzy ŚO a MH w wartościach różnic w inhibicji fluorescencji białka GFP, wykryto po ekspozycji *E. coli* MM294-GFP na CIS. Wartości różnic między ŚS a MH i ŚO a MH w inhibicji fluorescencji GFP utrzymywały się na podobnym poziomie również po inkubacji szczepu *E. coli* MM294-GFP z 5-FU. Dla 5-FU pomiędzy ŚS a ŚO nie stwierdzono różnic w intensywności fluorescencji GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP.

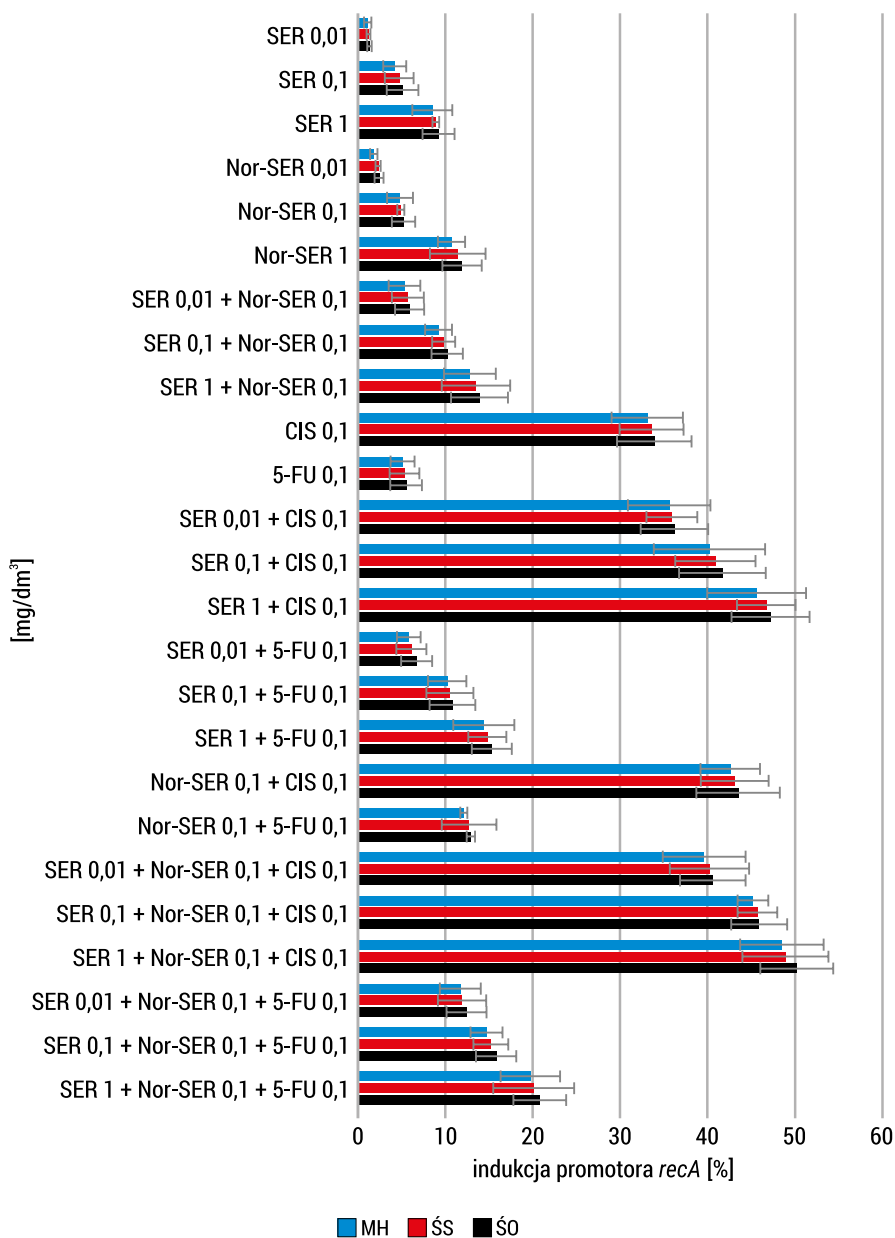
Nieznaczny wzrost wartości różnic inhibicji fluorescencji GFP zauważono po inkubacji *E. coli* MM294-GFP z mieszaninami CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ do 2,5% pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), do 5% pomiędzy ŚO a MH (ŚO/MH) oraz do 2,5% pomiędzy ŚS a ŚO (ŚS/ŚO). Z kolei ekspozycja *E. coli* MM294-GFP na mieszaniny CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała pojawienie się różnic w inhibicji fluorescencji GFP z maksymalną wartością 4,2% między ŚO a MH. Inkubacja *E. coli* MM294-GFP z mieszaninami metabolitu D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ doprowadziła do pojawienia się nieznacznych różnic w inhibicji fluorescencji GFP pomiędzy ŚS a MH, ŚO a MH i ŚS a ŚO. Mieszaniny metabolitu D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołały nieznaczne różnice (maksymalnie do 0,8%) w inhibicji fluorescencji GFP pomiędzy ŚS a MH, ŚO a MH i ŚS a ŚO. Oddziaływanie mieszanin CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ na hodowlę *E. coli* MM294-GFP doprowadziło do wzrostu wartości różnic w inhibicji fluorescencji GFP między ŚS a MH, ŚO a MH i ŚS a ŚO z maksymalną wartością do 7,1% między ŚO a MH i dla stężenia 1 mg/dm³ CIT. Z kolei po inkubacji *E. coli* MM294-GFP z mieszaninami CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ zaobserwowano maksymalne wartości różnic 1,7% pomiędzy ŚO a MH w inhibicji fluorescencji GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP. Przeprowadzone

badania wykazały, że dla CIT, D-CIT, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin maksymalne wartości różnic pomiędzy analizowanymi środowiskami w inhibicji fluorescencji białka GFP wynosiły około 5%.

4.3. Genotoksyczność substancji czynnych leków antydepresyjnych i antynowotworowych, ich metabolitów oraz ich mieszanin

W porównaniu z kontrolą trzygodzinna ekspozycja bakterii na SER stosowaną w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ spowodowała wzrost indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* w MH, ŚS oraz ŚO z maksymalną wartością do 9,2% w ŚO, dla najwyższego badanego stężenia 1 mg/dm³ SER (ryc. 4.13). W załączniku A w tabeli 13 przedstawiono indukcję promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Porównywalne do SER poziomy indukcji promotora *recA* uzyskano po inkubacji szczepu *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* z metabolitem Nor-SER, gdzie w jego najwyższym stężeniu – 1 mg/dm³ uzyskano maksymalne wzbudzenie promotora *recA* do 11,9% w ŚO. W mieszaninach SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ dominującymi mechanizmami genotoksyczności w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* były addytywność oraz antagonistyczne działanie składników mieszanin.

W porównaniu z kontrolą maksymalne wartości indukcji promotora *recA* uzyskano w mieszaninie SER w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i wynosiły one 12,8% w MH, 13,5% w ŚS i 13,9% w ŚO. Wzrost indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* do wartości 33,1% w MH, 33,6% w ŚS oraz 33,9% w ŚO uzyskano po ekspozycji hodowli na CIS. Z kolei w przypadku 5-FU indukcja promotora *recA* była znacznie niższa, z maksymalną wartością 5,5% w ŚO. Efekt synergistycznego działania składników zaobserwowano w mieszaninach SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. W ich przypadku najwyższy poziom indukcji promotora *recA* – do 45,6% w MH, 46,7% w ŚS oraz 47,2% w ŚO w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* – uzyskano w mieszaninie zawierającej SER w stężeniu 1 mg/dm³. Mieszaniny SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ w znacznie mniejszym stopniu w porównaniu z mieszaninami SER z CIS oddziaływały na poziom indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. W mieszaninach tych w trzech badanych środowiskach wykryto zarówno addytywność, jak i antagonistyczne i synergistyczne działanie składników mieszanin.



RYC. 4.13. Różnice w wartościach indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* po inkubacji z SER i Nor-SER, ich mieszaninami oraz mieszaninami z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń. **Objaśnienia:** **SER 0,01** – SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, **Nor-SER 0,01** – Nor-SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, **SER 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

Porównując do kontroli, mieszanina metabolitu Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ doprowadziła do indukcji promotora *recA* wyższej o 42,6% w MH, o 43,1% w ŚS oraz o 43,5% w ŚO. W mieszaninie Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ otrzymano znacznie niższe wartości indukcji promotora *recA* w porównaniu z mieszaniną Nor-SER z CIS. W obu przypadkach w trzech badanych środowiskach zaobserwowano efekt synergistycznego działania składników mieszanin. Najwyższe wartości wzrostu indukcji promotora *recA* wykryto po ekspozycji hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* na mieszaniny SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ w MH, ŚS oraz ŚO, ponadto zaobserwowano synergistyczne działanie składników tych mieszanin w szczepie *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. W mieszaninie SER w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ indukcja promotora *recA* osiągnęła wartości 48,5% w MH, 48,9% w ŚS oraz 50,2% w ŚO. W porównaniu z mieszaninami SER z Nor-SER i z CIS niższe wartości indukcji promotora *recA* wykryto po inkubacji hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* z mieszaninami SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³. Biorąc pod uwagę mechanizm genotoksyczności, w mieszaninach tych wykryto zarówno addytywność, jak i synergistyczne działanie ich składników. W przeprowadzonych badaniach w mieszaninach dwu- i trójskładnikowych zauważono zależność, że dodanie do SER oraz mieszanin SER z Nor-SER leku antynowotworowego CIS wzmacniało ich genotoksyczność. Biorąc pod uwagę mechanizmy genotoksyczności mieszanin zawierających SER i Nor-SER, dominującym wariantem było synergistyczne działanie składników mieszanin.

Wzmocnienie genotoksyczności w mieszaninach w porównaniu z sumarycznym efektem genotoksyczności pojedynczych składników mieszanin stwierdzono w następujących przypadkach:

- SER w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO),
- SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH),
- SER 1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO),
- Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO),
- Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO),
- SER 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO),
- SER 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (MH, ŚS, ŚO).

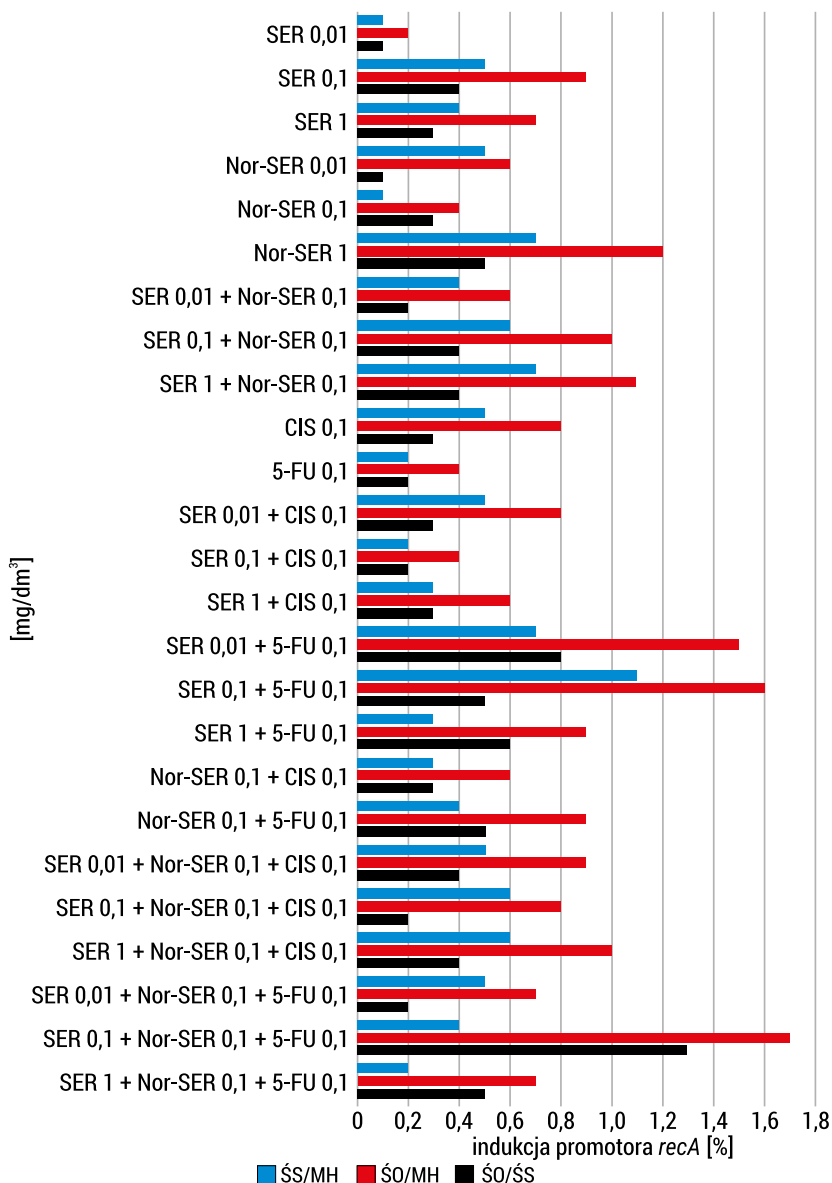
W załączniku B w tabelach 9–11 oraz 36–38 przedstawiono wyniki analizy statystycznej wartości indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH, ŚS oraz ŚO. Na podstawie przeprowadzonej analizy zaobserwowano w trzech badanych środowiskach istotne statystycznie różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy różnymi stężeniami SER, Nor-SER, między SER, Nor-SER i ich mieszaninami a CIS, pomiędzy CIS a 5-FU, między mieszaninami SER z CIS, SER z 5-FU, Nor-SER z CIS, Nor-SER z 5-FU, SER z Nor-SER i z CIS a mieszaninami SER i Nor-SER zawierającymi CIS i 5-FU. Nie wykryto natomiast takich różnic pomiędzy badanymi

mieszaninami a ich pojedynczymi składnikami w trzech badanych środowiskach. Z kolei w mieszaninach hipotetycznych powstałych w wyniku zsumowania wartości indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 ich pojedynczych składników zaobserwowano w trzech badanych środowiskach istotne statystycznie różnice pomiędzy mieszaninami a ich pojedynczymi składnikami (załącznik B, tabele 36–38). Niezależnie od badanego środowiska stwierdzono istotne statystycznie różnice w wartościach indukcji promotora *recA* między mieszaninami hipotetycznymi SER w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³; SER 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³; SER 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ a ich pojedynczymi składnikami.

W załączniku C na ryc. 19–21 przedstawiono analizę podobieństwa działania SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na indukcję promotora *recA* w MH, ŚS oraz ŚO. Niezależnie od badanego środowiska wyodrębniono dwa skupienia, które charakteryzowały się podobieństwem wartości indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. W pierwszym skupieniu znajdowały się leki, metabolity oraz mieszaniny dwu- i trójskładnikowe, nie było mieszanin mających w swoim składzie CIS. W drugim skupieniu wykryto głównie mieszaniny zawierające CIS. Na tej podstawie stwierdzono, że niezależnie od rodzaju środowiska badań (MH, ŚS, ŚO) dodatek w mieszaninach CIS miał wpływ na zróżnicowanie wartości indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*.

W załączniku A w tabeli 14 przedstawiono różnice w wartościach indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS), po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Uzyskane w eksperymencie wyniki tych różnic pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) były niższe od 2% (ryc. 4.14).

Przeprowadzone badania wykazały, że w porównaniu z kontrolą FLU stosowana w stężeniu 1 mg/dm³ wpływała na poziom indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* w MH, ŚS oraz ŚO. W załączniku A w tabeli 15 przedstawiono wartości indukcji tego promotora po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Maksymalne jego wartości w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* inkubowanej z FLU w stężeniu 1 mg/dm³ wynosiły 4,5% w MH, 4,7% w ŚS oraz 4,9% w ŚO (ryc. 4.15). W niższych badanych stężeniach FLU 0,01; 0,1 mg/dm³ nie wykryto zmian w poziomie indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* w trzech badanych środowiskach. Trzygodzinna inkubacja bakterii z metabolitem Nor-FLU w stężeniu 1 mg/dm³ wywołała indukcję promotora *recA* w MH, ŚS oraz ŚO z maksymalną wartością 6,9% w ŚO. Dla niższego stężenia Nor-FLU 0,1 mg/dm³ indukcja ta osiągnęła wartość 1,7% w ŚO. W najniższym, badanym stężeniu Nor-FLU 0,01 mg/dm³ nie wykryto zmian w poziomie indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. Stwierdzono, że w trzech środowiskach FLU i Nor-FLU badane w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ wykazują podobieństwo działania na indukcję promotora *recA*. W mieszaninach FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ niezależnie od badanego środowiska

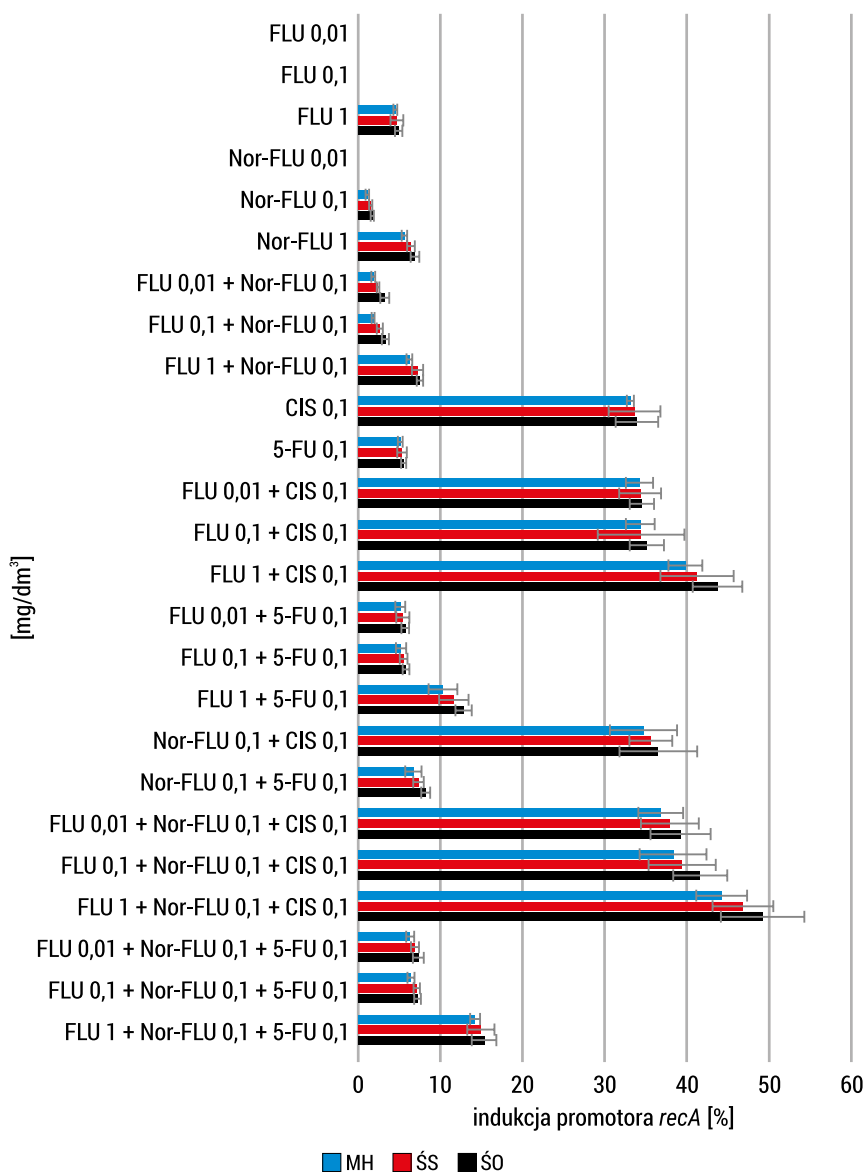


RYC. 4.14. Różnice w wartościach indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) i po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. **Objaśnienia:** ŚS/MH – różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚS a MH, ŚO/MH – różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚO a MH, ŚO/ŚS – różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚO a ŚS. **SER 0,01** – SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, **Nor-SER 0,01** – Nor-SER w stężeniu 0,01 mg/dm³, **SER 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina SER w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

zaobserwowano potencjację genotoksyczności FLU pod wpływem dodania metabolitu Nor-FLU. Z kolei w mieszaninie FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wykryto efekt synergistycznego działania jej składników.

W porównaniu z kontrolą najintensywniej na promotor *recA* działała mieszanina FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³, która wywołała jego indukcję wynoszącą 6,2% w MH, 7,2% w ŚS oraz 7,5% w ŚO. Wzrost indukcji promotora *recA* do wartości powyżej 30% w MH, ŚS oraz ŚO wykryto po ekspozycji hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* na CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. W przypadku inkubacji testowej hodowli bakterii z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ uzyskano znacznie niższe (około 5%) wartości indukcji promotora *recA* w trzech badanych środowiskach. W mieszaninach z CIS najwyższe wartości genotoksyczności zaobserwowano w ŚO, niższe w ŚS i najniższe w MH. Pośród mieszanin FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, porównując do kontroli, najsilniejszym działaniem na promotor *recA* odznaczała się mieszanina z najwyższym stężeniem FLU 1 mg/dm³, która doprowadziła do indukcji promotora *recA* do 39,8% w MH, 41,2% w ŚS oraz do 43,7% w ŚO. W mieszaninach tych dodanie do FLU leku antynowotworowego CIS wywołało efekt potencjacji genotoksyczności FLU oraz antagonistycznego i synergistycznego działania składników mieszanin. W mieszaninach FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wartości indukcji promotora *recA* były znacznie niższe.

Biorąc pod uwagę mechanizmy genotoksyczności, w przypadku tych mieszanin w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO) zaobserwowano efekt addytywności oraz synergistycznego działania składników mieszanin. Po ekspozycji testowej hodowli bakterii na mieszaniny Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ i Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ w MH, ŚS oraz ŚO wykryto – po dodaniu do metabolitu Nor-FLU, CIS lub 5-FU – efekt addytywności i synergistycznego działania składników mieszanin. Najwyższe wartości indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* zauważono w mieszaninie Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ i wynosiły one w trzech badanych środowiskach ponad 34%. Pośród badanych mieszanin najwyższe poziomy indukcji promotora *recA* otrzymano w mieszaninie FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ i osiągnęły one wartości 44,2% w MH, 46,8% w ŚS oraz 49,2% w ŚO. W przypadku pozostałych mieszanin FLU w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ wykryto również wysoką indukcję tego promotora, która wynosiła ponad 36% w MH, ponad 37% w ŚS oraz ponad 39% w ŚO. Dla mieszanin tych pod wpływem dodania CIS wykryto potencjację ich genotoksyczności. Z kolei w mieszaninie FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ wykryto efekt synergistycznego działania ich składników. Niższe wartości indukcji promotora *recA* zanotowano w mieszaninach FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³, dla których głównymi mechanizmami genotoksyczności były addytywność oraz synergistyczne działanie ich składników. W przeprowadzonych



RYC. 4.15. Różnice w wartościach indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* po inkubacji z FLU, Nor-FLU, ich mieszaninami oraz mieszaninami z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń. **Objaśnienia:** FLU 0,01 – FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, **Nor-FLU 0,01** – Nor-FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, **FLU 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

badaniach w mieszaninach zarówno dwu-, jak i trójskładnikowych zaobserwowano, że niezależnie od badanego środowiska dodanie do FLU w stężeniu 1 mg/dm³ i do mieszaniny FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ leków antynowotworowych CIS i 5-FU wzmacniało ich genotoksyczność w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. Dodanie zaś do FLU w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/dm³ i do mieszanin FLU w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ leku antynowotworowego CIS w trzech badanych środowiskach prowadziło do potencjacji genotoksyczności.

Wzmocnienie genotoksyczności w mieszaninach w porównaniu z sumarycznym efektem genotoksyczności ich pojedynczych składników stwierdzono w następujących przypadkach:

- FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS oraz ŚO),
- FLU 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS oraz ŚO),
- FLU 1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS oraz ŚO),
- Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w ŚO),
- Nor-FLU 0,1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO),
- FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO),
- FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO).

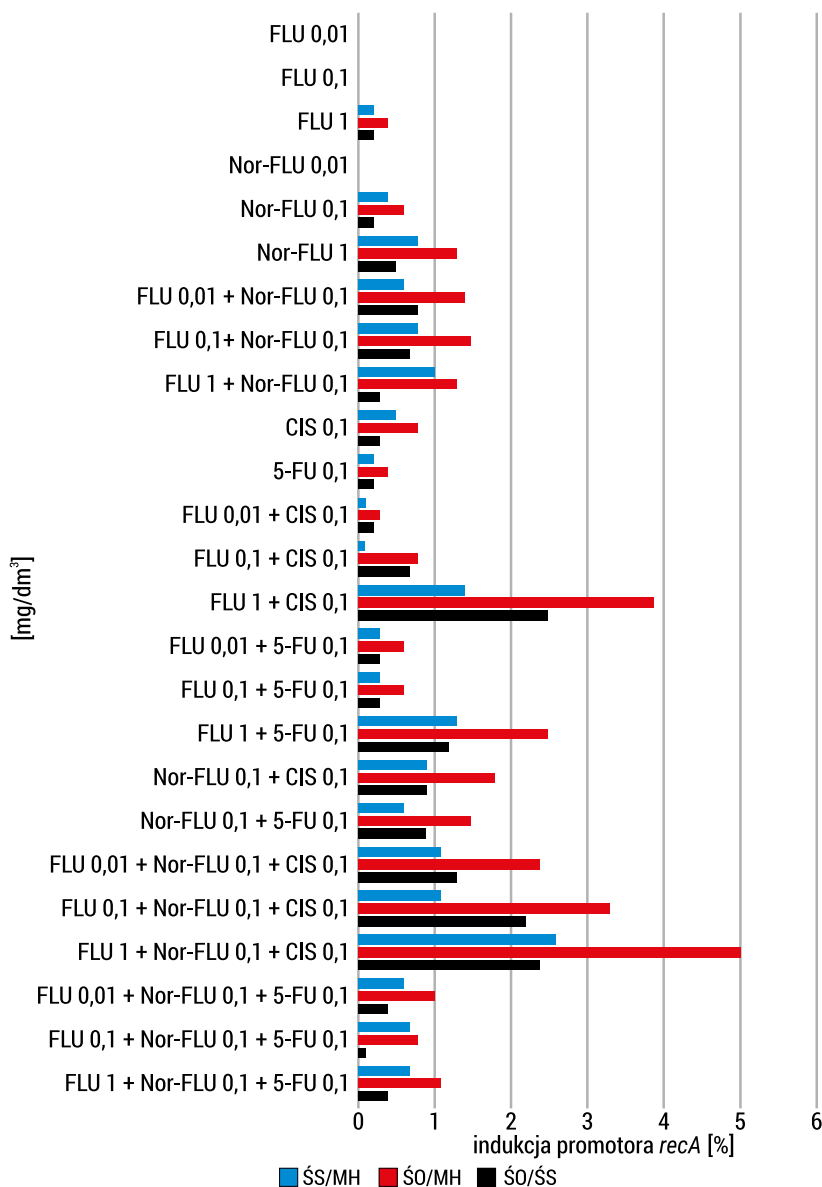
W załączniku B w tabelach 18–20 oraz 45–47 przedstawiono wyniki analizy statystycznej wartości indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH, ŚS oraz ŚO. Potwierdzono obecność w trzech badanych środowiskach istotnych statystycznie różnic w indukcji promotora *recA* pomiędzy FLU, Nor-FLU, mieszaninami FLU z Nor-FLU a CIS, pomiędzy CIS a 5-FU, pomiędzy mieszaninami FLU z CIS, FLU z 5-FU, Nor-FLU z CIS, Nor-FLU z 5-FU oraz FLU z Nor-FLU i z CIS a mieszaninami FLU i Nor-FLU zawierającymi CIS i 5-FU. Ponadto takie różnice w wartościach indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* wykryto pomiędzy mieszaninami FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS oraz ŚO) oraz FLU 1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ i z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH) a ich pojedynczymi składnikami. W mieszaninach hipotetycznych, niezależnie od badanego środowiska, wykazano istotne statystycznie różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy mieszaniną FLU 0,1 mg/dm³ z Nor-FLU 0,1 mg/dm³ a jej pojedynczymi składnikami (załącznik B, tabele 45–47).

Analiza podobieństwa działania FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na parametr indukcji promotora *recA* wykryła dwa główne skupienia, które charakteryzowały się podobnymi wartościami indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. W trzech badanych środowiskach w pierwszym skupieniu znajdowały się leki, metabolity oraz mieszaniny dwu- i trójskładnikowe zawierające w swoim składzie 5-FU. W drugim zaś skupieniu wykryto CIS oraz mieszaniny ją zawierające (załącznik C, ryc. 22–24). Na tej podstawie stwierdzono, że w trzech badanych środowiskach obecność w mieszaninach CIS miała wpływ na zróżnicowanie ich działania na indukcję promotora *recA*.

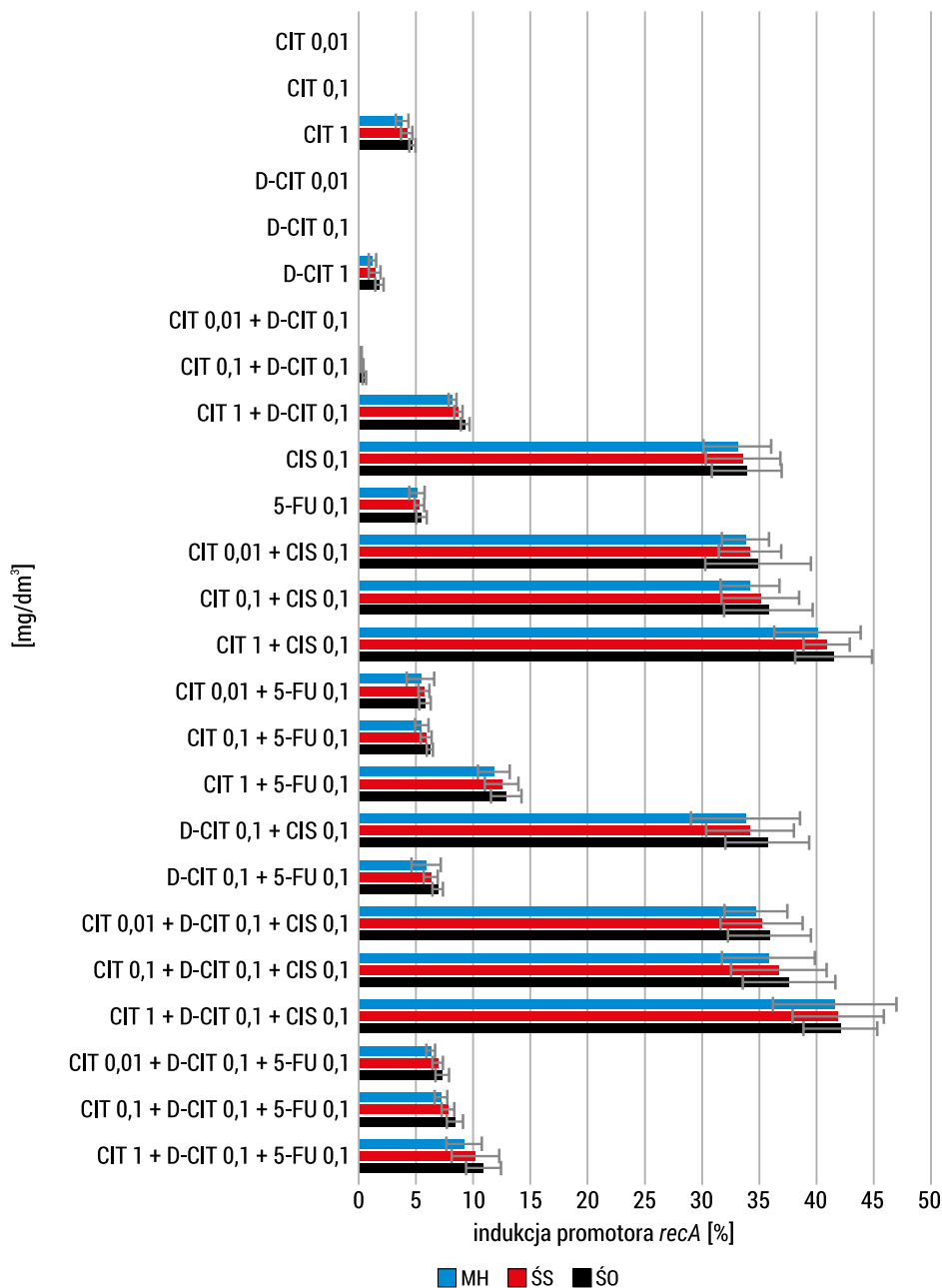
W załączniku A w tabeli 16 oraz na ryc. 4.16 przedstawiono różnice w wartościach indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Po ekspozycji badanej hodowli bakterii na FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ tylko w najwyższym stężeniu wykryto niewielkie różnice w indukcji promotora *recA* między ŚO a ŚS, ŚO a MH oraz ŚS a MH i wynosiły one odpowiednio 0,2; 0,4 i 0,2%. W niższych badanych stężeniach FLU – 0,01 i 0,1 mg/dm³ – nie stwierdzono różnic w indukcji promotora *recA* pomiędzy badanymi środowiskami MH, ŚS i ŚO.

Metabolit Nor-FLU w stężeniu 1 mg/dm³ wywołał niewielkie różnice do 1,3% w indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚO a MH. W najniższym badanym stężeniu Nor-FLU 0,01 mg/dm³ nie stwierdzono różnic w indukcji promotora *recA* pomiędzy MH, ŚS oraz ŚO. Podobne wartości różnic około 1,5% między ŚO/MH w indukcji promotora *recA* zauważono po inkubacji badanej hodowli bakterii z mieszaninami FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³. Różnice wynoszące poniżej 1% w indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* pomiędzy badanymi środowiskami (ŚO a MH, ŚS a MH oraz ŚO a ŚS) wykryto po inkubacji hodowli z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. Z kolei ekspozycja hodowli bakterii na 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ spowodowała pojawienie się różnic w indukcji promotora *recA* z maksymalną wartością 0,4% między ŚO a MH. Niewielki wzrost różnic w indukcji promotora *recA* – do 3,9% pomiędzy ŚO a MH – zauważono po ekspozycji *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* z mieszaninami FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. Inkubacja testowej hodowli bakterii z mieszaninami FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ doprowadziła do pojawienia się różnic w indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚO a MH wynoszących 2,5%.

Również nieznaczne różnice pomiędzy badanymi środowiskami w indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* zauważono po inkubacji bakterii z mieszaninami Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z mieszaninami Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³. Podwyższenie wartości różnic w indukcji promotora *recA* wykryto po ekspozycji testowej hodowli bakterii na mieszaniny FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ do 2,6% pomiędzy ŚS a MH, do 5% pomiędzy ŚO a MH oraz do 2,4% pomiędzy ŚO a ŚS. Inkubacja *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* z mieszaninami FLU w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała różnice w indukcji promotora *recA* z maksymalną wartością 1,1% pomiędzy ŚO a MH. Otrzymane wyniki wykazały, że największą różnicę w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy badanymi środowiskami w testowej hodowli bakterii wykryto po jej inkubacji z mieszaniną FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ i wynosiła ona 5%.



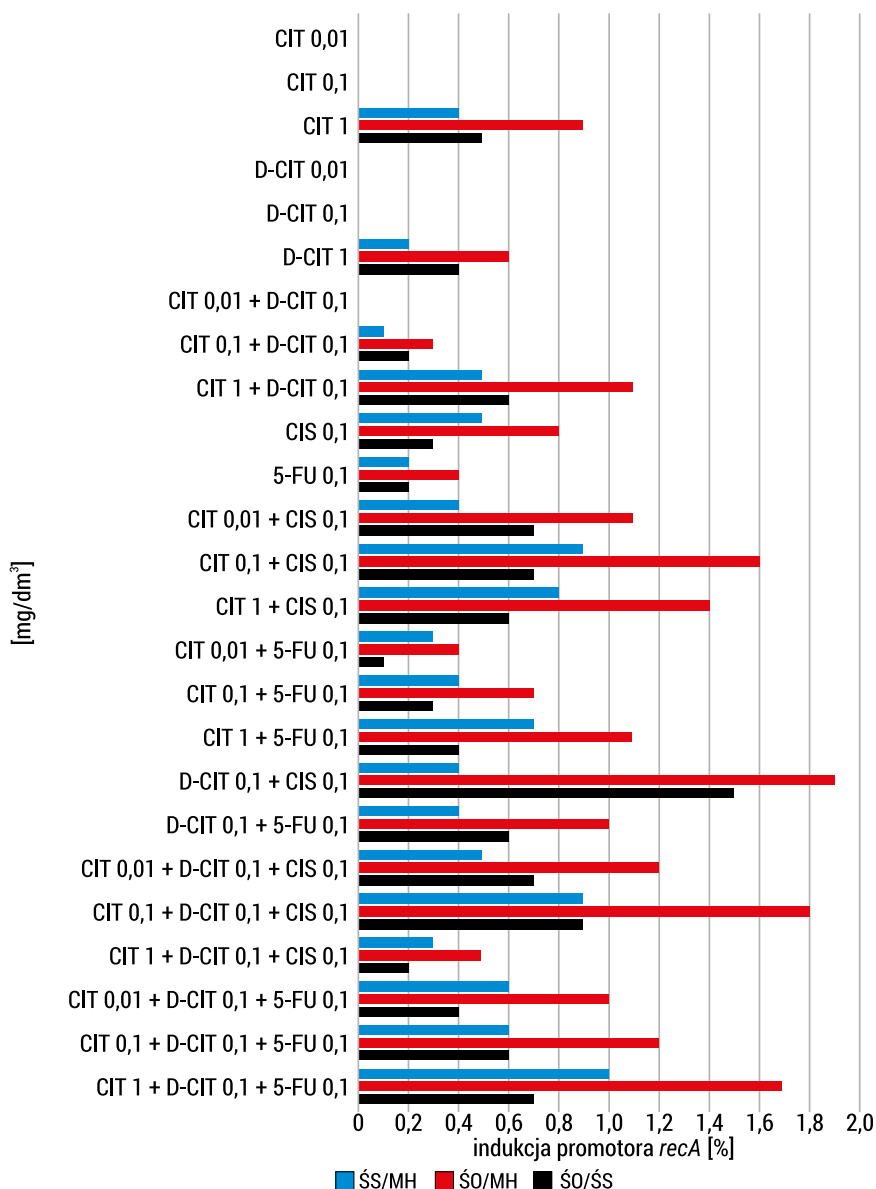
RYC. 4.16. Różnice w wartościach indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:lucDABE* pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. **Objaśnienia:** ŚS/MH – różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚS a MH, ŚO/MH – różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚO a MH, ŚO/ŚS – różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚO a ŚS. **FLU 0,01** – FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, **Nor-FLU 0,01** – Nor-FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³, **FLU 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina FLU w stężeniu 0,01 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³



RYC. 4.17. Różnice w wartościach indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* po inkubacji z CIT i D-CIT, ich mieszaninami oraz mieszaninami z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń. **Objaśnienia:** CIT 0,01 – CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, D-CIT 0,01 – D-CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, CIT 0,01 + CIS 0,1 – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1 – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

W załączniku A w tabeli 17 przedstawiono wartości indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. W porównaniu z kontrolą ekspozycja bakterii na CIT w stężeniu 1 mg/dm³ doprowadziła do indukcji promotora *recA* wyższej o 3,8% w MH, 4,2% w ŚS oraz 4,7% w ŚO (ryc. 4.17). W niższym badanym stężeniu CIT i D-CIT 0,01 i 0,1 mg/dm³ nie wykryto oddziaływania leku i metabolitu na promotor *recA*. Wartości jego indukcji w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* dla najwyższego badanego stężenia metabolitu D-CIT wynosiły maksymalnie 1,8% w ŚO. Inkubacja testowego szczepu bakterii z mieszaninami CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała indukcję promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* do wartości 8,2% w MH, 8,7% w ŚS i 9,3% w ŚO. Dla mieszaniny tej w trzech badanych środowiskach wykryto potencjację genotoksyczności D-CIT pod wpływem dodania CIT. Wzrost indukcji promotora *recA* do 33,9% w ŚO stwierdzono po ekspozycji badanej hodowli bakteryjnej na CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ i do 5,5% w ŚO po ekspozycji na 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³. Pośród mieszanin CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ najintensywniej na promotor *recA* działała mieszanina zawierająca CIT w stężeniu 1 mg/dm³, która doprowadziła do jego indukcji do 40,1% w MH, 40,9% w ŚS i do 41,5% w ŚO. Z kolei inkubacja hodowli bakteryjnej z mieszaninami CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała niższe w porównaniu z mieszaninami CIT z CIS wartości indukcji promotora *recA*, maksymalnie do 12,9% w ŚO.

W przypadku powyższych mieszanin wykryto, że niezależnie od badanego środowiska głównymi mechanizmami genotoksyczności były addytywność, potencjacja oraz synergistyczne działanie składników mieszanin. Zauważono, że dodanie do CIT w stężeniu 1 mg/dm³ leku antynowotworowego CIS lub 5-FU wywoływało synergistyczne oddziaływanie obu składników mieszanin i wzrost ich genotoksyczności. Oddziaływanie na hodowlę *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* mieszaniną D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ spowodowało indukcję promotora *recA* do wartości powyżej 33% w MH, ŚS oraz ŚO. W przypadku zaś mieszaniny D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wartości indukcji promotora *recA* były znacznie niższe. W obu mieszaninach głównym mechanizmem działania była potencjacja genotoksyczności D-CIT pod wpływem dodania CIT lub 5-FU. Spośród mieszanin CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ najintensywniej na promotor *recA* oddziaływała mieszanina zawierająca najwyższe stężenie CIT 1 mg/dm³, która wywołała jego indukcję do wartości ponad 40% w MH, ŚS oraz ŚO. Mieszaniny CIT w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ z podobną intensywnością oddziaływały na promotor *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. Ekspozycja hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* na mieszaniny CIT w stężeniach 0,01; 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz z 5-FU w stężeniu 0,1 mg/dm³ wywołała znacznie niższe wartości indukcji promotora *recA* w porównaniu z mieszaninami CIT z D-CIT i z CIS. Dla mieszanin tych, niezależnie od badanego środowiska (MH, ŚS, ŚO), głównymi mechanizmami działania była potencjacja genotoksyczności



RYC. 4.18. Różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. **Objaśnienia:** ŚS/MH – różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚS a MH, ŚO/MH – różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚO a MH, ŚO/ŚS – różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy ŚO a ŚS. **CIT 0,01** – CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, **D-CIT 0,01** – D-CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³, **CIT 0,01 + CIS 0,1** – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, **CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1** – mieszanina CIT w stężeniu 0,01 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³

mieszanin CIT w stężeniach 0,01 i 0,1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ pod wpływem dodania leków antynowotworowych CIS lub 5-FU. W przypadku zaś mieszaniny CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ dodanie CIS lub 5-FU wywoływało synergistyczne działanie ich składników. W przeprowadzonych badaniach niezależnie od testowanego środowiska w mieszaninach zawierających CIT i D-CIT dominowały głównie potencjacja genotoksyczności i synergistyczne działanie ich składników.

Wzmocnienie genotoksyczności w mieszaninach w porównaniu z sumarycznym efektem genotoksyczności ich pojedynczych składników stwierdzono w następujących przypadkach:

- CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO),
- CIT 1 mg/dm³ z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO),
- CIT 1 mg/dm³ z D-CIT 0,1 mg/dm³ oraz z CIS 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO),
- CIT 1 mg/dm³ z D-CIT 0,1 mg/dm³ oraz z 5-FU 0,1 mg/dm³ (w MH, ŚS, ŚO).

W załączniku B w tabelach 27–29 oraz 54–56 przedstawiono wyniki analizy statystycznej wartości indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH, ŚS oraz ŚO. Wykryto istotne statystycznie różnice w wartościach indukcji promotora *recA* pomiędzy CIT, D-CIT, 5-FU, mieszaninami CIT z D-CIT, CIT z 5-FU, D-CIT z 5-FU, CIT z D-CIT i z 5-FU a CIS. Zaobserwowano również istotne statystycznie różnice pomiędzy CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami a mieszaninami CIT i D-CIT zawierającymi w swoim składzie CIS i 5-FU. Niezależnie od badanego środowiska stwierdzono brak istotnych statystycznie różnic w wartościach indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* pomiędzy badanymi mieszaninami i mieszaninami hipotetycznymi a ich pojedynczymi składnikami.

Analiza podobieństwa działania CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin na parametr indukcji promotora *recA* wykryła dwa główne skupienia charakteryzujące się podobnymi wartościami indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. Bez względu na badane środowisko w pierwszym skupieniu znajdowały się leki, metabolity oraz mieszaniny dwu- i trójskładnikowe zawierające w swoim składzie 5-FU, nie zaobserwowano mieszanin z CIS. W drugim natomiast skupieniu wykryto obecność CIS oraz mieszanin z CIS (załącznik C, ryc. 25–27). Na tej podstawie stwierdzono, że obecność w mieszaninach CIS wpływała na zróżnicowanie wartości indukcji promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*.

W załączniku A w tabeli 18 przedstawiono różnice w wartościach indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Uzyskane w przeprowadzonych badaniach wyniki różnic w powyższych wartościach pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) były niższe od 2% (ryc. 4.18).

5. Dyskusja

Dynamiczny rozwój współczesnej medycyny oraz przemysłu farmaceutycznego skutkuje globalnym wzrostem zużycia farmaceutyków, które po przemianach metabolicznych w organizmach ludzkich i zwierzęcych zarówno w formie niezmienionej, jak i metabolitów systemami kanalizacyjnymi dostają się do oczyszczalni ścieków. Tam część z nich ulega rozkładowi przez drobnoustroje do CO_2 i H_2O lub jest sorbowana w osadzie ściekowym. Inne farmaceutyki, charakteryzujące się większą trwałością i polarnością, ulegną tylko częściowej eliminacji ze ścieków i stanowiąc niebezpieczne skażenie, zostaną odprowadzone do odbiornika wraz ze ściekami oczyszczonymi. Oczyszczalnie ścieków stanowią największy rezerwuar pozostałości farmaceutycznych odprowadzanych bezpośrednio do wód powierzchniowych (Kümmerer, 2009; Lonappan i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018). Jureczko i Kalka (2020) w swojej pracy przeglądowej dotyczącej zanieczyszczenia wód lekami antynowotworowymi podają, że do 2014 roku na całym świecie w glebach, morzach, jeziorach, rzekach i wodach podziemnych wykryto 631 farmaceutyków. Nie tylko farmaceutyki, lecz także produkty ich metabolizmu wprowadzone do środowiska oddziałują na organizmy wodne, zakłócając ich prawidłowe funkcjonowanie (Kümmerer, 2009; Lonappan i wsp., 2016; Mezzelani i wsp., 2018). Zanieczyszczenia farmaceutyczne stanowią problem w obszarze zaopatrzenia ludzi w wodę przeznaczoną do spożycia, ujmowaną ze źródeł podziemnych i powierzchniowych. Woda przeznaczona do konsumpcji jest również wykorzystywana w przemyśle spożywczym, w technologicznych procesach przetwórstwa żywności i wtedy staje się źródłem przedostawania się farmaceutyków do żywności (Bogdanowicz i Wąsowski, 2018).

Ze względu na globalny wzrost epizodów depresyjnych oraz schorzeń nowotworowych leki antydepresyjne (szczególnie z grupy SSRI) i antynowotworowe są coraz częściej wykrywane w matrycach środowiskowych (Mole i Brooks, 2019; Gornik i wsp., 2020; Shi i wsp., 2020). Również epidemia COVID-19 przyczyniła się do wzrostu spożycia leków antydepresyjnych (Deng i wsp., 2020; Rabeea i wsp., 2021). Obecnie dysponujemy niewielką wiedzą na temat potencjału ich oddziaływania na mikroorganizmy w ściekach oraz ich toksyczności w mieszaninach z lekami antynowotworowymi (Kümmerer, 2009; Lonappan i wsp., 2016). W związku z powyższym w prezentowanej pracy określono toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność wybranych leków antydepresyjnych – SER, FLU i CIT, ich metabolitów – Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT, ich mieszanin oraz mieszanin z lekami antynowotworowymi, CIS i 5-FU, w MH, ŚS oraz ŚO. Ponadto dokonano oceny wpływu ścieków surowych

i oczyszczonych na toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność wyżej wymienionych leków antydepresyjnych, ich metabolitów, mieszanin oraz mieszanin z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU.

W prezentowanych w tej monografii badaniach własnych wykazano, że zarówno leki antydepresyjne SER, FLU i CIT, ich metabolity Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT, ich mieszaniny, jak i mieszaniny z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU z różną intensywnością oddziaływały na żywotność bakterii *E. coli* K-12 we wszystkich trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO). W literaturze naukowej brakuje badań dotyczących aktywności toksycznej i genotoksycznej leków antydepresyjnych i leków antynowotworowych oraz ich mieszanin w ŚS i ŚO. Dlatego też w niniejszej dyskusji otrzymane w badaniach własnych wyniki odniesiono do rezultatów analiz prowadzonych w laboratoryjnych mediach hodowlanych, a także do innych niż *E. coli* gatunków drobnoustrojów. W pracach Bohnert i wsp. (2011) oraz Ayaz i wsp. (2015) udokumentowano przeciwdrobnoustrojową aktywność leków należących do grupy SSRIs, głównie SER i FLU, względem niektórych Gram-dodatnich bakterii. Leki te wykazywały również aktywność przeciwko innym drobnoustrojom, jak *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Campylobacter jejuni* i *Acinetobacter*, niektórym drobnoustrojom należącym do *Staphylococci* i *Enterococci* oraz beztlenowcom z gatunku *Bacteroides fragilis*.

W przedstawianych w tej monografii badaniach zauważono, że pośród analizowanych mieszanin z SER najintensywniejszym działaniem na żywotność hodowli *E. coli* K-12 w MH, ŚS oraz ŚO odznaczały się mieszaniny SER w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER (0,1 mg/dm³) i z CIS (0,1 mg/dm³) oraz SER (1 mg/dm³) z Nor-SER (0,1 mg/dm³) i z 5-FU (0,1 mg/dm³). Stwierdzono też, że w trzech środowiskach (MH, ŚS, ŚO) w większości z badanych mieszanin SER i Nor-SER z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU zaobserwowano wyższą toksyczność w porównaniu z sumaryczną toksycznością poszczególnych składników mieszanin.

W piśmiennictwie naukowym brak jest badań dotyczących toksyczności mieszanin leków antydepresyjnych z antynowotworowymi w ściekach. Dlatego też otrzymane w badaniach własnych rezultaty porównano z wynikami badań prowadzonych w mediach hodowlanych i dotyczących toksyczności mieszanin leków antydepresyjnych z innymi lekami, np. antybiotykami.

We wcześniejszych pracach prowadzonych przez Muñoz-Bellido i wsp. (2000) oraz Bohnert i wsp. (2011) autorzy odkryli toksyczne oddziaływanie leków z grupy SSRIs w mieszaninach z antybiotykami i w stosunku do *Corynebacterium urealyticum*. W przypadku SER zauważono jej toksyczne działanie w połączeniu z tetracyklinami i fluorochinolonami (Muñoz-Bellido i wsp., 2000; Bohnert i wsp., 2011). W kolejnej pracy Ayaz i wsp. (2015) badacze wykryli wysoką antymikrobiologiczną aktywność SER stosowanej w zakresie stężeń od 10 mg/dm³ do 100 mg/dm³ względem szczepów z kolekcji ATCC oraz klinicznych izolatów *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Sertralina wykazywała również znaczącą aktywność przeciwgrzybiczą względem *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* i *Fusarium solani*. Ponadto w mieszaninach z antybiotykami

(ciprofloksacyną, lewofloksacyną, norfloksacyną, moksifloksacyną oraz cefeksymem i gentamycyną) znacząco wzmacniała ich antybakteryjne działanie. W kolejnej pracy Krzyżek i wsp. (2019) udokumentowano również wysoką aktywność antybakteryjną SER względem różnych szczepów *Helicobacter pylori*. Dla szczepu *H. pylori* 7556 wartość najniższego stężenia SER całkowicie hamującego wzrost hodowli wynosiła 2 mg/dm³. Biorąc pod uwagę przeciwdrobnoustrojowy mechanizm działania SSRIs, uważa się, że leki te mogą działać jako inhibitory pompy wypływowej (ang. *efflux pump*) i ten mechanizm jest najprawdopodobniejszy w toksycznym działaniu SER przeciwko *Corynebacterium urealyticum* w mieszaninach z niektórymi antybiotykami, takimi jak tetracykliny i fluorochinolony (Bohnert i wsp., 2011).

Rezultaty badań własnych prezentowanych w tej monografii wykazały, że we wszystkich badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO) najwyższe wartości inhibicji żywotności *E. coli* K-12 wykryto w mieszaninach FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU (0,1 mg/dm³) oraz z CIS (0,1 mg/dm³) i FLU (1 mg/dm³) z CIS (0,1 mg/dm³). Stwierdzono też, że toksyczność mieszanin FLU (1 mg/dm³) z CIS (0,1 mg/dm³) w MH; Nor-FLU (0,1 mg/dm³) z CIS (0,1 mg/dm³) w MH; FLU (0,01; 0,1 i 1 mg/dm³) z Nor-FLU (0,1 mg/dm³) i z CIS (0,1 mg/dm³) w MH; FLU (0,01; 0,1 mg/dm³) z Nor-FLU (0,1 mg/dm³) i z CIS (0,1 mg/dm³) w MH była wyższa w stosunku do hodowli *E. coli* w porównaniu z sumarycznym efektem toksyczności pojedynczych składników mieszanin. Wykryto, że metabolit Nor-FLU w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ w trzech badanych środowiskach działał inhibitoryjnie na żywotność *E. coli* K-12. Podobnie w pracach De Sousa i wsp. (2018) autorzy stwierdzili przeciwbakteryjne działanie FLU wobec standardowych i wieloopornych szczepów bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Również w eksperymentach laboratoryjnych przeprowadzonych przez Foletto i wsp. (2020) wykryto znaczną aktywność przeciwdrobnoustrojową FLU względem szczepów *Acinetobacter baumannii* MDR i *Escherichia coli* ATCC 35218. De Sousa i wsp. (2018) udokumentowali także efekt wzmocnienia aktywności przeciwdrobnoustrojowej FLU w mieszaninach ze znanymi antybiotykami – erytromycyną, gentamycyną, imipenemem, norfloksacyną i tetracykliną. W przeprowadzonych badaniach autorzy wykryli znaczące działanie przeciwbakteryjne FLU względem testowych szczepów bakterii. Ponadto wykazali, że FLU w mieszaninach zmienia aktywność przeciwbakteryjną analizowanych antybiotyków (de Sousa i wsp., 2018).

Pośród trzech badanych w prezentowanej monografii leków, a mianowicie SER, FLU i CIT, to właśnie ten ostatni najsłabiej oddziaływał na żywotność *E. coli*. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa CIT względem drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobiomu przewodu pokarmowego człowieka została opisana w pracy McGovern i wsp. (2019). Jej autorzy w badaniach własnych wykryli, że najsilniejszym działaniem inhibitorowym w stosunku do żywotności hodowli *E. coli* odznaczały się mieszaniny CIT w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ z D-CIT w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ oraz CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. Zaobserwowano również, że w MH toksyczność mieszaniny CIT w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³ była wyższa w porównaniu z sumaryczną toksycznością

wszystkich składników mieszaniny. Podobne rezultaty otrzymali w pracy Ayaz i wsp. (2015), w której zbadano potencjał przeciwbakteryjny CIT oraz jego mieszanin z wybranymi antybiotykami względem klinicznych izolatów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. W badaniach tych udokumentowano, że CIT działał przeciwbakteryjnie względem *Salmonella typhi*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *Enterococcus faecalis*. Ponadto w połączeniu z antybiotykami wzmacniał ich aktywność przeciwbakteryjną.

Obecność leków należących do grupy SSRIs i ich metabolitów stwierdzono nie tylko w ściekach i wodach powierzchniowych, ale także w wodzie wodociągowej. Charakteryzują się one także dosyć znaczną zdolnością bioakumulacji w stężeniach ng/g w takich organizmach wodnych jak ryby i mięczaki. Oprócz SER, FLU i CIT w tkankach organizmów wodnych, w mózgu, wątrobie i mięśniach wykryto również ich metabolity Nor-FLU i Nor-SER (Silva i wsp., 2012; Puckowski i wsp., 2016). W testach toksykologicznych prowadzonych na rybach i mięczakach udokumentowano, że leki z grupy SSRIs, w tym SER i FLU stosowane w stężeniu spotykanym w środowisku, wywołują zaburzenia wielu procesów anatomicznych i fizjologicznych (Bossus i wsp., 2014; Silva i wsp., 2015).

W organizmie człowieka SER, FLU i CIT ulegają demetylacji, w wyniku czego powstają ich metabolity – Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT. W przeprowadzonych w prezentowanej monografii badaniach własnych wykazano toksyczne oddziaływanie tych metabolitów względem testowego szczepu *E. coli*. Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami pracy López-Muñoz i Álamo (2013), którzy udowodnili, że w testach na myszach i szczurach niektóre z metabolitów leków antydepresyjnych odznaczają się znaczną toksycznością. Również Tiwari i wsp. (2017) w swojej pracy podają, że metabolity Nor-FLU oraz Nor-SER charakteryzują się wyższą o 50% toksycznością w porównaniu z lekami macierzystymi FLU i SER. Z kolei Osawa i wsp. (2019) opisali toksyczność głównych metabolitów CIT wykrytych w ściekach.

W badaniach własnych przedstawionych w tej pracy wykazano, że SER, FLU i CIT oraz ich metabolity – Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT – wpływały z różną intensywnością na poziom fluorescencji białka GFP w MH, ŚS oraz ŚO. Po ekspozycji hodowli *E. coli* MM294-GFP na niektóre mieszaniny badanych leków i metabolitów z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU zauważono intensywniejszy efekt cytotoksyczny względem białka GFP w porównaniu z sumarycznym efektem cytotoksyczności składników mieszanin. Pośród badanych mieszanin najsilniejszym działaniem cytotoksycznym względem białka GFP odznaczały się te zawierające w swoim składzie SER w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS (0,1 mg/dm³); z Nor-SER (0,1 mg/dm³) i z CIS (0,1 mg/dm³); z Nor-SER (0,1 mg/dm³) i z 5-FU (0,1 mg/dm³). W przypadku mieszaniny SER (1 mg/dm³) z Nor-SER (0,1 mg/dm³) i z CIS (0,1 mg/dm³) w MH, ŚS oraz ŚO wykryto wyższą cytotoksyczność w porównaniu do sumarycznej cytotoksyczności pojedynczych substancji wchodzących w skład mieszaniny. Z kolei FLU, CIT, ich metabolity Nor-FLU i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z lekami antynowotworowymi w mniejszym stopniu oddziaływały na białko GFP w porównaniu z SER, jej metabolitem Nor-SER, ich mieszaninami oraz mieszaninami z CIS i 5-FU.

W literaturze naukowej udokumentowano przydatność różnych szczepów bakterii z plazmidowymi konstruktami genowymi z genem *gfp* w badaniach cytotoksyczności (Baumstark-Khan i wsp., 1999; Rabbow i wsp., 2002; Baumstark-Khan i wsp., 2007). W testach toksyczności prowadzonych na rybach wykryto, że FLU oddziałuje na ich hormony płciowe i wpływa na aktywność genów zaangażowanych w funkcje reprodukcyjne (Caracciolo i wsp., 2015). Gil-Ad i wsp. (2008) w swojej pracy udokumentowali właściwości cytotoksyczne leków z grupy SSRIs. Stwierdzono, że FLU działa inhibitoryjnie na proliferację komórek raka prostaty, CIT natomiast indukował apoptozę w komórkach białaczki szpikowej HL-60. Indukcję apoptozy przez FLU i CIT zauważono również w komórkach chłoniaka Burkitta. Podobnie i SER wykazywała aktywność antyproliferacyjną w liniach komórkowych raka jelita grubego HT29 (Gil-Ad i wsp., 2008). Jej cytotoksyczne właściwości zauważono także w badaniach na ludzkich limfocytach (Istifli i wsp., 2018). W pracy Nałęcz-Jaweckiego i wsp. (2020) badano na pierwotniaku *Spirostomum ambiguum* toksyczność i potencjał bioakumulacji najczęściej wykrywanych w środowisku leków antydepresyjnych należących do grupy SSRIs, jak FLU, SER, paroksetyna i mianserina. Spośród nich SER wykazywała najwyższą toksyczność z wartościami EC_{50} zawierającymi się w granicach od 0,2 do 0,7 mg/dm³. Dodatkowo charakteryzowała się również najwyższym stopniem bioakumulacji. W kolejnej pracy Sehonova i wsp. (2019) w testach na *Danio rerio* oraz *Xenopus tropicalis* wykazali, że SER stosowana w stężeniach 0,1; 1; 10; 100 i 1000 µg/dm³ oddziaływała szkodliwie na rozwój organizmów. W wyższym stężeniu badanego leku zaobserwowano skutki śmiertelne, w niższym natomiast, odpowiadającym stężeniu wykrywanemu w środowisku, odnotowano wyraźny wpływ SER na ekspresję genów związanych z rozwojem serca, oczu, mózgu i kości.

Mikrobiologiczne biosensory z promotorem *recA* w transkrypcyjnej fuzji z genem reporterowym *luxCDABE* i innymi genami reporterowymi (np. *gfp*, *lacZ*) znalazły zastosowanie w ocenie genotoksyczności leków i innych związków chemicznych (Kostrzyńska i wsp., 2002; Belyaev, 2011; Kessler i wsp., 2012; Melamed i wsp., 2012; Lee i wsp., 2013). W przeprowadzonych badaniach własnych opisanych w niniejszej monografii zauważono, że SER, FLU i CIT, metabolity Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU oddziaływały na aktywność promotora *recA* i poziom ekspresji genu *luxCDABE* w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE*. Większość przedstawianych w literaturze badań genotoksyczności leków antydepresyjnych SER, FLU i CIT, ich metabolitów oraz leków antynowotworowych wykonywano głównie na modelach eukariotycznych i w mediach laboratoryjnych, a nie w ściekach, dlatego też otrzymane w badaniach własnych rezultaty odniesiono do analiz na organizmach modelowych innych niż *E. coli*. Z badanych w prezentowanej monografii leków, metabolitów oraz mieszanin najsilniejszy efekt genotoksyczny w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* wywoływała SER z Nor-SER oraz mieszaniny zawierające w swoim składzie SER, a mianowicie SER w stężeniach 0,1 i 1 mg/dm³ z Nor-SER (0,1 mg/dm³) z CIS (0,1 mg/dm³) oraz SER (1 mg/dm³) z CIS (0,1 mg/dm³). Wykryto również, że niezależnie od badanego środowiska (MH, ŚS oraz ŚÓ) większość mieszanin SER i Nor-SER z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU wykazywała wyższą genotoksyczność

w porównaniu z sumaryczną genotoksycznością pojedynczych składników mieszanin. W badaniach naukowych zauważono, że leki z grupy SSRI, w tym SER, FLU i CIT, wykazują działanie toksyczne i genotoksyczne oraz mają potencjał generacji stresu oksydacyjnego jako głównego mechanizmu prowadzącego do trwałych uszkodzeń komórek ekspozowanych na te leki (Goolsby i wsp., 2013; Hazelton i wsp., 2013; Hazelton i wsp., 2014; Silva i wsp., 2015; Jajoo i wsp., 2020). W przeprowadzonym na larwach *Drosophila melanogaster* eksperymencie Jajoo i wsp. (2020) wykryli genotoksyczne działanie SER, które było następstwem kumulacji pęknięć podwójnej nici DNA w mitotycznie aktywnych tkankach traktowanych SER. Ekspozycja uszkodzonych tkanek na kwas askorbinowy prowadziła do zmniejszenia uszkodzeń DNA. Również Battal i wsp. (2014) w swojej pracy opisali zaobserwowane w tkankach szczurów podwyższenie parametrów stresu oksydacyjnego po ich ekspozycji na SER. Podobnie w przypadku CIT i FLU wykazano, że oba te leki stosowane w stężeniu 500 ng/dm³ wywoływały stres oksydacyjny i działały genotoksycznie (Goolsby i wsp., 2013; Silva i wsp., 2015). Z kolei w eksperymencie na małżach z gatunku *M. galloprovincialis* udokumentowano, że pod wpływem FLU stosowanego w stężeniu 0,03–300 ng/dm³ dochodziło w tkankach gruczołów trawiennych do intensyfikacji peroksydacji lipidów i modulacji ekspresji genów biorących udział w procesie detoksyfikacji xenobiotyków (Hazelton i wsp., 2013; Hazelton i wsp., 2014; Silva i wsp., 2015). W badaniach własnych przedstawionych w tej pracy wykryto, że FLU i CIT, ich metabolity oraz ich mieszaniny z lekami antynowotworowymi wykazywały niższy potencjał genotoksyczny w porównaniu z SER, jej metabolitem i mieszaninami z CIS i 5-FU.

Skład wybranych mieszanin wykazujących najwyższą toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność względem testowych szczepów *E. coli* w porównaniu z kontrolą w MH, ŚS oraz ŚO przedstawiono w tabeli 5.1. Skład mieszanin, które spowodowały wzrost toksyczności, cytotoksyczności i genotoksyczności względem *E. coli* w porównaniu z sumaryczną toksycznością, cytotoksycznością i genotoksycznością pojedynczych składników mieszanin w MH, ŚS oraz ŚO, przedstawiono zaś w tabeli 5.2.

TABELA 5.1. Wybrane mieszaniny wykazujące najwyższą toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność względem testowych szczepów *E. coli* w porównaniu z kontrolą w MH, ŚS oraz ŚO

Badany parametr	Składniki mieszanin (mg/dm ³)
Toksyczność	SER 1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 SER 0,1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 <u>SER 1 z Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1</u> FLU 1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 FLU 1 z CIS 0,1 CIT 1 z D-CIT 0,1 z CIS 0,1 CIT 0,1 z D-CIT 0,1 z CIS 0,1 CIT 1 z CIS 0,1

Badany parametr	Składniki mieszanin (mg/dm ³)
Cytotoksyczność	SER 1 z CIS 0,1 SER 1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 <u>SER 1 z Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1</u> FLU 1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 FLU 0,1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 FLU 1 z CIS 0,1 <u>FLU 1 z Nor-FLU 0,1 z 5-FU 0,1</u> CIT 1 z D-CIT 0,1 z CIS 0,1
Genotoksyczność	SER 1 z CIS 0,1 SER 1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 SER 0,1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 FLU 1 z CIS 0,1 FLU 1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 FLU 0,1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 FLU 0,01 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 CIT 1 z CIS 0,1 CIT 1 z D-CIT 0,1 z CIS 0,1 CIT 0,1 z D-CIT 0,1 z CIS 0,1 CIT 0,01 z D-CIT 0,1 z CIS 0,1

OBJAŚNIENIA: SER 1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 – mieszanina SER w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-SER w stężeniu 0,1 mg/dm³ i z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³, FLU 1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 – mieszanina FLU w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-FLU w stężeniu 0,1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. W tabeli podkreślono mieszaniny niezawierające w swoim składzie CIS.

ŹRÓDŁO: badania własne,

TABELA 5.2. Mieszaniny wykazujące wyższą toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność w porównaniu z sumaryczną toksycznością, cytotoksycznością oraz genotoksycznością ich pojedynczych składników, badane w MH, ŚS oraz ŚO

Badany parametr	Składniki mieszanin (mg/dm ³)
Toksyczność	SER 0,1 z CIS 0,1 (w MH, ŚS, ŚO) <u>SER 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u> <u>SER 1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u> Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 (w MH i ŚS) <u>Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH i ŚS)</u> SER 0,01 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 (w MH i ŚS) SER 0,1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 (w MH, ŚS, ŚO) SER 1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 (w MH i ŚS) <u>SER 0,01 z Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u> <u>SER 0,1 z Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u> <u>SER 1 z Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH i ŚS)</u> FLU 1 z CIS 0,1 (w MH) Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 (w MH) FLU 0,01; 0,1; 1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 (w MH) FLU 0,01; 0,1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 (w MH) CIT 1 z CIS 0,1 (w MH) CIT 1 z D-CIT 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH)

Badany parametr	Składniki mieszanin (mg/dm ³)
Cytotoksyczność	<u>SER 1 z 5-FU 0,1 (w MH)</u> <u>Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH)</u> SER 0,1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 (w MH) SER 1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 (w MH) <u>SER 0,1 z Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u> <u>SER 1 z Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u> <u>FLU 1 z Nor-FLU 0,1 (MH, ŚS oraz ŚO)</u> FLU 1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 (MH, ŚS oraz ŚO) <u>FLU 1 z Nor-FLU 0,1 z 5-FU 0,1 (MH)</u>
Genotoksyczność	SER 0,01; 0,1; 1 z CIS 0,1 (MH, ŚS, ŚO) <u>SER 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH)</u> <u>SER 1 z 5-FU 0,1 (MH, ŚS, ŚO)</u> Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 (MH, ŚS, ŚO) <u>Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1 (MH, ŚS, ŚO)</u> SER 0,01; 0,1 i 1 z Nor-SER 0,1 z CIS 0,1 (MH, ŚS, ŚO) <u>SER 1 z Nor-SER 0,1 z 5-FU 0,1 (MH, ŚS, ŚO)</u> <u>FLU 1 z Nor-FLU 0,1 (w MH, ŚS oraz ŚO)</u> FLU 1 z CIS 0,1 (w MH, ŚS oraz ŚO) <u>FLU 1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS oraz ŚO)</u> Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 (w ŚO) <u>Nor-FLU 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u> FLU 1 z Nor-FLU 0,1 z CIS 0,1 (w MH, ŚS, ŚO) <u>FLU 1 z Nor-FLU 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u> CIT 1 z CIS 0,1 (w MH, ŚS, ŚO) <u>CIT 1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u> CIT 1 z D-CIT 0,1 z CIS 0,1 (w MH, ŚS, ŚO) <u>CIT 1 z D-CIT 0,1 z 5-FU 0,1 (w MH, ŚS, ŚO)</u>

OBJAŚNIENIA: SER 1 z CIS 0,1 – mieszanina SER w stężeniu 1 mg/dm³ z CIS w stężeniu 0,1 mg/dm³. W tabeli podkreślono mieszaniny niezawierające w swoim składzie CIS.

ŹRÓDŁO: badania własne,

Oprócz leków antydepresyjnych do często wykrywanych w ściekach należą leki antynowotworowe, w tym CIS i 5-FU. Na podstawie badań własnych zaprezentowanych w tej monografii stwierdzono, że głównie CIS i w mniejszym stopniu 5-FU w mieszaninach z SER, FLU i CIT oraz z ich metabolitami powodują wzrost toksyczności, cytotoksyczności i genotoksyczności względem szczepów *E. coli* w porównaniu z kontrolą i ich odpowiednimi roztworami pojedynczych składników (tabele 5.1 i 5.2). Podobny efekt wzrostu toksyczności zaobserwowano także w testach zarówno na *Cyanobacteria (Anabaena CPB4337)*, jak i glonach (*Pseudokirchneriella subcapitata*) dla mieszanin antybiotyków pochodzących z różnych grup z erytromycyną w porównaniu z ich odpowiednimi roztworami jednoskładnikowymi (Backhaus, 2014; Lonappan i wsp., 2016). Leki antynowotworowe należą do leków CMR (ang. *carcinogenic, mutagenic, reprotoxic*) wykazujących aktywność kancerogenną, mutageną i reprotoksyczną (Kosjek i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2017). Jednym z głównych

mechanizmów ich działania jest zdolność interwencji w podziały komórkowe i inhibicji bądź całkowitego blokowania replikacji DNA, co prowadzi do śmierci komórek nowotworowych. Niektóre z tych leków wykazują cechy inhibitorów nukleotydów, inne interkalują się do DNA, hamując transkrypcję i translację. Leki antynowotworowe, a wśród nich CIS i 5-FU, ze względu na budowę chemiczną i mechanizm działania należą do jednych z najniebezpieczniejszych farmaceutyków, które nawet w bardzo niskim stężeniu wywołują mutacje w komórkach (Jureczko i Kalka, 2020). W terapii antynowotworowej często stosuje się 5-FU i CIS, które wraz z wydaliniami ludzkimi dostają się do ścieków szpitalnych w formie niezmienionej oraz jako metabolity (Kosjek i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2017; Jureczko i Kalka, 2020). Nierzadko bez wstępnego oczyszczania ścieki te trafiają do oczyszczalni ścieków, gdzie leki antynowotworowe ulegają tylko częściowej biodegradacji i wraz z odpływającymi ściekami oczyszczonymi kierowane są bezpośrednio do odbiorników.

Ze względu na częstość wykrywania w matrycach środowiskowych sugeruje się, aby 5-FU był traktowany jako farmaceutyk brany pod uwagę w ocenie skażenia środowiska substancjami pochodzącymi ze ścieków szpitalnych (Kosjek i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2017). W pracy Ferk i wsp. (2009) poddano ocenie genotoksyczność ścieków szpitalnych, w których zidentyfikowano obecność m.in. CIS i 5-FU. W badaniach stwierdzono dwukrotnie wyższy w porównaniu z kontrolą poziom indukcji uszkodzeń DNA po ekspozycji komórek wątroby na te ścieki.

W literaturze naukowej wyraźnie brakuje badań dotyczących oddziaływania środowiska ścieków surowych i oczyszczonych na aktywność leków, metabolitów i ich mieszanin. W badaniach własnych przedstawionych w niniejszej pracy wykazano, że ŚS i ŚO w porównaniu z MH oraz ŚO w porównaniu z ŚS nie oddziałują w istotny sposób na toksyczność i genotoksyczność badanych substancji czynnych leków, metabolitów oraz ich mieszanin. We wcześniejszych pracach (Mascolo i wsp., 2010; Vieno i Sillanpää, 2014; Vasiliadou i wsp., 2018) wykazano, że skład ścieków, szczególnie zawartość materii organicznej oraz obecność innych związków chemicznych, a także skład ilościowy i jakościowy mikroflory mają wpływ na aktywność biologiczną i biodegradację farmaceutyków i innych związków chemicznych występujących w ściekach. Podkreślić należy, że w badaniach prezentowanych w tej monografii ze względu na procedury zastosowanych testów zarówno próbki ścieków surowych, jak i oczyszczonych poddano filtracji oraz autoklawowaniu, co niewątpliwie zmieniło ich skład i mogło mieć wpływ na obniżenie ich toksyczności.

6. Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzone badania dotyczyły określenia toksyczności, cytotoksyczności i genotoksyczności wybranych leków antydepresyjnych SER, FLU i CIT, ich metabolitów Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT, ich mieszanin oraz mieszanin z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU w trzech różnych środowiskach – medium hodowlanym, ściekach surowych i ściekach oczyszczonych. Badania toksyczności i genotoksyczności mikrozanieczyszczeń w postaci farmaceutyków prowadzono do tej pory głównie na roztworach leków stosowanych pojedynczo i najczęściej w laboratoryjnych podłożach mikrobiologicznych. W literaturze brak jest badań dotyczących toksyczności, cytotoksyczności i genotoksyczności leków antydepresyjnych, ich metabolitów, leków antynowotworowych, a także ich mieszanin w środowiskach ścieków surowych i oczyszczonych. Uzupełnieniem aktualnego stanu wiedzy są prezentowane w tej pracy wyniki badań własnych i sformułowane na ich podstawie następujące wnioski:

1. Ścieki surowe i oczyszczone w porównaniu z podłożami mikrobiologicznymi nie wpływały w istotnym stopniu na toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność badanych substancji czynnych leków, metabolitów oraz ich mieszanin.
2. Metabolity leków antydepresyjnych wykazywały podobną toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność w porównaniu z lekami macierzystymi SER, FLU i CIT, niezależnie od badanego środowiska (podłoże mikrobiologiczne, ścieki surowe i oczyszczone).
3. Pośród badanych leków antydepresyjnych oraz ich metabolitów najwyższą toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność, niezależnie od testowanego środowiska, wykazywały SER i Nor-SER.
4. Z badanych mieszanin najwyższą toksycznością, cytotoksycznością i genotoksycznością charakteryzowały się te, które zawierały w swoim składzie CIS. Najbardziej toksyczna pośród badanych była mieszanina Nor-SER i CIS z SER w najwyższym stężeniu 1 mg/dm³.
5. Ocena interakcji badanych substancji w mieszaninach w ściekach wykryła synergizm, potencjację, zwykłą addytywność oraz antagonizm.

Odnosząc ten fakt do warunków oczyszczalni ścieków, istotne wydaje się spostrzeżenie, że farmaceutyki i ich metabolity znajdujące się w trafiających do oczyszczalni ściekach wchodzi w różnego rodzaju interakcje, prowadzące m.in. do efektu synergistycznego działania składników mieszanin. Skutkuje to wzrostem toksyczności ścieków i silniejszym ich oddziaływaniem na osad czynny, co może doprowadzić

do zakłócenia jego prawidłowego funkcjonowania i obniżenia wydajności biodegradacji zanieczyszczeń w ściekach. Sugeruje to potrzebę podczyszczania ścieków szczególnie obciążonych ładunkiem farmaceutyków, takich jak ścieki szpitalne oraz ścieki z zakładów produkcji leków.

7. Plany dalszych badań

Konwencjonalne systemy oczyszczania ścieków charakteryzują się ograniczonymi możliwościami degradacji zanieczyszczeń farmaceutycznych, co wynika głównie z właściwości chemicznych farmaceutyków i ich metabolitów. Leki i ich metabolity to często związki o złożonej budowie chemicznej, które nawet w niewielkim stężeniu wykazują silne działanie na organizmy żywe i mikroorganizmy osadu czynnego, co może prowadzić do znacznego spadku efektywności oczyszczania ścieków. Stąd też kluczowe są dalsze badania poświęcone poszukiwaniu efektywniejszych metod usuwania farmaceutyków ze środowiska oraz ograniczenia ich ilości trafiających do środowiska wraz ze ściekami oczyszczonymi. Bardzo ważne w walce z rozprzestrzenianiem się leków i ich metabolitów w środowisku jest opracowanie i wprowadzenie regulacji prawnych dotyczących monitoringu środowiska pod kątem obecności tego rodzaju zanieczyszczeń. Ważne jest także, aby metody pozwalające na usunięcie farmaceutyków i ich metabolitów ze ścieków były uzasadnione kosztowo, pod kątem budowy takiego systemu oraz jego eksploatacji. Przy projektowaniu systemów oczyszczania ścieków zawierających farmaceutyki obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się metody oparte na błonie biologicznej i metody AOPs.

W ostatnich latach obserwuje się również wzrost zainteresowania zastosowaniem tlenowego granulowanego osadu czynnego w usuwaniu farmaceutyków ze ścieków. Ten rodzaj osadu czynnego wykazuje znaczną tolerancję na toksyczne działanie ksеноbiotyków w stosunku do mikroorganizmów w nim obecnych. Stąd też dalsze badania mogłyby się skupiać wokół analizy wpływu poszczególnych farmaceutyków, ich metabolitów i ich mieszanin na kondycję tlenowych granul osadu czynnego. Tego typu badania pozwoliłyby na określenie wpływu leków, ich metabolitów i ich mieszanin na przebieg procesów jednostkowych biodegradacji związków węgla, przemian azotu i fosforu. Kolejnym obszarem dalszych planowanych badań jest oznaczenie stężenia wybranych farmaceutyków, które w znaczący sposób wpływa na aktywność mikroorganizmów w układach do oczyszczania ścieków, w tym zastosowanie techniki Real-Time PCR do oceny zmian w składzie ilościowym i jakościowym biocenoz.

Załącznik A

Oddziaływanie badanych substancji czynnych leków antydepresyjnych, metabolitów, leków antynowotworowych oraz ich mieszanin na żywotność hodowli *E. coli*, fluorescencję białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP oraz indukcję promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO).

TABELA A.1. Inhibicja żywotności [%] *E. coli* K-12 po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
SER 0,01	0,0	0,0	0,0
SER 0,1	2,8	3,2	4,9
SER 1	12,7	14,6	16,7
Nor-SER 0,01	1,4	2,3	2,8
Nor-SER 0,1	3,7	4,5	7,5
Nor-SER 1	14,6	15,8	17,3
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	8,4	9,1	10,2
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	12,4	13,8	16,5
SER 1 + Nor-SER 0,1	16,6	17,8	19,7
CIS 0,1	4,4	6,7	9,2
5-FU 0,1	1,7	3,3	5,6
SER 0,01 + CIS 0,1	5,2	8,4	9,3
SER 0,1 + CIS 0,1	10,8	12,4	14,6
SER 1 + CIS 0,1	17,6	19,8	22,3
SER 0,01 + 5-FU 0,1	2,3	3,8	5,7
SER 0,1 + 5-FU 0,1	7,7	8,9	11,6
SER 1 + 5-FU 0,1	12,9	21,8	25,1
Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	12,8	14,3	15,8
Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	9,4	11,9	13,2
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	14,6	15,3	16,2

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	19,7	22,3	24,3
SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	26,2	27,8	28,9
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	10,3	12,7	13,4
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	14,5	16,3	18,7
SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	19,8	22,7	24,3

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.2. Różnice w wartościach inhibicji żywotności [%] *E. coli* K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚS/MH	ŚO/MH	ŚO/ŚS
SER 0,01	0,0	0,0	0,0
SER 0,1	0,4	2,1	1,7
SER 1	1,9	4,0	2,1
Nor-SER 0,01	0,9	1,4	0,5
Nor-SER 0,1	0,8	3,8	3,0
Nor-SER 1	1,2	2,7	1,5
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	0,7	1,8	1,1
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	1,4	4,1	2,7
SER 1 + Nor-SER 0,1	1,2	3,1	1,9
CIS 0,1	2,3	4,8	2,5
5-FU 0,1	1,6	3,9	2,3
SER 0,01 + CIS 0,1	3,2	4,1	0,9
SER 0,1 + CIS 0,1	1,6	3,8	2,2
SER 1 + CIS 0,1	2,2	4,7	2,5
SER 0,1 + 5-FU 0,1	1,5	3,4	1,9
SER 0,1 + 5-FU 0,1	1,2	3,9	2,7
SER 1 + 5-FU 0,1	8,9	12,2	3,3
Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	1,5	3,0	1,5
Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	2,5	3,8	1,3
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	0,7	1,6	0,9
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	2,6	4,6	2,0
SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	1,6	2,7	1,1
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	2,4	3,1	0,7

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚS/MH	ŚO/MH	ŚO/ŚS
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	1,8	4,2	2,4
SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	2,9	4,5	1,6

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.3. Inhibicja żywotności [%] *E. coli* K-12 po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
FLU 0,1	0,0	0,0	0,0
FLU 1	6,7	9,3	11,4
Nor-FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
Nor-FLU 0,1	2,3	2,9	3,4
Nor-FLU 1	8,2	9,5	11,7
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	2,5	3,1	3,7
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	2,9	3,8	4,3
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	10,2	10,9	11,5
CIS 0,1	4,4	6,7	9,2
5-FU 0,1	1,7	3,3	5,6
FLU 0,01 + CIS 0,1	4,8	6,9	9,5
FLU 0,1 + CIS 0,1	4,9	7,1	7,5
FLU 1 + CIS 0,1	12,3	12,9	13,5
FLU 0,01 + 5-FU 0,1	1,8	3,6	5,8
FLU 0,1 + 5-FU 0,1	1,9	3,7	5,9
FLU 1 + 5-FU 0,1	8,7	9,3	11,8
Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	7,2	7,8	8,3
Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	4,2	4,9	5,2
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	8,1	8,6	9,2
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	8,6	9,7	10,2
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	14,2	15,6	16,7
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	4,6	5,3	5,9
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	4,9	5,8	6,3
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	9,1	10,5	13,6

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.4. Różnice w wartościach inhibicji żywotności [%] *E. coli* K-12 pomiędzy ŚŚ a MH (ŚŚ/MH), ŚÓ a MH (ŚÓ/MH) i pomiędzy ŚÓ a ŚŚ (ŚÓ/ŚŚ) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚŚ/MH	ŚÓ/MH	ŚÓ/ŚŚ
FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
FLU 0,1	0,0	0,0	0,0
FLU 1	2,6	4,7	2,1
Nor-FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
Nor-FLU 0,1	0,6	1,1	0,5
Nor-FLU 1	1,3	3,5	2,2
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	0,6	1,2	0,6
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	0,9	1,4	0,5
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	0,7	1,3	0,6
CIS 0,1	2,3	4,8	2,5
5-FU 0,1	1,6	3,9	2,3
FLU 0,01 + CIS 0,1	2,1	4,7	2,6
FLU 0,1 + CIS 0,1	2,2	2,6	0,4
FLU 1 + CIS 0,1	0,6	1,2	0,6
FLU 0,01 + 5-FU 0,1	1,8	4,0	2,2
FLU 0,1 + 5-FU 0,1	1,8	4,0	2,2
FLU 1 + 5-FU 0,1	0,6	3,1	2,5
Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	0,6	1,1	0,5
Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,7	1,0	0,3
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	0,5	1,1	0,6
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	1,1	1,6	0,5
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	1,4	2,5	1,1
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,7	1,3	0,6
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,9	1,4	0,5
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	1,4	4,5	3,1

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.5. Inhibicja żywotności [%] *E. coli* K-12 po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 1	1,7	2,6	4,3
D-CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
D-CIT 1	0,8	2,3	3,8
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	1,9	2,7	3,3
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	2,8	4,6	6,8
CIT 1 + D-CIT 0,1	4,4	6,6	8,7
CIS 0,1	4,4	6,7	9,2
5-FU 0,1	1,7	3,3	5,6
CIT 0,01 + CIS 0,1	4,5	6,7	9,3
CIT 0,1 + CIS 0,1	4,5	6,9	9,4
CIT 1 + CIS 0,1	7,1	8,4	10,7
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	1,7	3,4	5,7
CIT 0,1 + 5-FU 0,1	1,8	3,4	5,7
CIT 1 + 5-FU 0,1	3,5	5,8	7,6
D-CIT 0,1 + CIS 0,1	4,5	6,8	9,3
D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	1,8	3,4	5,7
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	4,7	6,9	9,7
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	5,1	7,3	10,2
CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	8,3	8,9	10,2
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	1,8	3,6	5,8
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	2,1	4,2	6,3
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	5,2	5,9	6,8

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.6. Różnice w wartościach inhibicji żywotności [%] *E. coli* K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚS/MH	ŚO/MH	ŚS/ŚO
CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 1	0,9	2,6	1,7
D-CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
D-CIT 1	1,5	3,0	1,5
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	0,8	1,4	0,6
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	1,8	4,0	2,2
CIT 1 + D-CIT 0,1	2,2	4,3	2,1
CIS 0,1	2,3	4,8	2,5
5-FU 0,1	1,6	3,9	2,3
CIT 0,01 + CIS 0,1	2,2	4,8	2,6
CIT 0,1 + CIS 0,1	2,4	4,9	2,5
CIT 1 + CIS 0,1	1,3	3,6	2,3
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	1,7	4,0	2,3
CIT 0,1 + 5-FU 0,1	1,6	3,9	2,3
CIT 1 + 5-FU 0,1	2,3	4,1	1,8
D-CIT 0,1 + CIS 0,1	2,3	4,8	2,5
D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	1,6	3,9	2,3
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	2,2	5,0	2,8
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	2,2	5,1	2,9
CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	0,6	1,9	1,3
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	1,8	4,0	2,2
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	2,1	4,2	2,1
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	0,7	1,6	0,9

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.7. Inhibicja fluorescencji białka GFP [%] w *E. coli* MM294-GFP po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
SER 0,01	0,0	0,0	0,0
SER 0,1	2,6	2,8	3,4
SER 1	7,2	8,6	11,4
Nor-SER 0,01	0,0	0,0	0,0
Nor-SER 0,1	3,1	3,5	3,9
Nor-SER 1	7,9	8,9	12,1
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	3,6	4,1	4,5
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	4,2	4,8	5,3
SER 1 + Nor-SER 0,1	9,8	10,7	12,8
CIS 0,1	8,4	10,6	12,3
5-FU 0,1	2,3	6,0	6,0
SER 0,01 + CIS 0,1	9,3	10,6	11,2
SER 0,1 + CIS 0,1	10,4	11,2	11,6
SER 1 + CIS 0,1	15,6	17,3	19,8
SER 0,01 + 5-FU 0,1	3,1	3,7	4,2
SER 0,1 + 5-FU 0,1	5,3	5,9	6,5
SER 1 + 5-FU 0,1	10,8	11,7	12,6
Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	11,8	12,6	13,5
Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	6,7	6,9	7,3
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	12,3	12,9	13,7
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	15,7	16,3	16,9
SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	19,7	21,6	22,3
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	11,5	11,9	12,5
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	13,6	14,5	14,9
SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	17,8	18,5	18,9

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.8. Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP [%] w *E. coli* MM294-GFP pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚS/MH	ŚO/MH	ŚO/ŚS
SER 0,01	0,0	0,0	0,0
SER 0,1	0,2	0,8	0,6
SER 1	1,4	4,2	2,8
Nor-SER 0,01	0,0	0,0	0,0
Nor-SER 0,1	0,4	0,8	0,4
Nor-SER 1	1,0	4,2	3,2
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	0,5	0,9	0,4
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	0,6	1,1	0,5
SER 1 + Nor-SER 0,1	0,9	3,0	2,1
CIS 0,1	2,2	3,9	1,7
5-FU 0,1	3,7	3,7	0,0
SER 0,01 + CIS 0,1	2,2	3,9	1,7
SER 0,1 + CIS 0,1	3,7	3,7	0,0
SER 1 + CIS 0,1	1,3	1,9	0,6
SER 0,01 + 5-FU 0,1	0,8	1,2	0,4
SER 0,1 + 5-FU 0,1	1,7	4,2	2,5
SER 1 + 5-FU 0,1	0,6	1,1	0,5
Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	0,6	1,2	0,6
Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	0,9	1,8	0,9
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	0,8	1,7	0,9
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	0,2	0,6	0,4
SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	0,6	1,4	0,8
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	0,6	1,2	0,6
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	1,9	2,6	0,7
SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	0,4	1,0	0,6

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.9. Inhibicja fluorescencji białka GFP [%] w *E. coli* MM294-GFP po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
FLU 0,1	0,0	0,0	0,0
FLU 1	4,2	6,3	7,2
Nor-FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
Nor-FLU 0,1	1,2	1,6	1,8
Nor-FLU 1	5,6	6,6	7,5
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	0,0	0,0	0,0
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	1,4	1,9	2,1
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	10,9	11,3	11,8
CIS 0,1	8,4	10,6	12,3
5-FU 0,1	2,3	6,0	6,0
FLU 0,01 + CIS 0,1	8,7	10,8	12,6
FLU 0,1 + CIS 0,1	8,8	11,1	11,5
FLU 1 + CIS 0,1	13,3	13,7	14,2
FLU 0,01 + 5-FU 0,1	2,5	2,9	3,4
FLU 0,1 + 5-FU 0,1	2,7	3,2	3,6
FLU 1 + 5-FU 0,1	5,4	6,4	7,2
Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	9,7	9,9	10,3
Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	3,9	4,2	4,4
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	9,9	10,2	10,5
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	13,8	14,3	14,7
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	17,4	17,9	18,4
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	5,4	5,8	6,2
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	8,6	8,9	9,4
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	11,3	11,9	12,8

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.10. Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP [%] w *E. coli* MM294-GFP pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚS/MH	ŚO/MH	ŚO/ŚS
FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
FLU 0,1	0,0	0,0	0,0
FLU 1	2,1	3,0	0,9
Nor-FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
Nor-FLU 0,1	0,4	0,6	0,2
Nor-FLU 1	1,0	1,9	0,9
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	0,0	0,0	0,0
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	0,5	0,7	0,2
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	0,4	0,9	0,5
CIS 0,1	2,2	3,9	1,7
5-FU 0,1	3,7	3,7	0,0
FLU 0,01 + CIS 0,1	2,1	3,9	1,8
FLU 0,1 + CIS 0,1	2,3	2,7	0,4
FLU 1 + CIS 0,1	0,4	0,9	0,5
FLU 0,01 + 5-FU 0,1	0,4	0,9	0,5
FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,5	0,9	0,4
FLU 1 + 5-FU 0,1	1,0	1,8	0,8
Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	0,2	0,6	0,4
Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,3	0,5	0,2
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	0,3	0,6	0,3
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	0,5	0,9	0,4
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	0,5	1,0	0,5
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,4	0,8	0,4
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,3	0,8	0,5
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,6	1,5	0,9

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.11. Inhibicja fluorescencji białka GFP [%] w *E. coli* MM294-GFP po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 1	0,2	0,5	0,9
D-CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
D-CIT 1	0,1	0,2	0,4
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	0,1	0,3	0,4
CIT 1 + D-CIT 0,1	0,8	1,0	1,3
CIS 0,1	8,4	10,6	12,3
5-FU 0,1	2,3	6,0	6,0
CIT 0,01 + CIS 0,1	8,5	10,4	12,5
CIT 0,1 + CIS 0,1	8,6	10,7	12,8
CIT 1 + CIS 0,1	8,8	11,3	13,8
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	2,4	6,2	6,3
CIT 0,1 + 5-FU 0,1	2,5	6,3	6,4
CIT 1 + 5-FU 0,1	2,9	6,8	7,1
D-CIT 0,1 + CIS 0,1	0,7	0,8	0,9
D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	8,8	9,2	9,6
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	9,5	9,9	10,6
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	10,4	10,9	11,7
CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	12,3	17,2	19,4
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	2,7	3,2	3,9
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	3,3	3,8	4,2
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	5,6	6,2	7,3

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.12. Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP [%] w *E. coli* MM294-GFP pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚÓ a MH (ŚÓ/MH) i pomiędzy ŚÓ a ŚS (ŚÓ/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚS/MH	ŚÓ/MH	ŚÓ/ŚS
CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 1	0,3	0,7	0,4
D-CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
D-CIT 1	0,1	0,3	0,2
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	0,2	0,3	0,1
CIT 1 + D-CIT 0,1	0,2	0,5	0,3
CIS 0,1	2,2	3,9	1,7
5-FU 0,1	3,7	3,7	0,0
CIT 0,01 + CIS 0,1	1,9	4,0	2,1
CIT 0,1 + CIS 0,1	2,1	4,2	2,1
CIT 1 + CIS 0,1	2,5	5,0	2,5
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	3,8	3,9	0,1
CIT 0,1 + 5-FU 0,1	3,8	3,9	0,1
CIT 1 + 5-FU 0,1	3,9	4,2	0,3
D-CIT 0,1 + CIS 0,1	0,1	0,2	0,1
D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	0,4	0,8	0,4
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	0,4	1,1	0,7
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	0,5	1,3	0,8
CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	4,9	7,1	2,2
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	0,5	1,2	0,7
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	0,5	0,9	0,4
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	0,6	1,7	1,1

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.13. Indukcja promotora *recA* [%] w *E. coli* SM342 *recA:lucDABE* po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
SER 0,01	1,1	1,2	1,3
SER 0,1	4,2	4,7	5,1
SER 1	8,5	8,9	9,2
Nor-SER 0,01	1,8	2,3	2,4
Nor-SER 0,1	4,8	4,9	5,2
Nor-SER 1	10,7	11,4	11,9
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	5,3	5,7	5,9
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	9,2	9,8	10,2
SER 1 + Nor-SER 0,1	12,8	13,5	13,9
CIS 0,1	33,1	33,6	33,9
5-FU 0,1	5,1	5,3	5,5
SER 0,01 + CIS 0,1	35,6	35,9	36,2
SER 0,1 + CIS 0,1	40,2	40,9	41,7
SER 1 + CIS 0,1	45,6	46,7	47,2
SER 0,01 + 5-FU 0,1	5,8	6,1	6,7
SER 0,1 + 5-FU 0,1	10,2	10,5	10,8
SER 1 + 5-FU 0,1	14,4	14,8	15,3
Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	42,6	43,1	43,5
Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	12,1	12,7	12,9
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	39,6	40,2	40,6
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	45,2	45,7	45,9
SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	48,5	48,9	50,2
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	11,7	11,9	12,4
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	14,7	15,2	15,8
SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	19,7	20,1	20,8

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.14. Różnice w wartościach indukcji promotora *recA* [%] w *E. coli* SM342 *recA:lucDABE* pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚS/MH	ŚO/MH	ŚO/ŚS
SER 0,01	0,1	0,2	0,1
SER 0,1	0,5	0,9	0,4
SER 1	0,4	0,7	0,3
Nor-SER 0,01	0,5	0,6	0,1
Nor-SER 0,1	0,1	0,4	0,3
Nor-SER 1	0,7	1,2	0,5
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	0,4	0,6	0,2
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	0,6	1,0	0,4
SER 1 + Nor-SER 0,1	0,7	1,1	0,4
CIS 0,1	0,5	0,8	0,3
5-FU 0,1	0,2	0,4	0,2
SER 0,01 + CIS 0,1	0,5	0,8	0,3
SER 0,1 + CIS 0,1	0,2	0,4	0,2
SER 1 + CIS 0,1	0,3	0,6	0,3
SER 0,01 + 5-FU 0,1	0,7	1,5	0,8
SER 0,1 + 5-FU 0,1	1,1	1,6	0,5
SER 1 + 5-FU 0,1	0,3	0,9	0,6
Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	0,3	0,6	0,3
Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	0,4	0,9	0,5
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	0,5	0,9	0,4
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	0,6	0,8	0,2
SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	0,6	1,0	0,4
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	0,5	0,7	0,2
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	0,4	1,7	1,3
SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	0,2	0,7	0,5

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.15. Indukcja promotora *recA* [%] w *E. coli* SM342 *recA:lucDABE* po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
FLU 0,1	0,0	0,0	0,0
FLU 1	4,5	4,7	4,9
Nor-FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
Nor-FLU 0,1	1,1	1,5	1,7
Nor-FLU 1	5,6	6,4	6,9
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	1,8	2,4	3,2
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	1,8	2,6	3,3
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	6,2	7,2	7,5
CIS 0,1	33,1	33,6	33,9
5-FU 0,1	5,1	5,3	5,5
FLU 0,01 + CIS 0,1	34,2	34,3	34,5
FLU 0,1 + CIS 0,1	34,3	34,4	35,1
FLU 1 + CIS 0,1	39,8	41,2	43,7
FLU 0,01 + 5-FU 0,1	5,1	5,4	5,7
FLU 0,1 + 5-FU 0,1	5,2	5,5	5,8
FLU 1 + 5-FU 0,1	10,3	11,6	12,8
Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	34,7	35,6	36,5
Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	6,7	7,3	8,2
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	36,8	37,9	39,2
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	38,3	39,4	41,6
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	44,2	46,8	49,2
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	6,3	6,9	7,3
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	6,4	7,1	7,2
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	14,2	14,9	15,3

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.16. Różnice w wartościach indukcji promotora *recA* [%] w *E. coli* SM342 *recA:lucDABE* pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚÓ a MH (ŚÓ/MH) i pomiędzy ŚÓ a ŚS (ŚÓ/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚS/MH	ŚÓ/MH	ŚÓ/ŚS
FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
FLU 0,1	0,0	0,0	0,0
FLU 1	0,2	0,4	0,2
Nor-FLU 0,01	0,0	0,0	0,0
Nor-FLU 0,1	0,4	0,6	0,2
Nor-FLU 1	0,8	1,3	0,5
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	0,6	1,4	0,8
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	0,8	1,5	0,7
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	1,0	1,3	0,3
CIS 0,1	0,5	0,8	0,3
5-FU 0,1	0,2	0,4	0,2
FLU 0,01 + CIS 0,1	0,1	0,3	0,2
FLU 0,1 + CIS 0,1	0,1	0,8	0,7
FLU 1 + CIS 0,1	1,4	3,9	2,5
FLU 0,01 + 5-FU 0,1	0,3	0,6	0,3
FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,3	0,6	0,3
FLU 1 + 5-FU 0,1	1,3	2,5	1,2
Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	0,9	1,8	0,9
Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,6	1,5	0,9
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	1,1	2,4	1,3
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	1,1	3,3	2,2
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	2,6	5,0	2,4
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,6	1,0	0,4
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,7	0,8	0,1
FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	0,7	1,1	0,4

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.17. Indukcja promotora *recA* [%] w *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	MH	ŚS	ŚO
CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 1	3,8	4,2	4,7
D-CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
D-CIT 1	1,2	1,4	1,8
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	0,2	0,3	0,5
CIT 1 + D-CIT 0,1	8,2	8,7	9,3
CIS 0,1	33,1	33,6	33,9
5-FU 0,1	5,1	5,3	5,5
CIT 0,01 + CIS 0,1	33,8	34,2	34,9
CIT 0,1 + CIS 0,1	34,2	35,1	35,8
CIT 1 + CIS 0,1	40,1	40,9	41,5
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	5,4	5,7	5,8
CIT 0,1 + 5-FU 0,1	5,5	5,9	6,2
CIT 1 + 5-FU 0,1	11,8	12,5	12,9
D-CIT 0,1 + CIS 0,1	33,8	34,2	35,7
D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	5,9	6,3	6,9
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	34,7	35,2	35,9
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	35,8	36,7	37,6
CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	41,6	41,9	42,1
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	6,3	6,9	7,3
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	7,2	7,8	8,4
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	9,2	10,2	10,9

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA A.18. Różnice w wartościach indukcji promotora *recA* [%] w *E. coli* SM342 *recA:lucDABE* pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚÓ a MH (ŚÓ/MH) i pomiędzy ŚÓ a ŚS (ŚÓ/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	ŚS/MH	ŚÓ/MH	ŚÓ/ŚS
CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 1	0,4	0,9	0,5
D-CIT 0,01	0,0	0,0	0,0
D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
D-CIT 1	0,2	0,6	0,4
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	0,0	0,0	0,0
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	0,1	0,3	0,2
CIT 1 + D-CIT 0,1	0,5	1,1	0,6
CIS 0,1	0,5	0,8	0,3
5-FU 0,1	0,2	0,4	0,2
CIT 0,01 + CIS 0,1	0,4	1,1	0,7
CIT 0,1 + CIS 0,1	0,9	1,6	0,7
CIT 1 + CIS 0,1	0,8	1,4	0,6
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	0,3	0,4	0,1
CIT 0,1 + 5-FU 0,1	0,4	0,7	0,3
CIT 1 + 5-FU 0,1	0,7	1,1	0,4
D-CIT 0,1 + CIS 0,1	0,4	1,9	1,5
D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	0,4	1,0	0,6
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	0,5	1,2	0,7
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	0,9	1,8	0,9
CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	0,3	0,5	0,2
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	0,6	1,0	0,4
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	0,6	1,2	0,6
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	1,0	1,7	0,7

ŹRÓDŁO: badania własne.

Załącznik B

Analiza statystyczna wyników oddziaływania badanych substancji czynnych leków antydepresyjnych, metabolitów, leków antynowotworowych oraz ich mieszanin na żywotność hodowli *E. coli*, fluorescencję białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP oraz indukcję promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO).

TABELA B.1. Wyniki testu Shapiro–Wilka

Grupa związków	Medium	Żywotność <i>E. coli</i> K-12		Fluorescencja białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP		Indukcja promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i>	
		W	p	W	p	W	p
SER	medium hodowlane	0,95	0,00	0,93	0,05	0,92	0,00
	ścieki surowe	0,91	0,02	0,92	0,00	0,93	0,00
	ścieki oczyszczone	0,87	0,00	0,91	0,05	0,94	0,05
FLU	medium hodowlane	0,86	0,00	0,92	0,02	0,87	0,00
	ścieki surowe	0,95	0,04	0,93	0,00	0,87	0,00
	ścieki oczyszczone	0,95	0,05	0,93	0,05	0,89	0,00
CIT	medium hodowlane	0,87	0,00	0,95	0,05	0,88	0,00
	ścieki surowe	0,86	0,00	0,88	0,00	0,87	0,00
	ścieki oczyszczone	0,91	0,00	0,86	0,05	0,89	0,00

Objaśnienia: W – wartość testu Shapiro–Wilka; p – poziom prawdopodobieństwa.

ŹRÓDŁO: badania własne.

TABELA B.2. Wyniki testu Bartletta dla zmiennych przyjętych do testu NIR Tukeya względem medium hodowlanego (MH)

Grupa związków	Wskaźnik	Bartlett χ^2	a df	p
SER	żywołność <i>E. coli</i> K-12	1,25	2	0,53
	fluorescencja białka GFP w <i>E. coli</i> MM294	0,25	2	0,88
	indukcja promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i>	0,05	2	0,98
FLU	żywołność <i>E. coli</i> K-12	5,40	2	0,07
	fluorescencja białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP	0,02	2	0,99
	indukcja promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i>	2,38	2	0,30
CIT	żywołność <i>E. coli</i> K-12	5,63	2	0,06
	fluorescencja białka GFP w <i>E. coli</i> MM294	0,02	2	0,99
	indukcja promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i>	3,78	2	0,15

Objaśnienia: Bartlett χ^2 – wartość testu Bartletta; a df – ilość stopni swobody; p – poziom prawdopodobieństwa

ŹRÓDŁO: badania własne.

W tabelach od 3 do 56 przyjęto następujące oznaczenia:

- Brak istotności statystycznej
- + Istotność statystyczna na poziomie $\alpha = 0,05$

TABELA B.3. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,01	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,01 + CIS 0,01	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,01	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,01 + CIS 0,01	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
SER 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
SER 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
SER 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Nor-SER 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Nor-SER 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Nor-SER 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 1 + Nor-SER 0,1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIS 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-FU 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01 + CIS 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1 + CIS 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 1 + CIS 0,1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01 + 5-FU 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA B.4. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA B.5. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚÓ

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nor-SER 0,01	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nor-SER 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nor-SER 1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 1 + Nor-SER 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIS 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-FU 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01 + CIS 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1 + CIS 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 1 + CIS 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01 + 5-FU 0,1	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA B.6. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nor-SER 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nor-SER 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nor-SER 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 1 + Nor-SER 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIS 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-FU 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01 + CIS 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1 + CIS 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 1 + CIS 0,1	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABELA B.7. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01																										
SER 0,1																										
SER 1																										
Nor-SER 0,01																										
Nor-SER 0,1																										
Nor-SER 1																										
SER 0,01 + Nor-SER 0,1																										
SER 0,1 + Nor-SER 0,1																										
SER 1 + Nor-SER 0,1																										
CIS 0,01																										
5-FU 0,01																										
SER 0,01 + CIS 0,1																										
SER 0,1 + CIS 0,1																										
SER 1 + CIS 0,1																										

TABELA B.8. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	Nor-SER 0,01	SER 1	SER 0,1	SER 0,01	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	+

TABELA B.9. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	SER 0,01																									
	SER 0,1																									
	SER 1																									
	Nor-SER 0,01																									
	Nor-SER 0,1																									
	Nor-SER 1																									
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1																									
	SER 0,1 + Nor-SER 0,1																									
	SER 1 + Nor-SER 0,1																									
	CIS 0,1																									
	5-FU 0,1																									
	SER 0,01 + CIS 0,1																									
	SER 0,1 + CIS 0,1																									
	SER 1 + CIS 0,1																									
	SER 0,01																									
	SER 0,1																									
	SER 1																									
	Nor-SER 0,01																									
	Nor-SER 0,1																									
	Nor-SER 1																									
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1																									
	SER 0,1 + Nor-SER 0,1																									
	SER 1 + Nor-SER 0,1																									
	CIS 0,1																									
	5-FU 0,1																									
SER 0,01 + CIS 0,1																										
SER 0,1 + CIS 0,1																										
SER 1 + CIS 0,1																										

TABELA B.10. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora recA w *E. coli* SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
SER 0,01																									
SER 0,1																									
SER 1																									
Nor-SER 0,01																									
Nor-SER 0,1																									
Nor-SER 1																									
SER 0,01 + Nor-SER 0,1																									
SER 0,1 + Nor-SER 0,1																									
SER 1 + Nor-SER 0,1																									
CIS 0,1																									
5-FU 0,1																									
SER 0,01 + CIS 0,1																									
SER 0,1 + CIS 0,1																									
SER 1 + CIS 0,1																									

TABELA B.11. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	SER 0,01																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
--	----------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	FLU 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.13: Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	FLU 0,01	FLU 0,1	FLU 1	Nor-FLU 0,01	Nor-FLU 0,1	Nor-FLU 1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	CIS 0,1	5-FU 0,1	FLU 0,01 + CIS 0,1	FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + 5-FU 0,1	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,1	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-FLU 0,01	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-FLU 0,1	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-FLU 1	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	FLU 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.14. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚÓ

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	FLU 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Nor-FLU 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Nor-FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.16. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	FLU 0,01	+																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
--	----------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

TABELA B.17. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	FLU 0,01	+																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															</
--	----------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

TABELA B.21. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	+																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
--	---------	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

TABELA B.22. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)																
	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + 5-FU 0,1	CIT 1 + 5-FU 0,1
CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.23. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚÓ

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	+																								
	5-FU 0,1	+																								
	CIT 0,01		+																							
	CIT 0,1			+																						
	CIT 1				+																					
	D-CIT 0,01					+																				
	D-CIT 0,1						+																			
	D-CIT 1							+																		
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1								+																	
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1									+																
	CIT 0,01 + CIS 0,1										+															
	CIT 0,1 + CIS 0,1											+														
	CIT 1 + CIS 0,1												+													
	CIT 0,01 + 5-FU 0,1													+												
	CIT 0,1 + 5-FU 0,1														+											
	CIT 1 + 5-FU 0,1															+										
	D-CIT 0,1 + CIS 0,1																+									
	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1																	+								
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1																		+							
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1																			+						
	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1																				+					
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1																					+				
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1																						+			
	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1																							+		

TABELA B.24. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	+																								
	5-FU 0,1	+																								
	CIT 0,01																									
	CIT 0,1																									
	CIT 1																									
	D-CIT 0,01																									
	D-CIT 0,1																									
	D-CIT 1																									
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1																									
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1																									
	CIT 1 + D-CIT 0,1																									
	CIT 0,01 + CIS 0,1																									
	CIT 0,1 + CIS 0,1																									
	CIT 1 + CIS 0,1																									
	CIT 0,01 + 5-FU 0,1																									
	CIS 0,1																									
	5-FU 0,1	+																								
	CIT 0,01	+																								
	CIT 0,1	+																								
	CIT 1	+																								
	D-CIT 0,01	+																								
	D-CIT 0,1	+																								
	D-CIT 1	+																								
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+																								
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+																								
CIT 1 + D-CIT 0,1	+																									
CIT 0,01 + CIS 0,1	+																									
CIT 0,1 + CIS 0,1	+																									
CIT 1 + CIS 0,1	+																									
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	+																									

TABELA B.25. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚŚ

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + 5-FU 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1
CIS 0,1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT 0,1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-CIT 0,01	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-CIT 0,1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-CIT 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT 0,01 + CIS 0,1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + CIS 0,1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + CIS 0,1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.26. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5-FU 0,1	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,01	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 1	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,01 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,1 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 1 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,01 + 5-FU 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-CIT 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-CIT 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-CIT 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-CIT 0,01 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-CIT 1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
D-CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

TABELA B.27. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	+																								
	5-FU 0,1	+																								
	CIT 0,01																									
	CIT 0,1																									
	CIT 1																									
	D-CIT 0,01																									
	D-CIT 0,1																									
	D-CIT 1																									
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1																									
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1																									
	CIT 1 + D-CIT 0,1																									
	CIT 0,01 + CIS 0,1																									
	CIT 0,1 + CIS 0,1																									
	CIT 1 + CIS 0,1																									
	CIT 0,01 + 5-FU 0,1																									
	CIS 0,1																									
	5-FU 0,1	+																								
	CIT 0,01	+																								
	CIT 0,1	+																								
	CIT 1	+																								
	D-CIT 0,01	+																								
	D-CIT 0,1	+																								
	D-CIT 1	+																								
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+																								
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+																								
CIT 1 + D-CIT 0,1	+																									
CIT 0,01 + CIS 0,1	+																									
CIT 0,1 + CIS 0,1	+																									
CIT 1 + CIS 0,1	+																									
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	+																									
CIS 0,1																										
5-FU 0,1	+																									
CIT 0,01	+																									
CIT 0,1	+																									
CIT 1	+																									
D-CIT 0,01	+																									
D-CIT 0,1	+																									
D-CIT 1	+																									
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+																									
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+																									
CIT 1 + D-CIT 0,1	+																									
CIT 0,01 + CIS 0,1	+																									
CIT 0,1 + CIS 0,1	+																									
CIT 1 + CIS 0,1	+																									
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	+																									
CIS 0,1																										
5-FU 0,1	+																									
CIT 0,01	+																									
CIT 0,1	+																									
CIT 1	+																									
D-CIT 0,01	+																									
D-CIT 0,1	+																			</						

TABELA B.28. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1		+																							
	5-FU 0,1		+																							
	CIT 0,01																									
	CIT 0,1																									
	CIT 1																									
	D-CIT 0,01																									
	D-CIT 0,1																									
	D-CIT 1																									
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1																									
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1																									
	CIT 1 + D-CIT 0,1																									
	CIT 0,01 + CIS 0,1																									
	CIT 0,1 + CIS 0,1																									
	CIT 1 + CIS 0,1																									
	CIT 0,01 + 5-FU 0,1																									
	CIT 0,1 + 5-FU 0,1																									
	CIT 1 + 5-FU 0,1																									
	D-CIT 0,1 + CIS 0,1																									
	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1																									
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1																									
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1																									
	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1																									
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1																									
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1																									
	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1																									

TABELA B.29. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚÓ

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1																									
	5-FU 0,1	+																								
	CIT 0,01																									
	CIT 0,1																									
	CIT 1																									
	D-CIT 0,01																									
	D-CIT 0,1																									
	D-CIT 1																									
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1																									
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1																									
	CIT 1 + D-CIT 0,1																									
	CIT 0,01 + CIS 0,1																									
	CIT 0,1 + CIS 0,1																									
	CIT 1 + CIS 0,1																									
	CIT 0,01 + 5-FU 0,1																									
	CIS 0,1																									
	5-FU 0,1	+																								
	CIT 0,01	+																								
	CIT 0,1	+																								
	CIT 1	+																								
	D-CIT 0,01	+																								
	D-CIT 0,1	+																								
	D-CIT 1	+																								
	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+																								
	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+																								
CIT 1 + D-CIT 0,1	+																									
CIT 0,01 + CIS 0,1	+																									
CIT 0,1 + CIS 0,1	+																									
CIT 1 + CIS 0,1	+																									
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	+																									

TABELA B.30. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.31. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1																								
	5-FU 0,1																								
	SER 0,01																								
	SER 0,1																								
	SER 1																								
	Nor-SER 0,01																								
	Nor-SER 0,1																								
	Nor-SER 1																								
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1																								
	SER 0,1 + Nor-SER 0,1																								
	SER 1 + Nor-SER 0,1																								
	SER 0,01 + CIS 0,1																								
	SER 0,1 + CIS 0,1																								
	SER 1 + CIS 0,1																								
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1																								
	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1																								
	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1																								
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1																								
	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1																								
	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1																								

TABELA B.32. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚÓ

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
CIS 0,1																				
5-FU 0,1																				
SER 0,01																				
SER 0,1																				
SER 1																				
Nor-SER 0,01																				
Nor-SER 0,1																				
Nor-SER 1																				
SER 0,01 + Nor-SER 0,1																				
SER 0,1 + Nor-SER 0,1																				
SER 1 + Nor-SER 0,1																				
SER 0,01 + CIS 0,1																				
SER 0,1 + CIS 0,1																				
SER 1 + CIS 0,1																				

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.33. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-SER 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-SER 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.34. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1																								
5-FU 0,1	+																							
SER 0,01	+	+																						
SER 0,1	+	+																						
SER 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nor-SER 0,01	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nor-SER 0,1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nor-SER 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 1 + Nor-SER 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + CIS 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SER 0,1 + CIS 0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.35. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1																								
5-FU 0,1	+																							
SER 0,01	+	+																						
SER 0,1	+	+																						
SER 1	+	+																						
Nor-SER 0,01	+	+																						
Nor-SER 0,1	+	+																						
Nor-SER 1	+	+																						
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	+	+																						
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	+	+																						
SER 1 + Nor-SER 0,1	+	+																						
SER 0,01 + CIS 0,1	+	+																						
SER 0,1 + CIS 0,1	+	+																						

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.36. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Nor-SER 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Nor-SER 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 0,01 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 0,1 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SER 1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,01 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.37. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 0,01	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 1	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.38. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora recA w *E. coli* SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	SER 0,01	SER 0,1	SER 1	Nor-SER 0,01	Nor-SER 0,1	Nor-SER 1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1	SER 0,01 + CIS 0,1	SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + CIS 0,1	SER 0,01 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + 5-FU 0,1	Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + CIS 0,1	SER 0,01 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 0,1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1	SER 1 + Nor-SER 0,1 + 5-FU 0,1
CIS 0,1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 0,01	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-SER 1	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 1 + Nor-SER 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,01 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SER 0,1 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.39. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	FLU 0,01	FLU 0,1	FLU 1	Nor-FLU 0,01	Nor-FLU 0,1	Nor-FLU 1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,01 + CIS 0,1	FLU 1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + 5-FU 0,1	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1																				
5-FU 0,1																				
FLU 0,01																				
FLU 0,1																				
FLU 1																				
Nor-FLU 0,01																				
Nor-FLU 0,1																				
Nor-FLU 1																				
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1																				
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1																				
FLU 1 + Nor-FLU 0,1																				
FLU 0,01 + CIS 0,1																				
FLU 0,1 + CIS 0,1																				
FLU 1 + CIS 0,1																				

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	FLU 0,01 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Nor-FLU 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.40. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚŚ

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	FLU 0,01	FLU 0,1	FLU 1	Nor-FLU 0,01	Nor-FLU 0,1	Nor-FLU 1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,01 + CIS 0,1	FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + 5-FU 0,1	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	FLU 0,01	FLU 0,1	FLU 1	Nor-FLU 0,01	Nor-FLU 0,1	Nor-FLU 1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,01 + CIS 0,1	FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + 5-FU 0,1	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.42. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	FLU 0,01	FLU 0,1	FLU 1	Nor-FLU 0,01	Nor-FLU 0,1	Nor-FLU 1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,01 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + 5-FU 0,1	Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01																							
FLU 0,1	-																						
FLU 1	+	+																					
Nor-FLU 0,01	-	-																					
Nor-FLU 0,1	-	-																					
Nor-FLU 1	+	+																					
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	-	-																					
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	-	-																					
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	+	+																					
CIS 0,1	+	+																					
5-FU 0,1	+	+																					
FLU 0,01 + CIS 0,1	+	+																					
FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+																					

TABELA B.43. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	FLU 0,01	FLU 0,1	FLU 1	Nor-FLU 0,01	Nor-FLU 0,1	Nor-FLU 1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,01 + CIS 0,1	FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + 5-FU 0,1	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1
FLU 0,01	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 1	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-FLU 0,01	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-FLU 0,1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-FLU 1	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.44. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	FLU 0,01	FLU 0,1	FLU 1	Nor-FLU 0,01	Nor-FLU 0,1	Nor-FLU 1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,01 + CIS 0,1	FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + CIS 0,1	Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	Nor-FLU 1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01																						
FLU 0,1	-		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-FLU 0,01	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-FLU 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nor-FLU 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 1 + Nor-FLU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.45. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	FLU 0,01																										
	FLU 0,1																										
	FLU 1																										
	Nor-FLU 0,01																										
	Nor-FLU 0,1																										
	Nor-FLU 1																										
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1																										
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1																										
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1																										
	CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5-FU 0,1																										
	FLU 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	FLU 0,01																										
	5-FU 0,1																										
	Nor-FLU 0,01																										
	Nor-FLU 0,1																										
	Nor-FLU 1																										
	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1																										
	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1																										
	FLU 1 + Nor-FLU 0,1																										
	CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5-FU 0,1																										
FLU 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
FLU 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
FLU 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

TABELA B.46. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	FLU 0,01	FLU 0,1	FLU 1	Nor-FLU 0,01	Nor-FLU 0,1	Nor-FLU 1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1	FLU 0,01 + CIS 0,1	FLU 1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + 5-FU 0,1	Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + CIS 0,1	FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1	FLU 1 + Nor-FLU 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FLU 0,01																						
FLU 0,1																						
FLU 1																						
Nor-FLU 0,01																						
Nor-FLU 0,1																						
Nor-FLU 1																						
FLU 0,01 + Nor-FLU 0,1																						
FLU 0,1 + Nor-FLU 0,1																						
FLU 1 + Nor-FLU 0,1																						
CIS 0,1																						
5-FU 0,1																						
FLU 0,01 + CIS 0,1																						
FLU 0,1 + CIS 0,1																						
FLU 1 + CIS 0,1																						

TABELA B.47. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	FLU 0,01																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											</
--	----------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

TABELA B.48. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metaboli i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + 5-FU 0,1	D-CIT 0,1 + CIS 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1	+																							
5-FU 0,1		+																						
CIT 0,01	+	+																						
CIT 0,1	+	+																						
CIT 1	+	+																						
D-CIT 0,01	+	+																						
D-CIT 0,1	+	+																						
D-CIT 1	+	+																						
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+																						
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+																						
CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+																						
CIT 0,01 + CIS 0,1	-	+																						
CIT 0,1 + CIS 0,1	-	+																						
CIT 1 + CIS 0,1	+	+																						
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	+	-																						

TABELA B.49. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metaboli i ich mieszaniny (mg/dm ³)																	
	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + 5-FU 0,1	D-CIT 0,1 + CIS 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1
CIS 0,1	+																
5-FU 0,1	+																
CIT 0,01	+																
CIT 0,1	+																
CIT 1	+																
D-CIT 0,01	+																
D-CIT 0,1	+																
D-CIT 1	+																
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+																
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+																
CIT 1 + D-CIT 0,1	+																
CIT 0,01 + CIS 0,1	-																
CIT 0,1 + CIS 0,1	-																
CIT 1 + CIS 0,1	+																
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	+																
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+																
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+																
CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	+																
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	+																
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	+																
D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+																
CIT 1 + 5-FU 0,1	+																
D-CIT 0,1 + CIS 0,1	+																
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+																
CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	+																
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	+																
CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+																
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+																
CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+																
CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	+																

TABELA B.50. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności *E. coli* inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚÓ

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	D-CIT 0,1 + CIS 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + 5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.51. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + 5-FU 0,1	CIS 0,1 + 5-FU 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1
CIS 0,1		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,01	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 1	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.52. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1
CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.54. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + 5-FU 0,1	D-CIT 0,1 + CIS 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.55. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS

Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1
CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-FU 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-CIT 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + D-CIT 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,01 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + CIS 0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

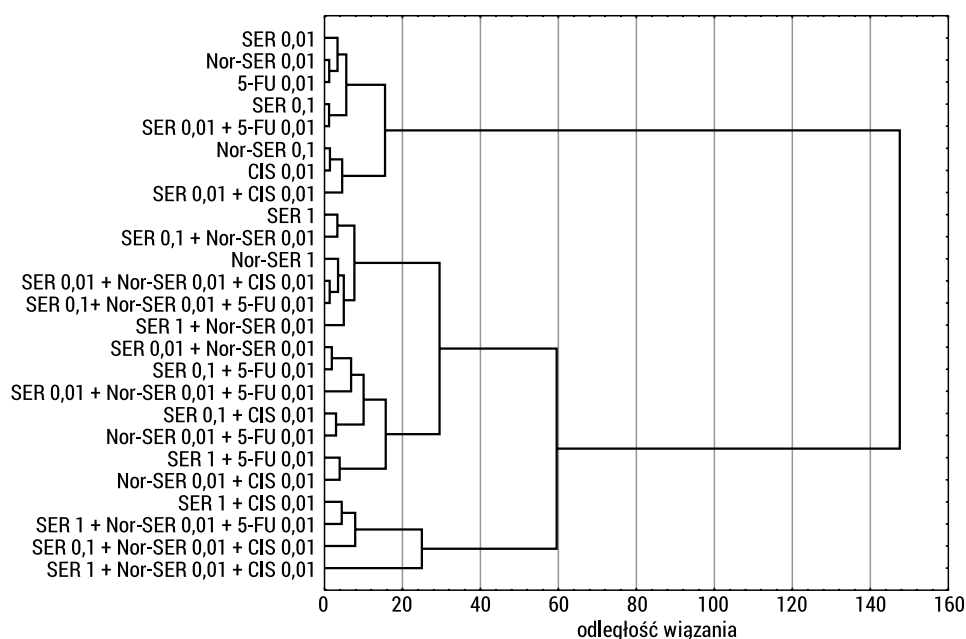
Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + 5-FU 0,1	D-CIT 0,1 + CIS 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1
	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

TABELA B.56. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora *recA* w *E. coli* SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO

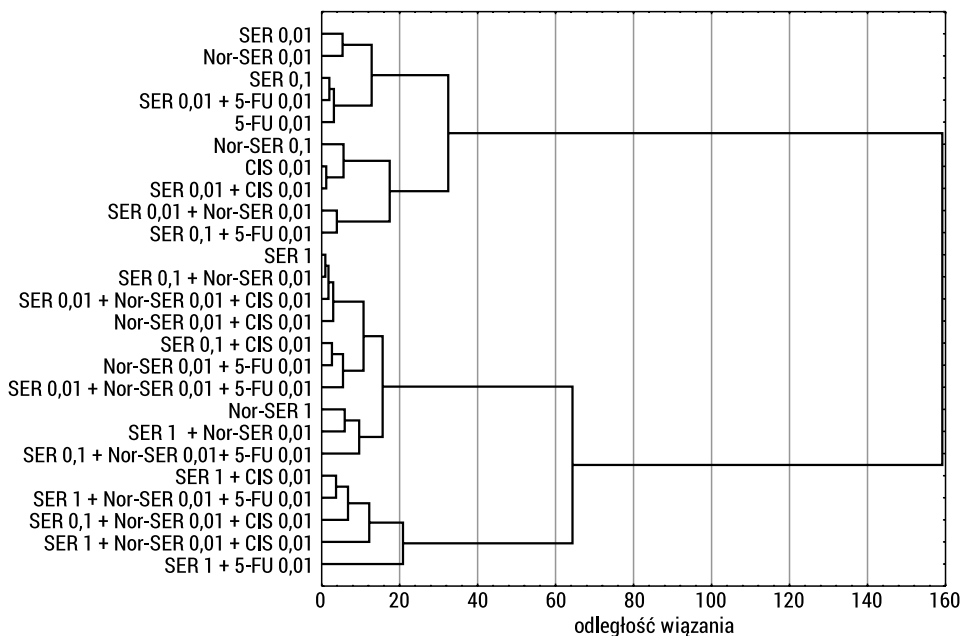
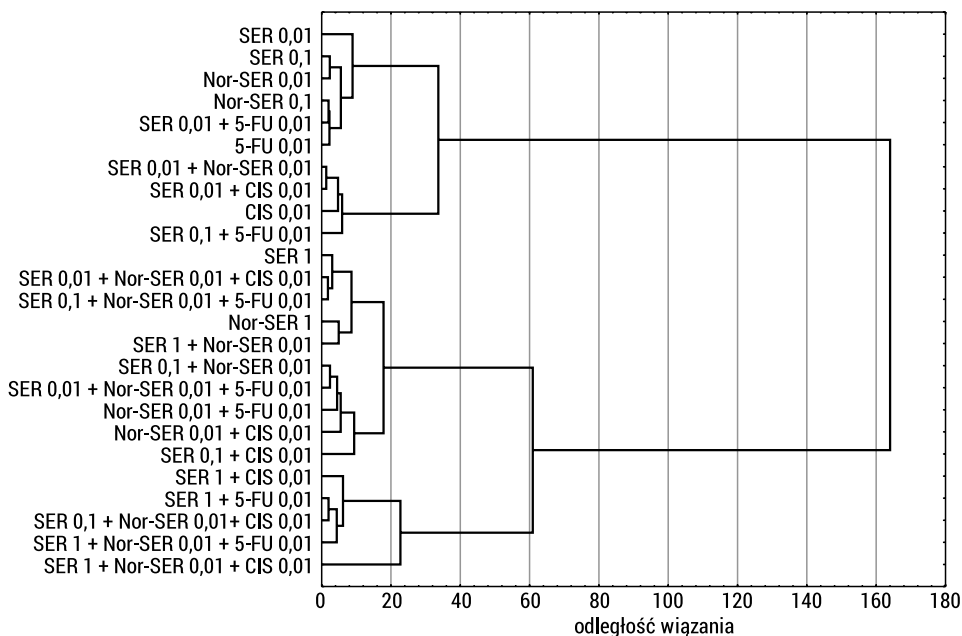
Substancje czynne leków, metabolitu i ich mieszaniny (mg/dm ³)																
	CIS 0,1	5-FU 0,1	CIT 0,01	CIT 0,1	CIT 1	D-CIT 0,01	D-CIT 0,1	D-CIT 1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1	CIT 0,1 + D-CIT 0,1	CIT 1 + D-CIT 0,1	CIT 0,01 + CIS 0,1	CIT 0,1 + CIS 0,1	CIT 1 + CIS 0,1	D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1	CIT 0,01 + D-CIT 0,1 + 5-FU 0,1
CIS 0,1		+														
5-FU 0,1	+															
CIT 0,01	+															
CIT 0,1	+															
CIT 1	+															
D-CIT 0,01	+															
D-CIT 0,1	+															
D-CIT 1	+															
CIT 0,01 + D-CIT 0,1	+															
CIT 0,1 + D-CIT 0,1	+															
CIT 1 + D-CIT 0,1	+															
CIT 0,01 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 0,1 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT 1 + CIS 0,1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

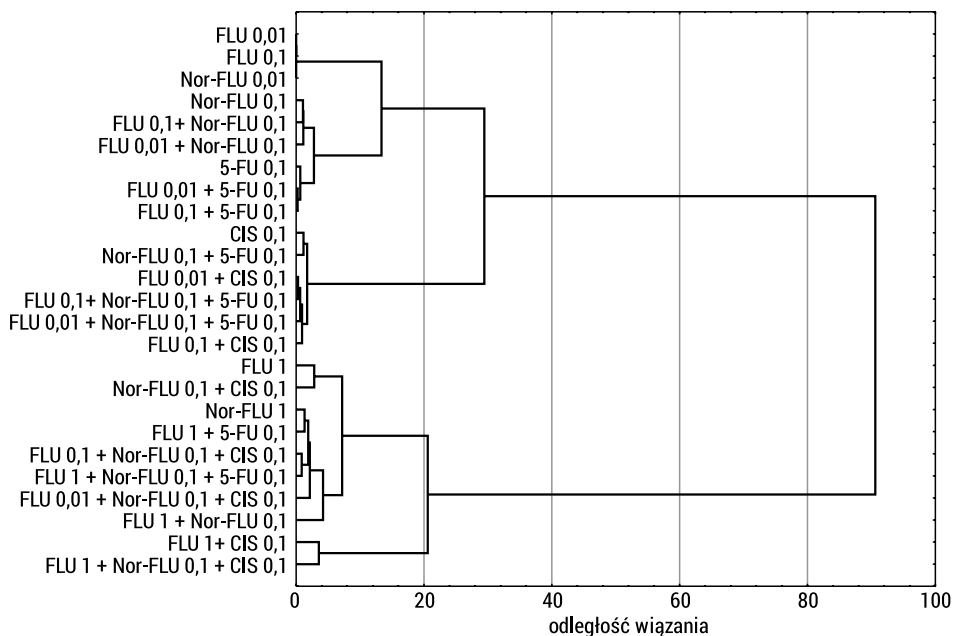
Załącznik C

Analiza podobieństwa działania badanych substancji czynnych leków antydepresyjnych, metabolitów, leków antynowotworowych oraz ich mieszanin na żywotność hodowli *E. coli*, fluorescencję białka GFP w hodowli *E. coli* MM294-GFP oraz indukcję promotora *recA* w hodowli *E. coli* SM342 *recA:luxCDABE* w trzech badanych środowiskach (MH, ŚS oraz ŚO).

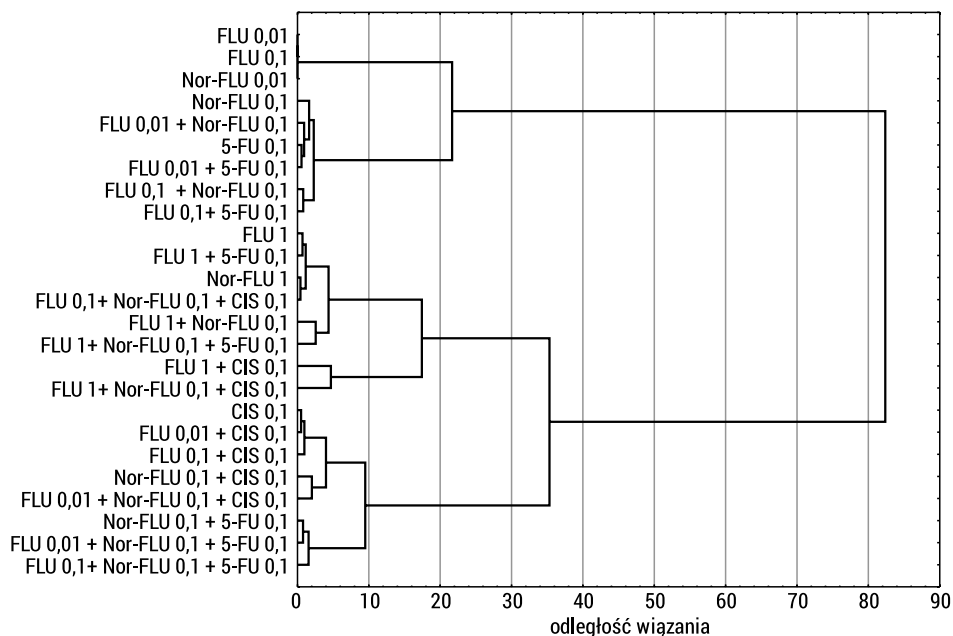


RYC. C.1. Podobieństwo inhibicji żywotności *E. coli* K-12 w MH wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin

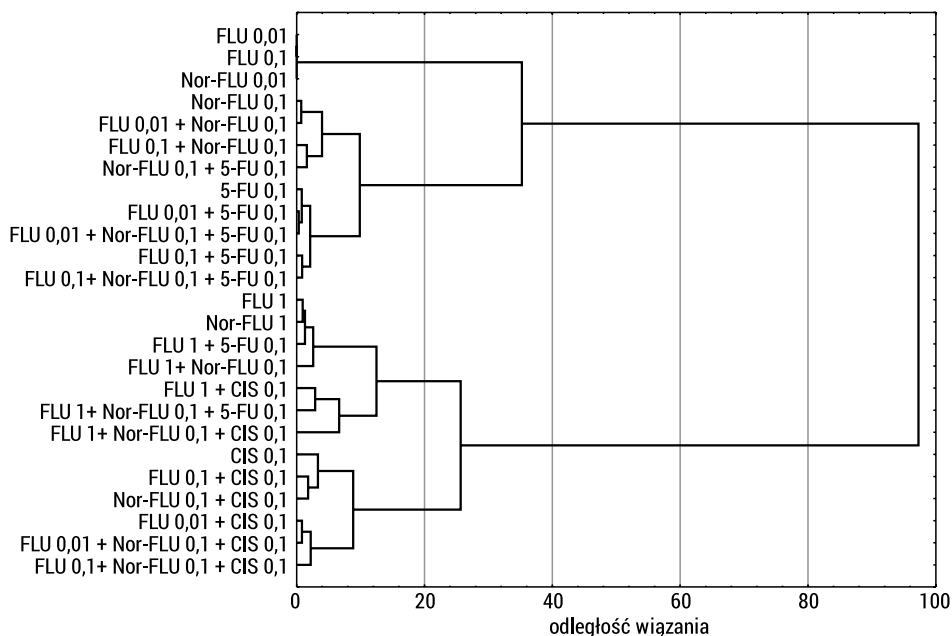




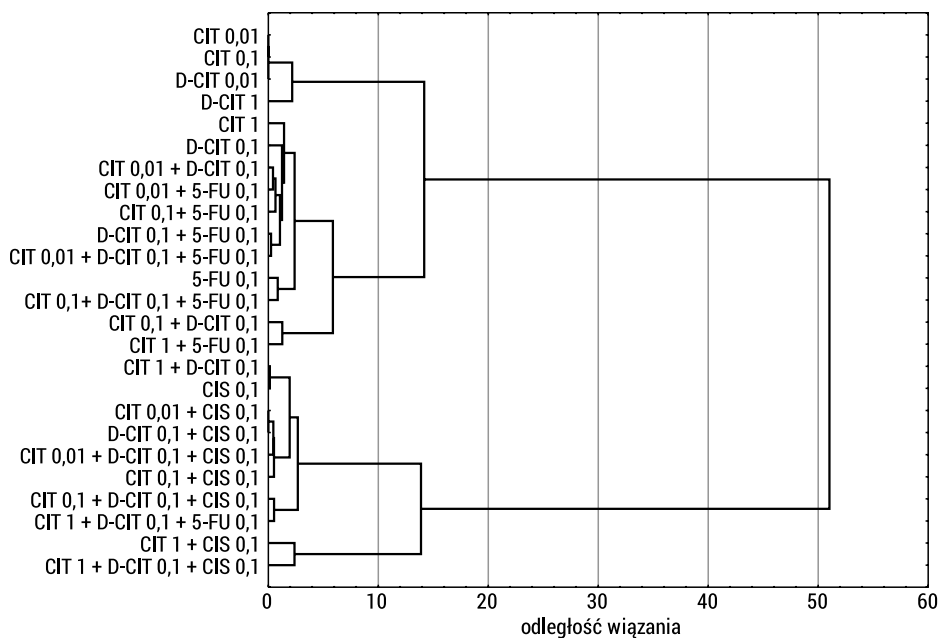
RYC. C.4. Podobieństwo inhibicji żywotności *E. coli* K-12 w MH wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



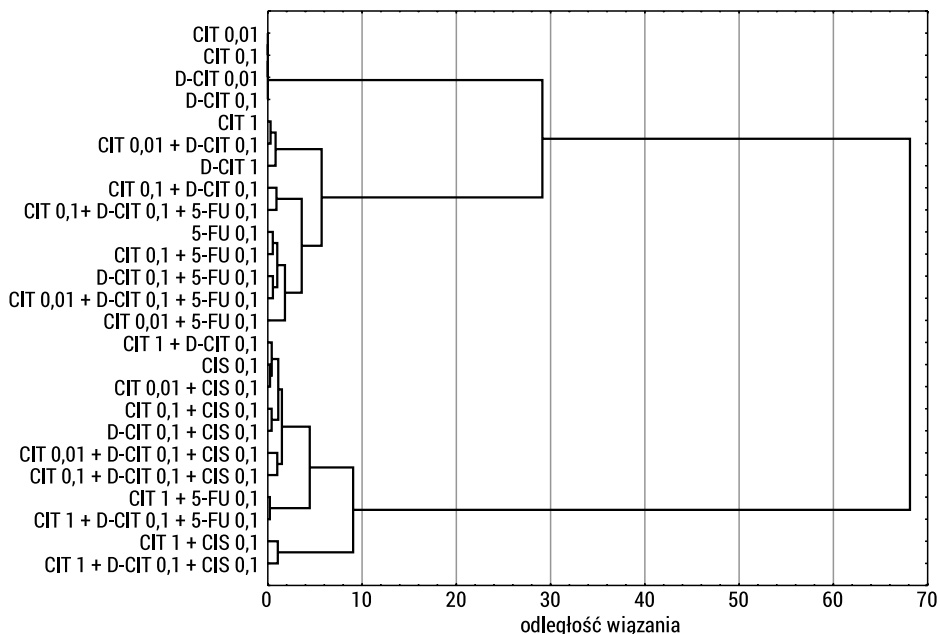
RYC. C.5. Podobieństwo inhibicji żywotności *E. coli* K-12 w SS wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



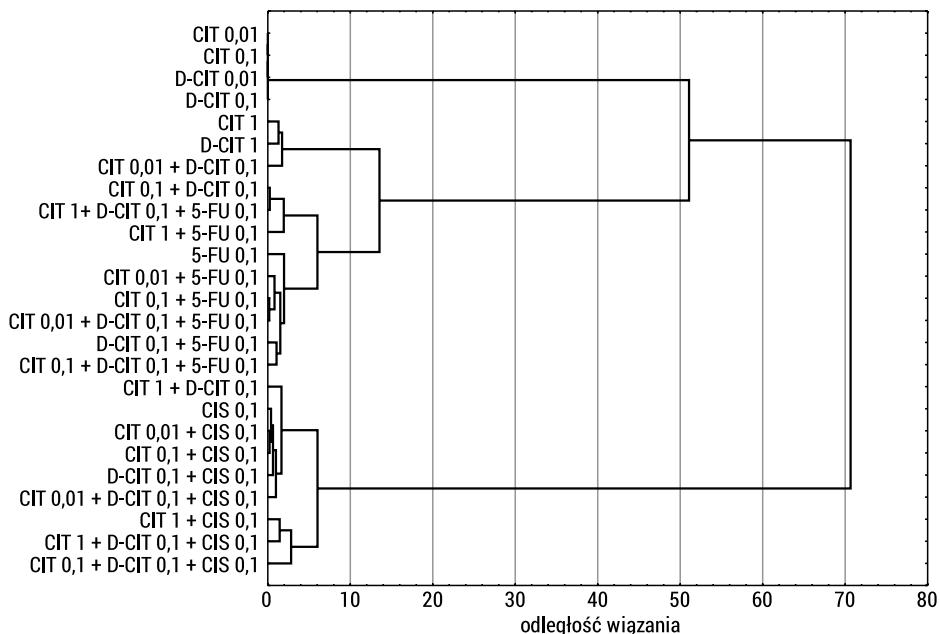
RYC. C.6. Podobieństwo inhibicji żywotności *E. coli* K-12 w ŚO wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



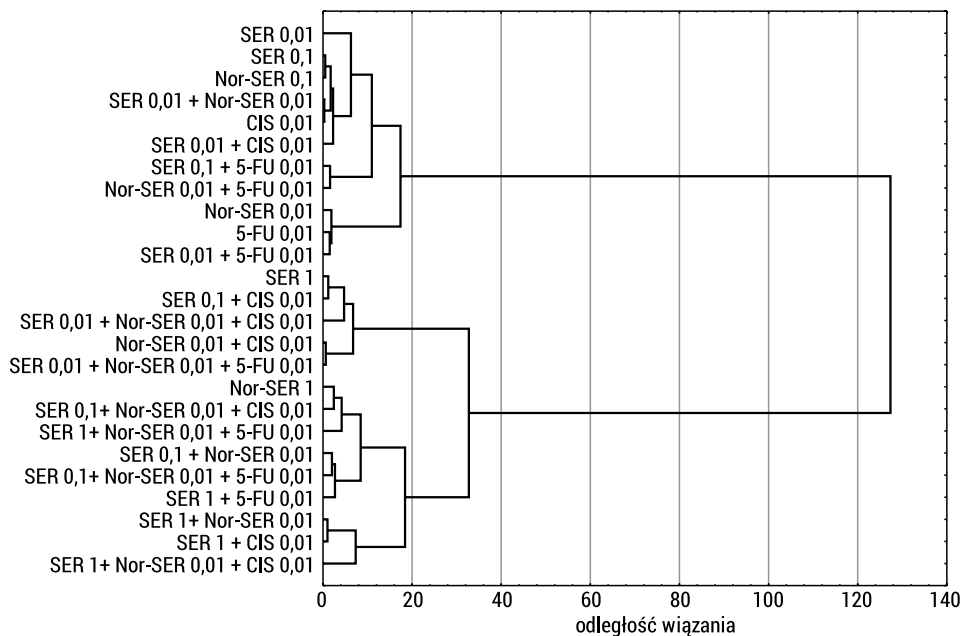
RYC. C.7. Podobieństwo inhibicji żywotności *E. coli* K-12 w MH wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



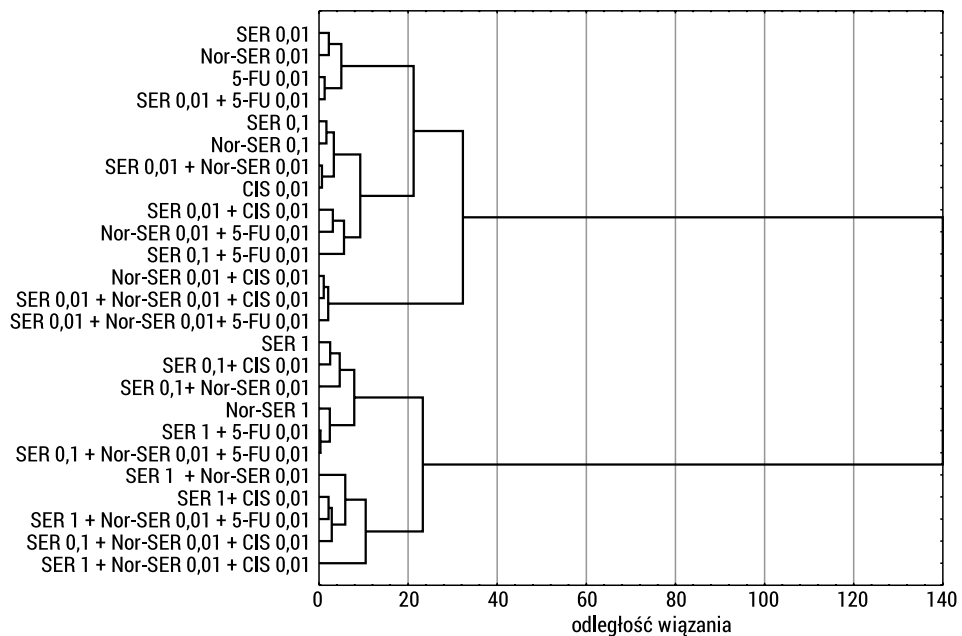
RYC. C.8. Podobieństwo inhibicji żywotności *E. coli* K-12 w ŚS wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



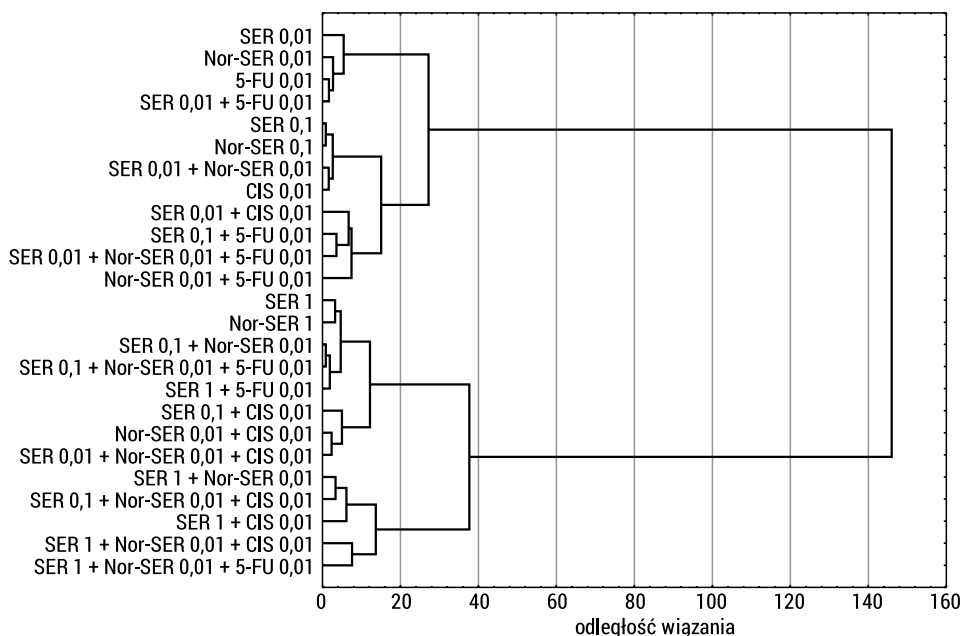
RYC. C.9. Podobieństwo inhibicji żywotności *E. coli* K-12 w ŚO wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



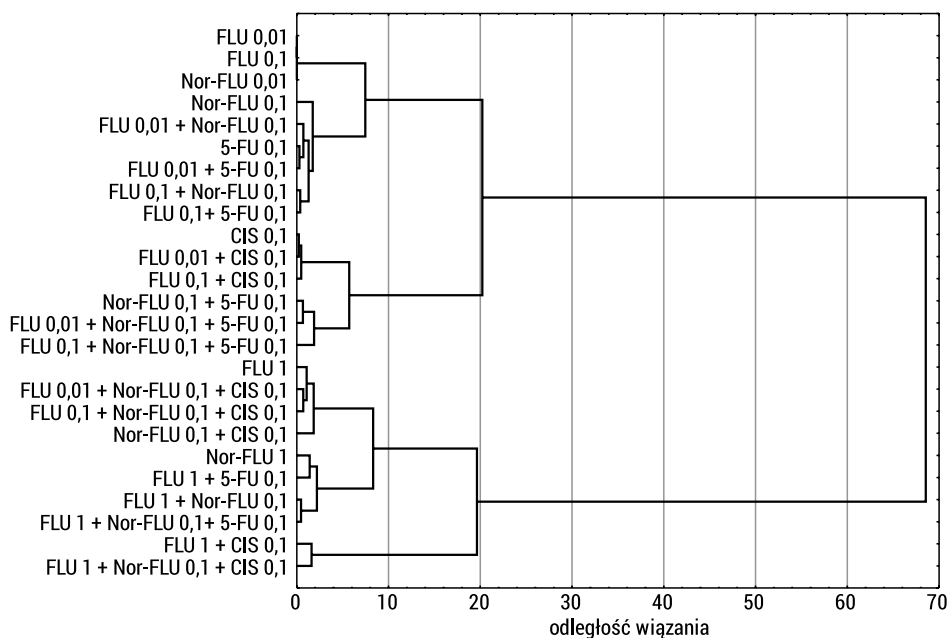
RYC. C.10. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 w MH wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



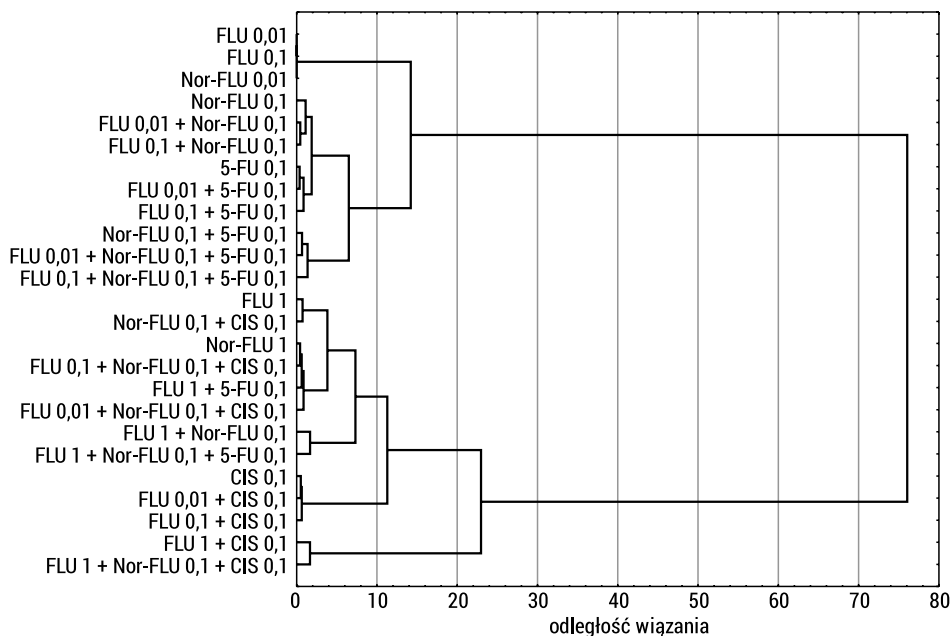
RYC. C.11. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 w SS wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



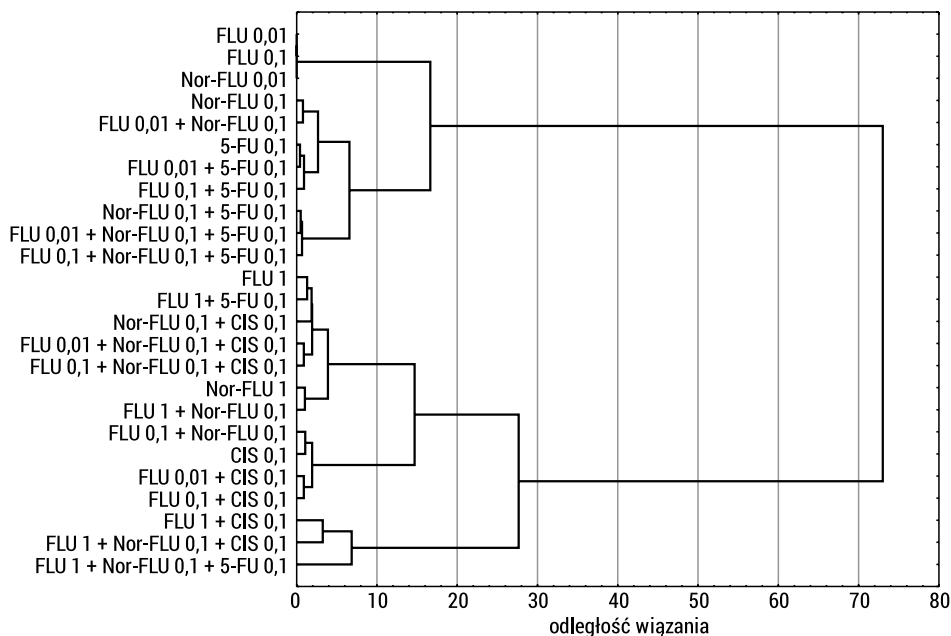
RYC. C.12. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 w ŚO wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



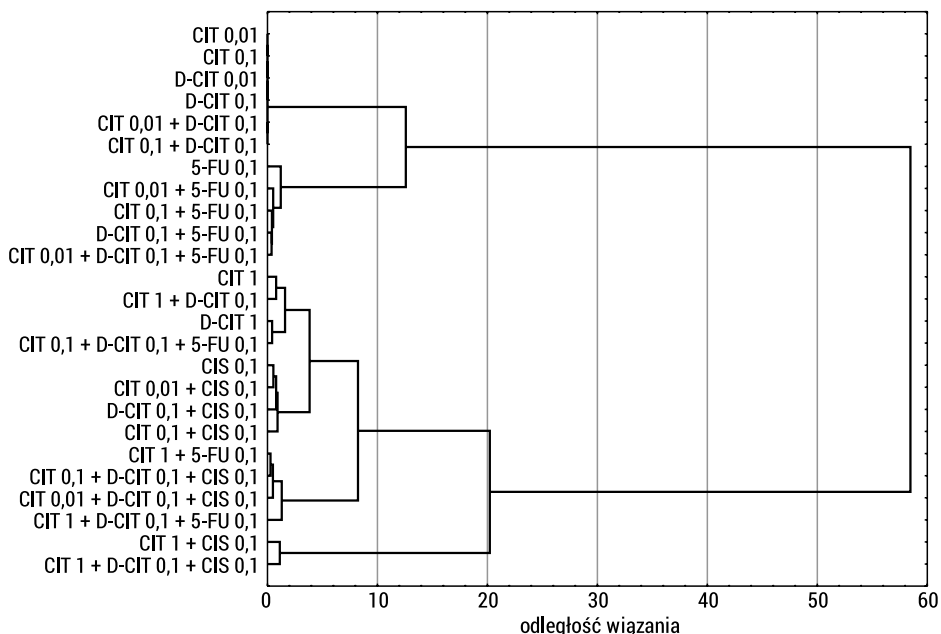
RYC. C.13. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 w MH wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



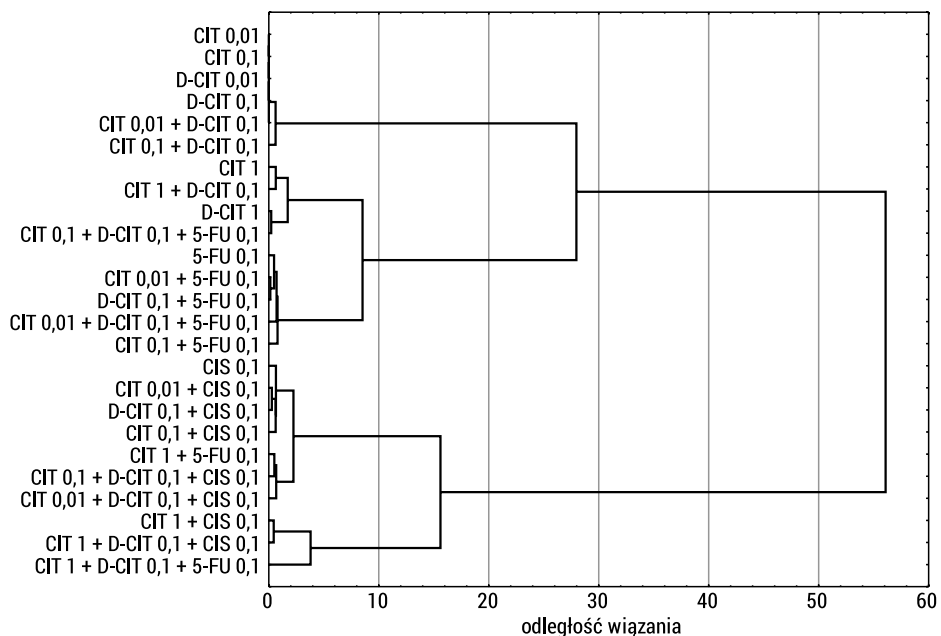
RYC. C.14. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 w ŚS wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



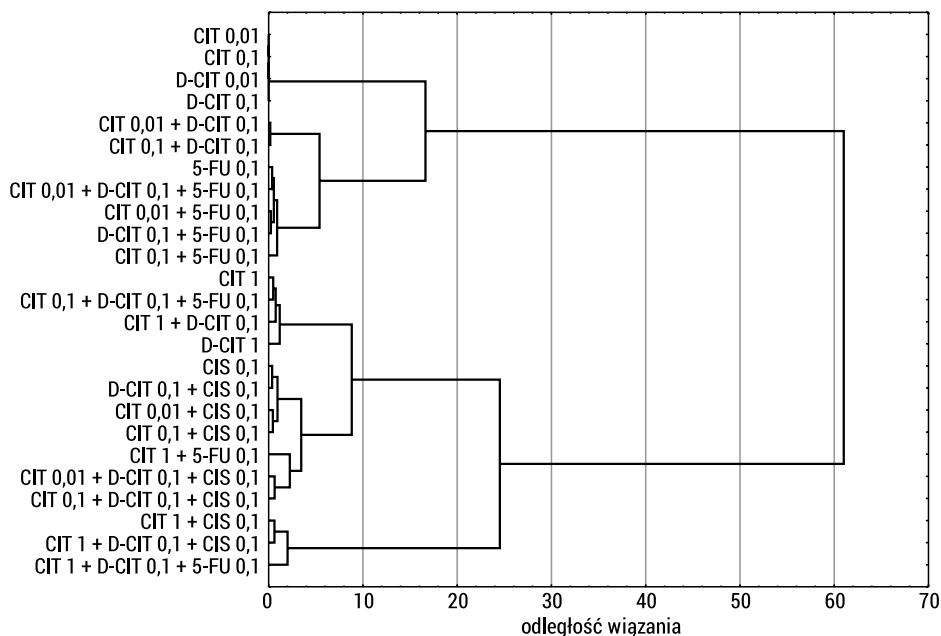
RYC. C.15. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 w ŚO wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



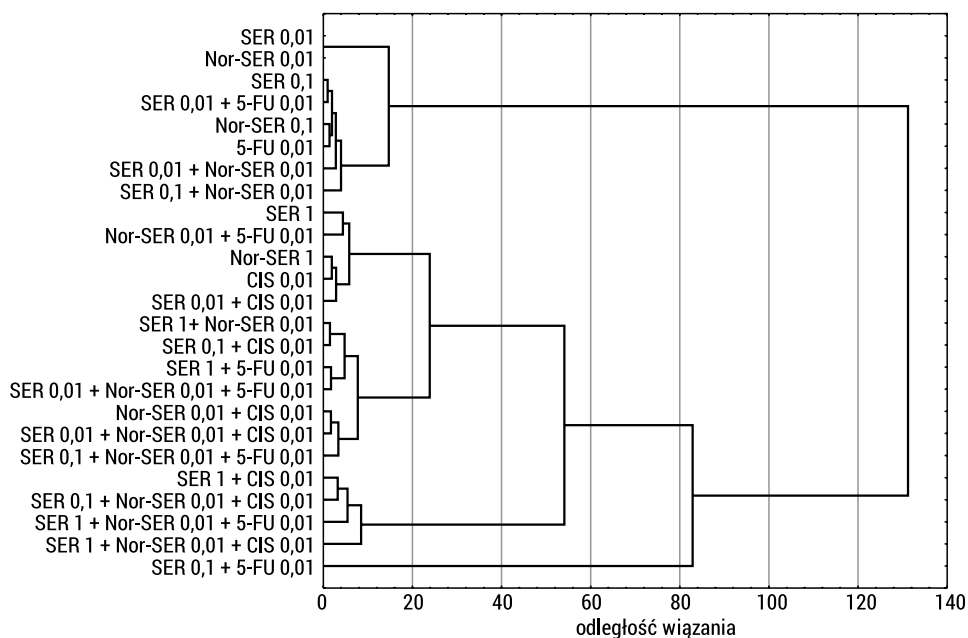
RYC. C.16. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 w MH wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



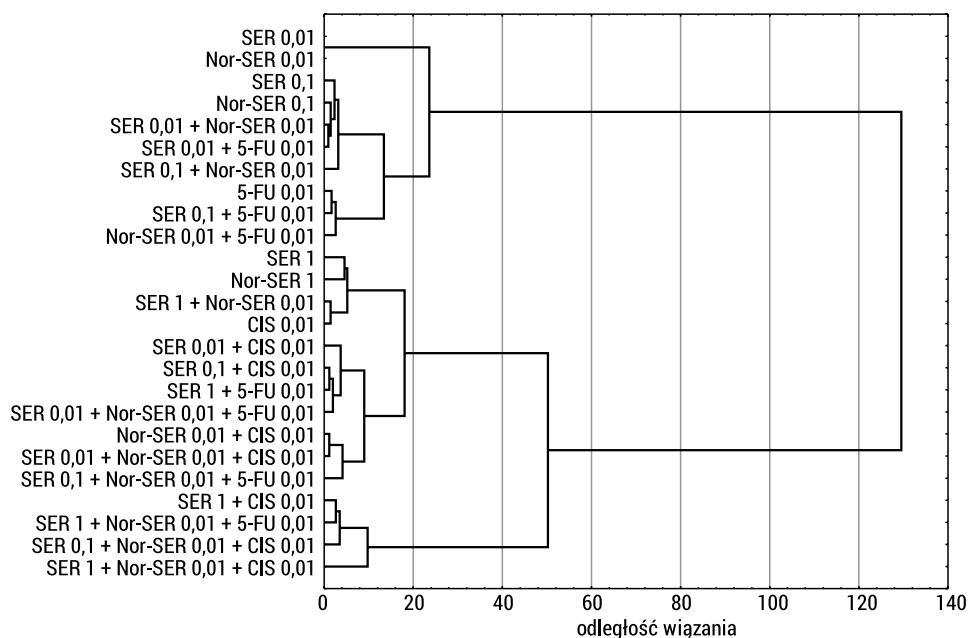
RYC. C.17. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 w ŚS wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



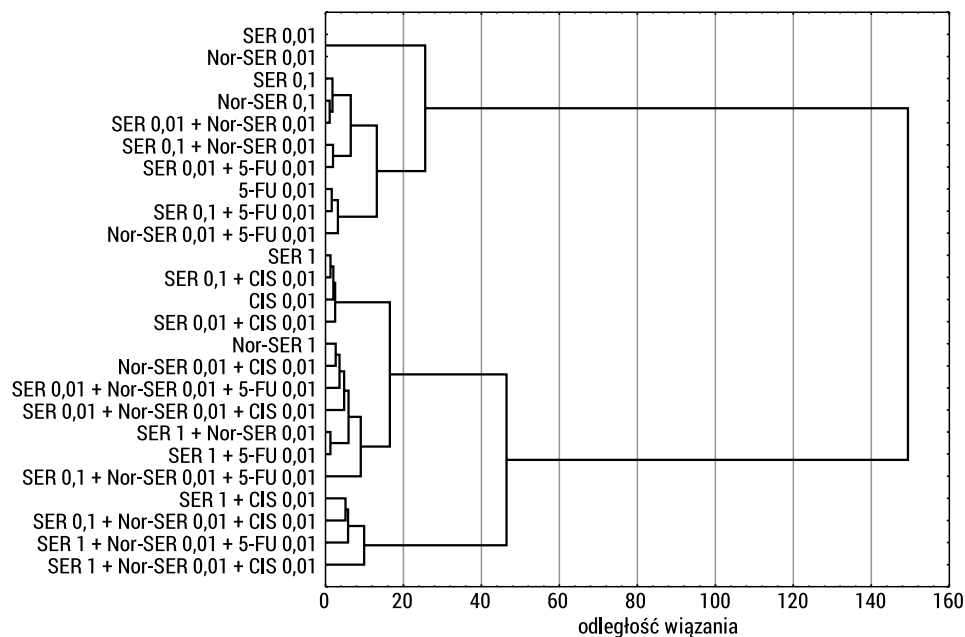
RYC. C.18. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w *E. coli* MM294 w ŚO wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszanin



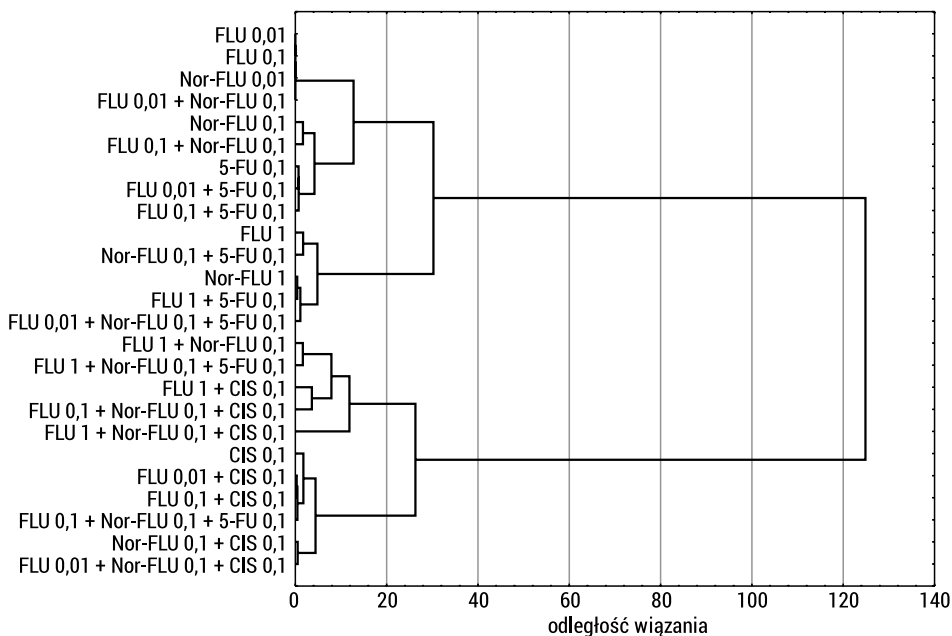
RYC. C.19. Podobieństwo indukcji promotora *recA* w MH wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



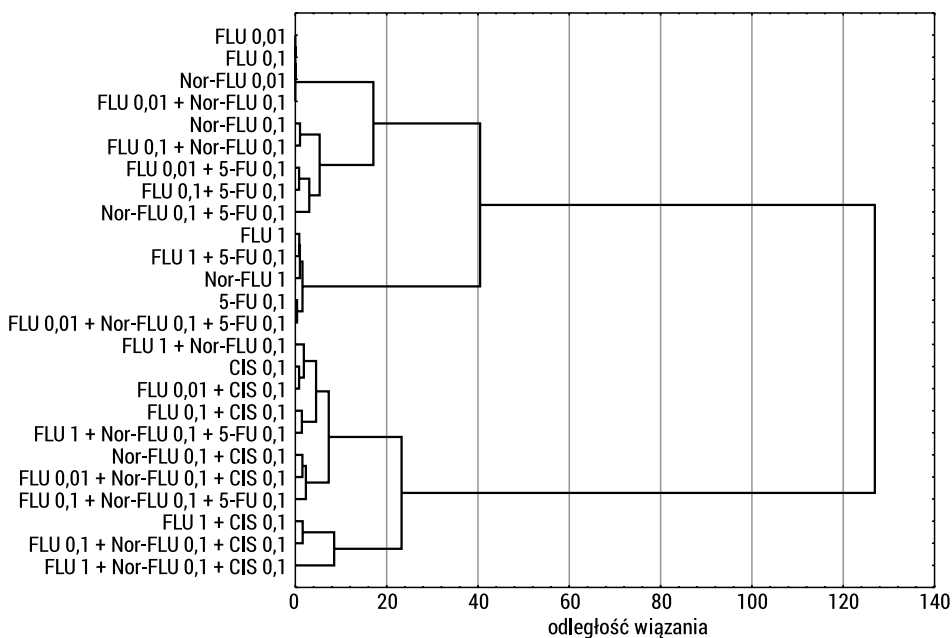
RYC. C.20. Podobieństwo indukcji promotora *recA* w ŚS wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



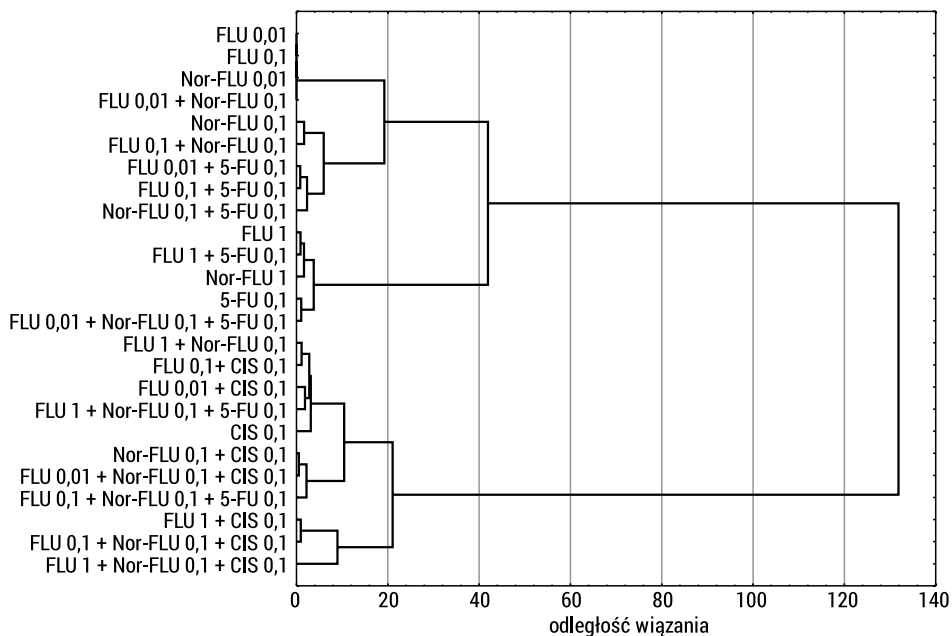
RYC. C.21. Podobieństwo indukcji promotora *recA* w ŚO wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



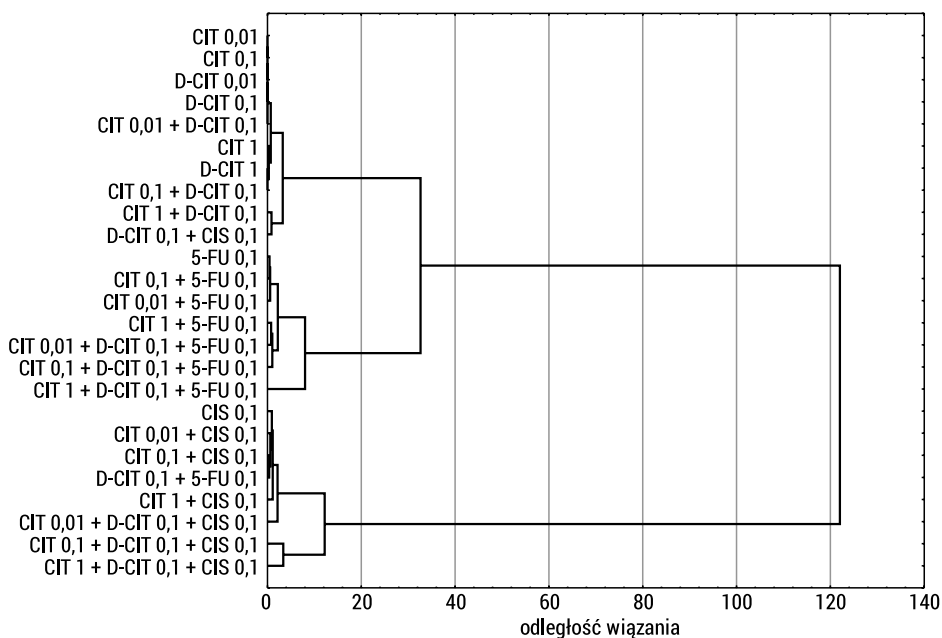
RYC. C.22. Podobieństwo indukcji promotora *recA* w MH wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin



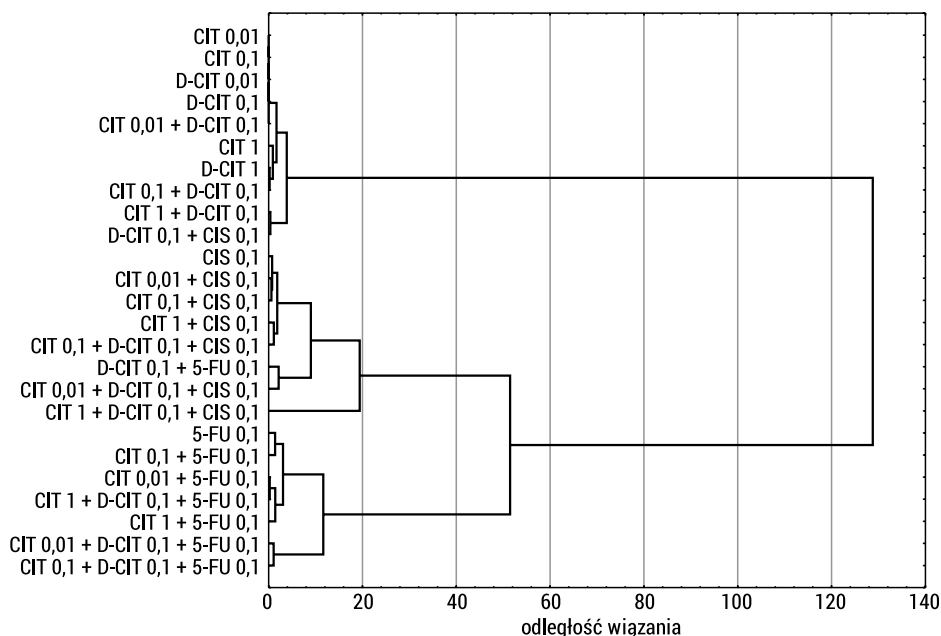
RYC. C.23. Podobieństwo indukcji promotora *recA* w ŚS wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin



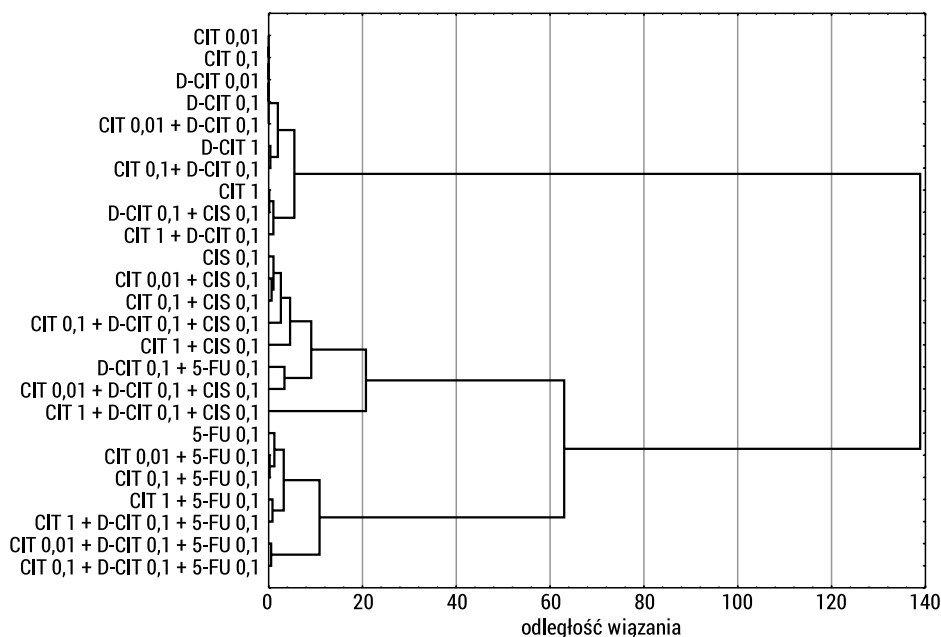
RYC. C.24. Podobieństwo indukcji promotora *recA* w ŚO wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin



RYC. C.25. Podobieństwo indukcji promotora *recA* w MH wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



RYC. C.26. Podobieństwo indukcji promotora *recA* w ŚS wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin



RYC. C.27. Podobieństwo indukcji promotora *recA* w ŚS wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin

Literatura

1. Abd-El-Haleem D., Ripp S., Zaki S., Sayler G.S., 2007. *Detection of nitrate/nitrite bio-availability in wastewater using a luxCDABE-based Klebsiella oxytoca bioluminescent bioreporter*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, 8, 1254–1261.
2. Almomani F.A., Shawaqfah M., Bhosale R.R., Kumar A., 2016. *Removal of emerging pharmaceuticals from wastewater by ozone-based advanced oxidation processes*. Environmental Progress & Sustainable Energy, 35, 982–999.
3. Alonso J.J.S., El Kori N., Melián-Martel N., Del Río-Gamero B., 2018. *Removal of ciprofloxacin from seawater by reverse osmosis*. Journal of Environmental Management, 1, 217, 337–345.
4. Ames B.N., McCann J., 1976. *Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS, 73, 950–954.
5. Amorim C.L., Maia A.S., Mesquita R.B.R., Rangel A.O.S.S., van Loosdrecht M.C.M., Tiritan M.E., Castro P.M.L., 2014. *Performance of aerobic granular sludge in a sequencing batch bioreactor exposed to ofloxacin, norfloxacin and ciprofloxacin*. Water Research, 50, 101–113.
6. Aristi I., Casellas M., Elosegi A., Insa S., Petrovic M., Sabater S., Acuña V., 2016. *Nutrients versus emerging contaminants – or a dynamic match between subsidy and stress effects on stream biofilms*. Environmental Pollution, 212, 208–215.
7. Ayaz M., Subhan F., Ahmed J., Khan A.U., Ullah F., Sadiq A., Syed N.I.H., Ullah I., Hussain S., 2015. *Citalopram and venlafaxine differentially augment antimicrobial properties of antibiotics*. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 72, 1269–1278.
8. Ayaz M., Subhan F., Ahmed J., Khan A.U., Ullah F., Ullah I., Ali G., Syed N.I.H., Hussain S., 2015. *Sertraline enhances the activity of antimicrobial agents against pathogens of clinical relevance*. Journal of Biological Research – Thessaloniki, 22, 1–8.
9. Aznar R., Sánchez-Brunete C., Albero B., Rodríguez A.J., Tadeo L.J., 2014. *Occurrence and analysis of selected pharmaceutical compounds in soil from Spanish agricultural fields*. Environmental Science Pollution Research, 21, 4772–4782.
10. Backhaus T., 2014. *Medicines, shaken and stirred: a critical review on the ecotoxicology of pharmaceutical mixtures*. Philosophical Translocation B, 369, 1–11.
11. Battal D., Yalin S., Eker E.D., Aktas E., Sahin N.O., Cebo M., Berköz M., 2014. *Possible role of selective serotonin reuptake inhibitor sertraline on oxidative stress responses*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 18, 477–484.
12. Baumstark-Khan Ch., Palm M., Wehner J., Okabe M., Ikawa M., Horneck G., 1999. *Green fluorescent protein (GFP) as a marker for cell viability after UV irradiation*. Journal of Fluorescence, 9, 1, 37–43.

13. Baumstark-Khan Ch., Rabbow E., Rettberg P., Horneck G., 2007. *The combined bacterial Lux-Fluoro test for the detection and quantification of genotoxic and cytotoxic agents in Surface water: Results from the „Technical Workshop on Genotoxicity Biosensing”*. Aquatic Toxicology, 85, 209–218.
14. Behzadian F., Barjeste H., Hosseinkhani S., Zarei A.R., 2011. *Construction and characterization of Escherichia coli whole-cell biosensors for toluene and related compounds*. Current Microbiology, 62, 2, 690–696.
15. Belyaev I., 2011. *Toxicity and SOS-response to ELF magnetic fields and nalidixic acid in E. coli cells*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 1, 18, 56–61.
16. Besse J.P., Garric J., 2008. *Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation*. Toxicology Letters, 176, 104–123.
17. Bhalla N., Jolly P., Formisano N., Estrela P., 2016. *Introduction to biosensors*. Essays Biochemistry, 60, 1–8.
18. Biran A., Ben Yoav H., Yagur-Kroll S., Pedahzur R., Buchinger S., Shacham-Diamand Y., Reifferscheid G., Belkin S., 2011. *Microbial genotoxicity bioreporters based on sulA activation*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 400, 9, 3013–3024.
19. Bogdanowicz A., Wąsowski J., 2018. *Efektywność usuwania farmaceutyków i ich metabolitów w procesach uzdatniania wody*. Gaz, Woda i Technika Sanitarna, 2, 63–71.
20. Bohnert J.A., Szymaniak-Vits M., Schuster S., Kern W.V., 2011. *Efflux inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors in Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66, 2057–2060.
21. Boroń M., Pawlas K., 2015. *Farmaceutyki w środowisku wodnym – przegląd literatury*. Problemy Higieny i Epidemiologii, 96, 2, 357–363.
22. Bossus M.C., Guler Y.Z., Short S.J., Morrison E.R., Ford A.T., 2014. *Behavioural and transcriptional changes in the amphipod Echinogammarus marinus exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline*. Aquatic Toxicology, 151, 46–56.
23. Branchet P., Arpin-Pont L., Piram A., Boissery P., Wong-Wah-Chung P., Doumenq P., 2021. *Pharmaceuticals in the marine environment: What are the present challenges in their monitoring?* Science of the Total Environment, 766, 1426–1444.
24. Calisto V., Esteves V.I., 2009. *Psychiatric pharmaceuticals in the environment*. Chemosphere, 77, 1257–1274.
25. Camacho-Muñoz D., Martín J., Santos J.L., Aparicio L., Alonso E., 2010. *Occurrence, temporal evolution and risk assessment of pharmaceutically active compounds in Doñana Park (Spain)*. Journal of Hazardous Material, 183, 602–608.
26. Caracciolo A.B., Topp E., Grenni P., 2015. *Pharmaceuticals in the environment: Biodegradation and effects on natural microbial communities. A review*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 106, 25–36.
27. Cargouët M., Perdiz D., Mouatassim-Souali A., Tamisier-Karolak S., Levi Y., 2004. *Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France)*. Science of the Total Environment, 324, 55–66.
28. Celiz M.D., Tso J., Aga D.S., 2009. *Pharmaceutical metabolites in the environment: analytical challenges and ecological risks*. Environmental Toxicology and Chemistry, 28, 2473–2484.

29. Chen T.S, Chen T.C, Yeh K.J, Chao H.R, Liaw E.T, Hsieh C.Y., Chen K.C, Hsieh L.T, Yeh Y.L., 2010. *High estrogen concentrations in receiving river discharge from a concentrated livestock feedlot*. Science of the Total Environment, 408, 16, 3223–3230.
30. Cheng H.H., Liu C.B., Lei Y.Y., Chiu Y.C., Mangalindan J., Wu C.H., Wu Y.J., Whang L.M., 2019. *Biological treatment of DMSO-containing wastewater from semiconductor industry under aerobic and methanogenic conditions*. Chemosphere, 236, 124–129.
31. Chiang Y.R., Wei S.S.T., Wang P.H., Wu P.H., Yu Ch.P., 2019. *Microbial degradation of steroid sex hormones: implications for environmental and ecological studies*. Microbial Biotechnology, 1–24.
32. Crane M., Watts C., Boucard T., 2006. *Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals*. Science of the Total Environment, 367, 23–41.
33. Cunha S.C., Pena A., Fernandes J.O., 2017. *Mussels as bioindicators of diclofenac contamination in coastal environments*. Environmental Pollution, 225, 354–360.
34. Cydzik-Kwiatkowska A., Bernat K., Zielińska M., Bułkowska K., Wojnowska-Baryła I., 2017. *Aerobic granular sludge for bisphenol A (BPA) removal from wastewater*. International Biodeterioration & Biodegradation, 122, 1–11.
35. Dantas R.F., Sans C., Esplugas S., 2011. *Ozonation of propranolol: transformation, biodegradability, and toxicity assessment*. Journal of Environmental Engineering, 137, 754–759.
36. Dawas-Massalha A., Gur-Reznik S., Lerman S., Sabbah I., Dosoretz C.G., 2014. *Co-metabolic oxidation of pharmaceutical compounds by a nitrifying bacterial enrichment*. Bioresource Technology, 167, 336–342.
37. Deavall D.G., Martin E.A., Horner J.M., Roberts R., 2012. *Drug-induced oxidative stress and toxicity*. Journal of Toxicology, 1–13.
38. De la Cruz N., Esquius L., Grandjean D., Magnet A., Tungler A., Alencastro L.F. de, Pulgarín C., 2013. *Degradation of emergent contaminants by UV, UV/H₂O₂ and neutral photo-Fenton at pilot scale in a domestic wastewater treatment plant*. Water Research, 47, 5836–5845.
39. Deng J., Zhou F., Hou W., Silver Z., Wong Ch.Y., Chang O., Huang E., Zuo Q.K., 2020. *The prevalence of depression, anxiety, and sleep disturbances in COVID-19 patients: a meta-analysis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1–22.
40. Desbiolles F., Malleret L., Tiliacos C., Wong-Wah-Chung P., Laffont-Schwob I., 2018. *Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment?* Science of the Total Environment, 639, 1334–1348.
41. Dębska J., Kot-Wasik A., Namieśnik J., 2003. *Pozostałości środków farmaceutycznych w środowisku – przemiany, stężenia, oznaczanie*. Chemia i Inżynieria Ekologiczna, 10, 724–750.
42. Díaz-García D., Ardiles P.R., Prashar S., Rodríguez-Diéguez A., Páez P.L., Gómez-Ruiz S., 2019. *Preparation and study of the antibacterial applications and oxidative stress induction of copper maleamate-functionalized mesoporous silica nanoparticles*. Pharmaceutics, 14, 11–23.
43. Ding J., Lu G., Li S., Nie Y., Liu J., 2015. *Biological fate and effects of propranolol in an experimental aquatic food chain*. Science of the Total Environment, 532, 31–39.

44. Dorival-García N., Zafra-Gómez A., Camino-Sánchez F.J., Navalón A., Vilchez J.L., 2013. *Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison of the efficiency of three extraction techniques*. Talanta, 106, 104–118.
45. Dudziak M., Luks-Betlej K., 2004. *Ocena obecności estrogenów – steroidowych hormonów płciowych – w wybranych wodach rzecznych w Polsce*. Ochrona Środowiska, 26, 1, 21–24.
46. Eriksson J., Svanfelt J., Kronberg L., 2010. *A photochemical study of diclofenac and its major transformation products*. Photochemistry and Photobiology, 86, 528–532.
47. Fatta-Kassinos D., Meric S., Nikolaou A., 2011. *Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 399, 251–275.
48. Ferik F., Mišík M., Grummt T., Majera B., Fuerhacker M., Buchmann Ch., Vital M., Uhl M., Lenz K., Grillitsch B., Parzefall W., Nersesyan A., Knasmüller S., 2009. *Genotoxic effects of wastewater from an oncological ward*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 672, 69–75.
49. Foletto V.S., Serafin M.B., Bottega A., Rosa T.F. da, de S. Machado C., Coelho S.S., Hörner R., 2020. *Repositioning of fluoxetine and paroxetine: study of potential antibacterial activity and its combination with ciprofloxacin*. Medicinal Chemistry Research, 29, 556–563.
50. Foster H.R., Burton G.A., Basu N., Werner E.E., 2010. *Chronic exposure to fluoxetine (Prozac) causes developmental delays in Rana pipiens larvae*. Environmental Toxicology and Chemistry, 29, 2845–2850.
51. Franzellitti S., Buratti S., Capolupo M., Du B., Haddad S.P., Chambliss C.K., Brooks B.W., Fabbri E., 2014. *An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels*. Aquatic Toxicology, 151, 14–26.
52. Gálvez-Ontiveros Y., Páez S., Monteagudo C., Rivas A., 2020. *Endocrine Disruptors in food: impact on gut microbiota and metabolic diseases*. Nutrients, 12, 1–40.
53. Ghafoori S., Mowla A., Jahani R., Mehrvar M., Chan Ph.K., 2015. *Sonophotolytic degradation of synthetic pharmaceutical wastewater: statistical experimental design and modeling*. Journal of Environmental Management, 150, 128–137.
54. Gholami M., Mirzaei R., Kalantary R.R., Sabzali A., Gatei F., 2012. *Performance evaluation of reverse osmosis technology for selected antibiotics removal from synthetic pharmaceutical wastewater*. Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering, 3, 9–19.
55. Giebułtowicz J., Nałęcz-Jawecki G., 2014. *Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 104, 103–109.
56. Gil-Ad I., Zolokov A., Lomnitski L., Taler M., Bar M., Luria D., Ram E., Weizman A., 2008. *Evaluation of the potential anti-cancer activity of the antidepressant sertraline in human colon cancer cell lines and in colorectal cancer-xenografted mice*. International Journal of Oncology, 33, 277–286.
57. Godoy A.A., Kummrow F., Pamplin P.A.Z., 2015. *Occurrence, ecotoxicological effects and risk assessment of antihypertensive pharmaceutical residues in the aquatic environment – A review*. Chemosphere, 138, 281–291.

58. Goolsby E.W., Mason Ch.M., Wojcik J.T., Jordan A.M., Black M.C., 2013. *Acute and chronic effects of diphenhydramine and sertraline mixtures in Ceriodaphnia dubia*. Environmental Toxicology and Chemistry, 32, 2866–2869.
59. Gornik T., Kovacic A., Heath E., Hollender J., Kosjek T., 2020. *Biotransformation study of antidepressant sertraline and its removal during biological wastewater treatment*. Water Research, 181, 1158–1164.
60. Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., García-Medina S., Valdés-Alanís A., Islas-Flores H., Neri-Cruz N., 2014. *Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in Daphnia magna*. Drug and Chemical Toxicology, 37, 4, 391–399.
61. Gracia-Lor E., Sancho V.J., Hernández F., 2011. *Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography, 1218, 2264–2275.
62. Greń I., 2012. *Mikrobiologiczne przemiany ksenobiotyków*. Chemik, 66, 8, 835–838.
63. Guzik U., Hupert-Kocurek K., Mazur A., Wojcieszńska D., 2013. *Biotransformacja wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych w środowisku*. Bromatologia i Chemia Toksykologiczna, 1, 105–112.
64. Hata T., Kawai S., Okamura H., Nishida T., 2010. *Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus Phanerochaete sordida YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation*. Biodegradation, 21, 681–689.
65. Hazelton P.D., Cope W.G., Mosher S., Pandolfo T.J., Belden J.B., Barnhart M.Ch., Bringolf R.B., 2013. *Fluoxetine alters adult freshwater mussel behavior and larval metamorphosis*. Science of the Total Environment, 445–446, 94–100.
66. Hazelton P.D., Du B., Haddad S.P., Fritts A.K., Chambliss C.K., Brooks B.W., Bringolf R.B., 2014. *Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels*. Aquatic Toxicology, 151, 27–35.
67. Heberer T., 2002. *Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*. Toxicology Letters, 131, 5–17.
68. Ismail S.N., Müller C.E., Morgan R.R., Luthy R.G., 2014. *Uptake of contaminants of emerging concern by the Bivalves Anodonta californiensis and Corbicula fluminea*. Environmental Science and Technology, 48, 9211–9219.
69. Istifli E.S., Çelik R., Hüsunet M.T., Çetinel N., Demirhan O., İla H.B., 2018. *In vitro cytogenotoxic evaluation of sertraline*. Interdisciplinary Toxicology, 11, 181–188.
70. Jajoo A., Donlon C., Shnayder S., Levin M., McVey M., 2020. *Sertraline induces DNA damage and cellular toxicity in Drosophila that can be ameliorated by antioxidants*. Scientific Reports, 10, 1–12.
71. Jean J., Perrodin Y., Pivot C., Trepo D., Perraud M., Droguet J., Tissot-Guerraz F., Locher F., 2012. *Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents*. Journal of Environmental Management, 103, 113–121.
72. Jelic A., Gros M., Ginebreda A., Cespedes-Sánchez R., Ventura F., Petrovic M., 2011. *Occurrence, partition and removal of pharmaceuticals in sewage water and sludge during wastewater treatment*. Water Research, 45, 1165–1176.
73. Jiang Y., Liu Y., Zhang H., Yang K., Li J., Shao S., 2020. *Aerobic granular sludge shows enhanced resistances to the long-term toxicity of Cu (II)*. Chemosphere, 253, 1–13.

74. Jureczko M., Kalka J., 2020. *Cytostatic pharmaceuticals as water contaminants*. European Journal of Pharmacology, 866, 2–10.
75. Kagle J., Porter A.W., Murdoch R.W., Rivera-Cancel G., Hay A.G., 2009. *Biodegradation of pharmaceutical and personal care products*. Advances in Applied Microbiology, 67, 65–108.
76. Kanakaraju D., Glass B.D., Oelgemöller M., 2018. *Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review*. Journal of Environmental Management, 219, 189–207.
77. Kawase A., Hashimoto R., Shibata M., Shimada H., Iwaki M., 2017. *Involvement of reactive metabolites of diclofenac in cytotoxicity in sandwich-cultured rat hepatocytes*. International Journal of Toxicology, 36, 260–267.
78. Kessler N., Schauer J.J., Yagur-Kroll S., Melamed S., Tirosh O., Belkin S., Erel Y., 2012. *A bacterial bioreporter panel to assay the cytotoxicity of atmospheric particulate matter*. Atmospheric Environment, 63, 94–101.
79. Kim J.F., Székely G., Valtcheva I.B., Livingston A.G., 2014. *Increasing the sustainability of membrane processes through cascade approach and solvent recovery – pharmaceutical purification case study*. Green Chemistry, 16, 133–145.
80. Kimura K., Amy G., Drewes J.E., Heberer T., Kim T.U., Watanabe Y., 2003. *Rejection of organic micropollutants (disinfection by-products, endocrine disrupting compounds, and pharmaceutically active compounds) by NF/RO membranes*. Journal of Membrane Science, 227, 113–121.
81. Klopčič I., Markovič T., Mlinarič-Rašćan I., Sollner Dolenc M., 2018. *Endocrine disrupting activities and immunomodulatory effects in lymphoblastoid cell lines of diclofenac, 4-hydroxydiclofenac and paracetamol*. Toxicology Letters, 294, 95–104.
82. Koechli Ch.N., 2010. *Microbial degradation of the antidepressant sertraline in wastewater sludge*. The FASEB Journal, 24, 1, 6–18.
83. Kokoszka K., Kobus A., Bajkacz S., 2021. *Optimization of a Method for Extraction and Determination of Residues of Selected Antimicrobials in Soil and Plant Samples Using HPLC-UV-MS/MS*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18, 1–14.
84. Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T., 2002. *Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance*. Environmental Science and Technology, 36, 6, 1202–1211.
85. Koltsakidou A., Antonopoulou M., Sykiotou M., Evgenidou E., Konstantinou I., Lambropoulou D.A., 2017. *Photo-Fenton and Fenton-like processes for the treatment of the antineoplastic drug 5-fluorouracil under simulated solar radiation*. Environmental Science and Pollution Research, 24, 4791–4800.
86. Kosjek T., Perko S., Žigon D., Heath E., 2013. *Fluorouracil in the environment: analysis, occurrence, degradation and transformation*. Journal of Chromatography A, 1290, 62–72.
87. Kostrzynska M., Leung K.T., Lee H., Trevors J.T., 2002. *Green fluorescent protein-based biosensor for detecting SOS-inducing activity of genotoxic compounds*. Journal of Microbiological Methods, 48, 43–51.
88. Kozarska A., Krzyżewska I., 2016. *Wybrane techniki chromatograficzne w oznaczaniu farmaceutyków w środowisku (cz. II)*. LAB. Laboratoria, Aparatura, Badania, 21, 6–11.

89. Krzyżek P., Franiczek R., Krzyżanowska B., Łaczmanski Ł., Migdał P., Gościński G., 2019. *In vitro* activity of sertraline, an antidepressant, against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant *Helicobacter pylori* strains. *Pathogens*, 8, 1–21.
90. Kudlek E., Bohdziewicz J., Dudziak M., 2015. *Naturalna i wspomagana degradacja wybranych związków farmaceutycznych w środowisku wodnym*. W: K. Pikoń, M. Czop (red.), *Współczesne problemy ochrony środowiska II*. Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska, Gliwice, 31–41.
91. Kudlek E., Kamela S., Dudziak M., 2015. *Nanofiltracja w usuwaniu wybranych leków ze środowiska wodnego*. W: I. Skoczko, I. Piekutin, E. Szatyłowicz E. (red.), *Wody powierzchniowe i podziemne*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej, Białystok, 66–91.
92. Kümmerer K., 2009. *The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges*. *Journal of Environmental Management*, 90, 2354–2366.
93. Lee S., Amasia M., Madou M., Mitchell R.J., 2013. *Serum complement enhances the responses of genotoxin- and oxidative stress sensitive Escherichia coli bioreporters*. *Biosensors and Bioelectronics*, 46, 175–182.
94. Li J., Ma L.Y., Li L.S., Xu, L., 2017. *Photodegradation kinetics, transformation, and toxicity prediction of ketoprofen, carprofen, and diclofenac acid in aqueous solutions*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36, 3232–3239.
95. Lin T., Yu S., Wen Ch., 2016. *Occurrence, removal and risk assessment of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in an advanced drinking water treatment plant (ADWTP) around Taihu Lake in China*. *Chemosphere*, 152, 1–9.
96. Liu J.L., Wong M.H., 2013. *Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China*. *Environment International*, 59, 208–224.
97. Liu X.W., Sheng G.P., Yu H.Q., 2009. *Physicochemical characteristics of microbial granules*. *Biotechnology Advances*, 27, 1061–1070.
98. Lonappan L., Brar S.K., Das R.K., Verma M., Surampalli R.Y., 2016. *Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity – a review*. *Environment International*, 96, 127–138.
99. Loos G., Scheers T., Van Eyck K., Van Schepdael A., Adams E., Van der Bruggen B., Cabooter D., Dewil R., 2018. *Electrochemical oxidation of key pharmaceuticals using a boron doped diamond electrode*. *Separation and Purification Technology*, 195, 184–191.
100. López-Muñoz F., Álamo C., 2013. *Active metabolites as antidepressant drugs: the role of norquetiapine in the mechanism of action of quetiapine in the treatment of mood disorders*. *Frontiers in Psychiatry*, 4, 1–8.
101. Lu X., Shao Y., Gao N., Chen J., Zhang Y., Xiang H., Guo Y., 2017. *Degradation of diclofenac by UV-activated persulfate process: kinetic studies, degradation pathways and toxicity assessments*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 139–147.
102. Lu Y., Macias D., Dean Z.S., Kregen N.R., Wong P.K., 2015. *A UAV-mounted whole cell biosensor system for environmental monitoring applications*. *IEEE Trans Nanobioscience*, 14, 811–817.
103. Lukáčová M., Valková D., Diaz M.Q., Perečko D., Barák I., 1999. *Green fluorescent protein as a detection marker for Coxiella burnetii transformation*. *FEMS Microbiology Letters*, 175, 255–260.

104. Lutterbeck C.A., Wilde M.L., Baginska E., Leder Ch., Machado E.L., Kümmerer K., 2016. *Degradation of cyclophosphamide and 5-fluorouracil by UV and simulated sunlight treatments: assessment of the enhancement of the biodegradability and toxicity.* Environmental Pollution, 208, 467–476.
105. Ma C., Yu S., Shi W., Tian W., Heijman S.G.J., Rietveld L.C., 2012. *High concentration powdered activated carbon-membrane bioreactor (PAC-MBR) for slightly polluted surface water treatment at low temperature.* Bioresource Technology, 113, 136–142.
106. McGovern A.S., Hamlin A.S., Winter G., 2019. *A review of the antimicrobial side of antidepressants and its putative implications on the gut microbiome.* Australian & New Zealand Journal of Psychiatry, 53, 1151–1166.
107. Marchlewicz A., Guzik U., Wojcieszynska D., 2015. *Właściwości, występowanie i biodegradacja ibuprofenu w środowisku wodnym.* Ochrona Środowiska, 37, 1, 65–70.
108. Marques C.R., Abrantes N., Gonçalves F., 2004. *Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: II. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid metabolites.* Environmental Toxicology, 19, 527–540.
109. Márquez G., Rodríguez E.M., Maldonado M.I., Álvarez P.M., 2014. *Integration of ozone and solar TiO₂-photocatalytic oxidation for the degradation of selected pharmaceutical compounds in water and wastewater.* Separation and Purification Technology, 136, 18–26.
110. Mascolo G., Balest L., Cassano D., Laera G., Lopez A., Pollice A., Salerno C., 2010. *Biodegradability of pharmaceutical industrial wastewater and formation of recalcitrant organic compounds during aerobic biological treatment.* Bioresource Technology, 101, 8, 2585–2591.
111. Matejczyk M., 2010. *Potencjał aplikacyjny biosensorów mikrobiologicznych.* Postępy Mikrobiologii, 49, 4, 297–304.
112. Matejczyk M., Ofman P., Dąbrowska K., Świsłocka R., Lewandowski W., 2020a. *The biological activity of transformation products of diclofenac and its interaction with chlorogenic acid.* Journal of Environmental Sciences, 91, 128–141.
113. Matejczyk M., Ofman P., Dąbrowska K., Świsłocka R., Lewandowski W., 2020b. *Evaluation of the biological impact of the mixtures of diclofenac with its biodegradation metabolites 4'-hydroxydiclofenac and 5-hydroxydiclofenac on Escherichia coli. DCF synergistic effect with caffeic acid.* Archives of Environmental Protection, 46, 4, 32–53.
114. Matejczyk M., Ofman P., Dąbrowska K., Świsłocka R., Lewandowski W., 2020c. *Synergistic interaction of diclofenac and its metabolites with selected antibiotics and amygdalin in wastewaters.* Environmental Research, 186, 1–12.
115. Matejczyk M., Rosochacki S.J., 2014. *Environmental application of reporter-genes based biosensors for chemical contamination screening.* Archives of Environmental Protection, 40, 4, 113–123.
116. Matozzo V., Gagné F., Marin M.G., Ricciardi F., Blaise Ch., 2008. *Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review.* Environment International, 34, 531–455.
117. Melamed S., Lalush Ch., Elad T., Yagur-Krol S., Belkin S., Pedahzur R., 2012. *A bacterial reporter panel for the detection and classification of antibiotic substances.* Microbiol Biotechnology, 5, 536–548.
118. Memmert U., Peither A., Burri R., Weber K., Schmidt T., Sumpter J.P., Hartmann A., 2013. *Diclofenac: new data on chronic toxicity and bioconcentration in fish.* Environmental Toxicology and Chemistry, 32, 442–452.

119. Merkamm M., Guyonvarch A., 2001. *Cloning of the sodA gene from Corynebacterium melassecola and role of superoxide dismutase in cellular viability*. Journal of Bacteriology, 183, 1284–1295.
120. Mestre A.S., Pires J., Nogueira J.M.F., Carvalho A.P., 2007. *Activated carbons for the adsorption of ibuprofen*. Carbon, 45, 1979–1988.
121. Mezzelani M., Gorbi S., Regoli F., 2018. *Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms*. Marine Environmental Research, 140, 41–60.
122. Miao X.S., Yang J.J., Metcalfe Ch.D., 2005. *Carbamazepine and its metabolites in wastewater and in biosolids in a municipal wastewater treatment plant*. Environmental Science and Technology, 39, 7469–7475.
123. Minagh E., Hernan R., O'Rourke K., Lyng F.M., Davoren M., 2009. *Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72, 434–440.
124. Mole R.A., Brooks B.W., 2019. *Global scanning of selective serotonin reuptake inhibitors: occurrence, wastewater treatment and hazards in aquatic systems*. Environmental Pollution, 250, 1019–1031.
125. Morrissey R.E., Eustis S., Haseman J.K., Huff J., Bucher J.R., 1991. *Toxicity and carcinogenicity studies of nalidixic acid in rodents*. Drug Chemistry and Toxicology, 14, 1–2, 45–66.
126. Mortelmans K., Zeiger E., 2000. *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455, 1–2, 29–60.
127. Muñoz C., Palacio D.A., Rivas B.L., 2020. *Effect of solvent behavior of nalidixic acid by ultraviolet spectroscopy*. Journal of the Chilean Chemical Society, 65, 3, 4885–4887.
128. Muñoz-Bellido J.L., Muñoz-Criado S., García-Rodríguez J.A., 2000. *Antimicrobial activity of psychotropic drugs: selective serotonin reuptake inhibitors*. International Journal of Antimicrobial Agents, 14, 177–180.
129. Naddeo V., Landi M., Scannapieco D., Belgiorio V., 2013. *Sonochemical degradation of twenty-three emerging contaminants in urban wastewater*. Desalination and Water Treatment, 51, 6601–6608.
130. Nakada N., Kiri K., Shinohara H., Harada A., Kuroda K., Takizawa S., Takada H., 2008. *Evaluation of pharmaceuticals and personal care products as water-soluble molecular markers of sewage*. Environmental Science and Technology, 42, 6347–6353.
131. Nałęcz-Jawecki G., Wawryniuk M., Giebułtowicz J., Olkowski A., Drobnińska A., 2020. *Influence of selected antidepressants on the ciliated protozoan Spirostomum ambiguum: toxicity, bioaccumulation, and biotransformation products*. Molecules, 25, 1–18.
132. Nava-Álvarez R., Razo-Estrada A.C., García-Medina S., Gómez-Oliván L.M., Galar-Martínez M., 2014. *Oxidative stress induced by mixture of diclofenac and acetaminophen on Common Carp (Cyprinus carpio)*. Water, Air & Soil Pollution, 225, 1873–1885.
133. Ng S.P., Palombo E.A., Bhawe M., 2012. *Identification of a copper-responsive promoter and development of a copper biosensor in the soil bacterium, Achromobacter sp. AO22*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 5, 2221–2228.
134. Nghiem L.D., Schäfer A.I., Elimelech M., 2005. *Pharmaceutical retention mechanisms by nanofiltration membranes*. Environmental Science and Technology, 39, 7698–7705.

135. Nikolaou A., Meric S., Fatta D., 2007. *Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387, 1225–1234.
136. Nowrotek M., Kotlarska E., Łuczkiwicz A., Felis E., Sochacki A., Miksch K., 2017. *The treat-ment of wastewater containing pharmaceuticals in microcosm constructed wetlands: the occurrence of integrons (intl-2) and associated resistance genes (sul1-3, qacEΔ1)*. Environmental Science and Pollution Research, 24, 15055–15066.
137. Ofman P., 2017. *Usuwanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych ze ścieków ze szczelinowania hydraulicznego w reaktorach SBR*. Rozprawa doktorska, Białystok, 35–41.
138. Ofman P., Struk-Sokołowska J., 2019. *Artificial neural network (ANN) approach to modelling of selected nitrogen forms removal from oily wastewater in anaerobic and aerobic GSBP process phases*. Water, 11, 1–11.
139. Ofman P., Struk-Sokołowska J., Skoczko I., Wiater J., 2020. *Alternated biodegradation of naphthalene (NAP), acenaphthylene (ACY) and acenaphthene (ACE) in an aerobic granular sludge reactor (GSBR)*. Journal of Hazardous Materials, 383, 1–12.
140. Önal Y., Akmil-Başar C., Sarici-Özdemir C., 2007. *Elucidation of the naproxen sodium adsorption onto activated carbon prepared from waste apricot: kinetic, equilibrium and thermodynamic characterization*. Journal of Hazardous Materials, 148, 727–738.
141. Ong K.S., Cheow Y.L., Lee S.M., 2017. *The role of reactive oxygen species in the antimicrobial activity of pyochelin*. Journal of Advanced Research, 8, 393–398.
142. Osawa R.A., Carvalho A.P., Monteiro O.C., Oliveira M.C., Florêncio M.H., 2019. *Transformation products of citalopram: Identification, wastewater analysis and in silico toxicological assessment*. Chemosphere, 217, 858–868.
143. Osorio-Lozada A., Surapaneni S., Skiles G.L., Subramanian R., 2008. *Biosynthesis of drug metabolites using microbes in hollow fiber cartridge reactors: case study of diclofenac metabolism by Actinoplanes species*. Drug Metabolism and Disposition, 36, 234–240.
144. Parolini M., Binelli A., Provini A., 2011. *Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve Dreissena polymorpha*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74, 6, 1586–1594.
145. Parrella A., Lavorgna M., Criscuolo E., Russo C., Isidori M., 2014. *Estrogenic activity and cytotoxicity of six anticancer drugs detected in water systems*. Science of the Total Environment, 485–486, 216–222.
146. Petrie B., Barden R., Kasprzyk-Hordern B., 2015. *A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring*. Water Research, 72, 3–27.
147. Praskova E., Voslarova E., Siroka Z., Plhalova L., Macova S., Marsalek P., Pistekova V., Svobodova Z., 2011. *Assessment of diclofenac LC50 reference values in juvenile and embryonic stages of the zebrafish (Danio rerio)*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 14, 545–549.
148. Puckowski A., Mioduszewska K., Łukaszewicz P., Borecka M., Caban M., Maszkowska J., Stepnowski P., 2016. *Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 127, 232–255.
149. Quintana J.B., Weiss S., Reemtsma T., 2005. *Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor*. Water Resources, 39, 2654–2664.

150. Rabbow E., Rettberg P., Baumstark-Khan Ch., Horneck G., 2002. *SOS-LUX- and LAC-FLUORO-TEST for the quantification of genotoxic and/or cytotoxic effects of heavy metal salts*. *Analytica Chimica Acta*, 456, 31–39.
151. Rabeea S.A., Merchant H.A., Khan M.U., Kow Ch.S., Hasan S.S., 2021. *Surging trends in prescriptions and costs of antidepressants in England amid COVID-19*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 217–221.
152. Radjenović J., Petrović M., Barceló D., 2009. *Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment*. *Water Research*, 43, 3, 831–841.
153. Radjenović J., Petrović M., Ventura F., Barceló D., 2008. *Rejection of pharmaceuticals in nanofiltration and reverse osmosis membrane drinking water treatment*. *Water Research*, 42, 3601–3610.
154. Radović T., Grujić S., Petković A., Dimkić M., Laušević M., 2015. *Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 4092.
155. Reis A.C., Kolvenbach B.A., Nunes O.C., Corvini Ph.F.X., 2020. *Biodegradation of antibiotics: The new resistance determinants – part I*. *New Biotechnology*, 54, 34–51.
156. Samaras V.G., Stasinakis A.S., Mamais D., Thomaidis N.S., Lekkas T.D., 2013. *Fate of selected pharmaceuticals and synthetic endocrine disrupting compounds during wastewater treatment and sludge anaerobic digestion*. *Journal of Hazardous Material*, 244–245, 259–267.
157. Schmidt S., Hoffman H., Garbe L.A., Schneider R.J., 2018. *Liquid chromatography – tandem mass spectrometry detection of diclofenac and related compounds in water samples*. *Journal of Chromatography A*, 1538, 112–116.
158. Schulze T., Weiss S., Schymanski E., Ohe P.C. von der, Schmitt-Jansen M., Altenburger R., Streck G., Brack W., 2010. *Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis*. *Environmental Pollution*, 158, 1461–1466.
159. Sehonova P., Hodkovicova N., Urbanova M., Örn S., Blahova J., Svobodova Z., Faldyna M., Chloupek P., Bredikova K., Carlsson G., 2019. *Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians*. *Environmental Pollution*, 254, 1129–1142.
160. Serrano D., Suárez S., Lema J.M., Omil F., 2011. *Removal of persistent pharmaceutical micropollutants from sewage by addition of PAC in a sequential membrane bioreactor*. *Water Research*, 45, 5323–5331.
161. Sharma A., Ahmad J., Flora S.J.S., 2018. *Application of advanced oxidation processes and toxicity assessment of transformation products*. *Environmental Research*, 167, 223–233.
162. Sheng L.H., Chen H.R., Huo Y.B., Wang J., Zhang Y., Yang M., Zhang H.X., 2014. *Simultaneous determination of 24 antidepressant drugs and their metabolites in wastewater by ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry*. *Molecules*, 19, 1212–1222.
163. Shi W., Han Y., Sun S., Tang Y., Zhou W., Du X.Y., Liu G., 2020. *Immunotoxicities of microplastics and sertraline, alone and in combination, to a bivalve species: size-dependent interaction and potential toxication mechanism*. *Journal of Hazardous Materials*, 396, 122603.

164. Shin D., Moon H.S., Lin Ch.Ch., Barkay T., Nam K., 2011. *Use of reporter-gene based bacteria to quantify phenanthrene biodegradation and toxicity in soil*. Environmental Pollution, 159, 2, 509–514.
165. Silva L.J.G., Lino C.M., Meisel L.M., Pena A., 2012. *Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: an ecopharmacovigilance approach*. Science of the Total Environment, 437, 185–195.
166. Silva L.J.G., Pereira A.M.P.T., Meisel L.M., Lino C.M., Pena A., 2015. *Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: uptake, bioaccumulation and ecotoxicology*. Environmental Pollution, 197, 127–143.
167. Silva L.J.G., Pereira A.M.P.T., Rodrigues H., Meisel L.M., Lino C.M., Pena A., 2017. *SSRIs antidepressants in marine mussels from Atlantic coastal areas and human risk assessment*. Science of the Total Environment, 603–604, 118–125.
168. Silva-Rocha R., Lorenzo V. de, 2012. *A GFP-lacZ bicistronic reporter system for promoter analysis in environmental gram-negative bacteria*. PloS ONE, 7, 4, 34675–34689.
169. Sipma J., Osuna B., Collado N., Monclús H., Ferrero G., Comas J., Rodriguez-Roda I., 2010. *Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems*. Desalination, 250, 2, 653–659.
170. Song W., Pasco N., Gooneratne R., Weld R.J., 2012. *Comparison of three genetically modified Escherichia coli biosensor strains for amperometric tetracycline measurement*. Biosensors and Bioelectronics, 35, 1, 69–74.
171. Sousa A.K. de, Rocha J.E., Gonçalves de Souza T., Sampaio de Freitas T., Ribeiro-Filho J., Melo Coutinho H.D., 2018. *New roles of fluoxetine in pharmacology: Antibacterial effect and modulation of antibiotic activity*. Microbial Pathogenesis, 123, 368–371.
172. Styszko K., Proctor K., Castrignanò E., Kasprzyk-Hordern B., 2021. *Occurrence of pharmaceutical residues, personal care products, lifestyle chemicals, illicit drugs and metabolites in wastewater and receiving surface waters of Krakow agglomeration in South Poland*. Science of the Total Environment, 768, 1443–1460.
173. Szymonik A., Lach J., 2012. *Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych*. Inżynieria i Ochrona Środowiska, 15, 3, 249–263.
174. Szymonik A., Lach J., 2016. *Adsorpcja wybranych farmaceutyków na modyfikowanym wysokotemperaturowo węgla aktywnym WG-12*. Inżynieria i Ochrona Środowiska, 19, 3, 401–412.
175. Tałałaj I., 2013. *Zastosowanie odwróconej osmozy w procesie oczyszczania odcieków*. Ekonomia i Środowisko, 2, 45, 93–106.
176. Tałałaj I.A., 2017. *Wpływ wybranych metod podczyszczania odcieków ze składowisk odpadów komunalnych na proces ich oczyszczania metodą odwróconej osmozy*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej, Białystok.
177. Tecon R., Binggeli O., Meer J.R. van der, 2009. *Double-tagged fluorescent bacterial bio-reporter for the study of polycyclic aromatic hydrocarbon diffusion and bioavailability*. Environmental Microbiology, 11, 9, 2271–2283.
178. Tichoniuk M., 2013. *Biosensory DNA do wykrywania mikroorganizmów chorobotwórczych w żywności*. Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, Poznań.
179. Tiwari B., Sellamuthu B., Ouarda Y., Drogui P., Tyagi R.D., Buelna G., 2017. *Review on fate and mechanism of removal of pharmaceutical pollutants from wastewater using biological approach*. Bioresource Technology, 224, 1–12.

180. Urban A., Eckermann S., Fast B., Metzger S., Gehling M., Ziegelbauer K., Rübsamen-Waigmann H., Freiberg Ch., 2007. *Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery*. Applied and Environmental Microbiology, 73, 20, 6436–6443.
181. Valavanidis A., Vlachogianni T., Dassenakis M., Scoullos M., 2006. *Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 64, 178–189.
182. Vasiliadou I.A., Molina R., Martinez F., Melero J.A., Stathopoulou P.M., Tsiamis G., 2018. *Toxicity assessment of pharmaceutical compounds on mixed culture from activated sludge using respirometric technique: The role of microbial community structure*. Science of The Total Environment, 630, 809–819.
183. Vergili I., 2013. *Application of nanofiltration for the removal of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen from drinking water sources*. Journal of Environmental Management, 127, 177–187.
184. Vieno N., Sillanpää M., 2014. *Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant – a review*. Environment International, 69, 28–39.
185. Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullos M.J., Valavanidis A., 2007. *Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels Mytilus galloprovincialis for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece*. Marine Pollution Bulletin, 54, 1361–1376.
186. Vogrinc D., Vodovnik M., Marinšek-Logar M., 2015. *Microbial biosensors for environmental monitoring*. Acta Agriculturae Slovenica, 106, 67–75.
187. Vona A., Martino F. di, Garcia-Ivars J., Picó Y., Mendoza-Roca J.A., Iborra-Clar M.I., 2015. *Comparison of different removal techniques for selected pharmaceuticals*. Journal of Water Process Engineering, 5, 48–57.
188. Wang J., Wang S., 2016. *Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: a review*. Journal of Environmental Management, 182, 620–640.
189. Wang S., Wang J., 2018. *Degradation of carbamazepine by radiation-induced activation of peroxymonosulfate*. Chemical Engineering Journal, 336, 595–601.
190. Wang X.Ch., Shen J., Chen Z., Zhao X., Xu H., 2016. *Removal of pharmaceuticals from synthetic wastewater in an aerobic granular sludge membrane bioreactor and determination of the bioreactor microbial diversity*. Applied Microbiology and Biotechnology, 100, 8213–8223.
191. Williams R.J., Johnson A.C., Smith J.J.L., Kanda R., 2003. *Steroid estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatment works discharges*. Environmental Science and Technology, 37, 1744–1750.
192. Włodarczyk-Makuła M., 2014. *Wybrane związki endokrynnie aktywne EDC w środowisku wodnym*. LAB. Laboratoria, Aparatura, Badania, 19, 20–25.
193. Wojtowicz K., 2018. *Opracowanie metodyki oznaczania BTEX w próbkach gleb z wykorzystaniem chromatografii gazowej z przystawką headspace*. Nafta-Gaz, 3, 201–207.
194. Wydro U., Wołejko E., Struk-Sokołowska J., Puchlik M., 2016. *Pozostałości farmaceutyków w środowisku oraz możliwości ich usuwania*. W: *Interdyscyplinarne zagadnienia w inżynierii i ochronie środowiska*, t. 7. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 286–299.
195. Xie Z., Lu G., Liu J., Yan Z., Ma B., Zhang Z., Chen W., 2015. *Occurrence, bioaccumulation, and trophic magnification of pharmaceutically active compounds in Taihu Lake, China*. Chemosphere, 138, 140–147.

196. Xu X., Ying Y., 2011. *Microbial biosensors for environmental monitoring and food analysis*. Food Reviews International, 27, 300–329.
197. Yagur-Kroll S., Bilic B., Belkin S., 2010. *Strategies for enhancing bioluminescent bacterial sensor performance by promoter region manipulation*. Microbial Biotechnology, 3, 3, 300–310.
198. Yang X., Li M., Guo P., Li H., Hu Z., Liu X., Zhang Q., 2019. *Isolation, screening, and characterization of antibiotic-degrading bacteria for penicillin V potassium (PVK) from soil on a pig farm*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 16, 12, 1–9.
199. Yu Q., Li Y., Ma A., Liu W., Wang H., Zhuang G., 2011. *An efficient design strategy for a whole-cell biosensor based on engineered ribosome binding sequences*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 401, 9, 2891–2898.
200. Yu Y., Wu L., Chang A.C., 2013. *Seasonal variation of endocrine disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants*. Science of the Total Environment, 442, 310–316.
201. Zhang J., Chang V.W.C., Giannis A., Wang J.Y., 2013. *Removal of cytostatic drugs from aquatic environment: A review*. Science of the Total Environment, 445–446, 281–298.
202. Zhang X.X., Zhang T., Fang H.P., 2009. *Antibiotic resistance genes in water environment*. Applied Microbiology and Biotechnology, 82, 397–414.
203. Zhang Y., Xiao Y., Zhang J., Chang V.W.C., Lim T.T., 2017. *Degradation of cyclophosphamide and 5-fluorouracil in water using UV and H_2O_2 : Kinetics investigation, pathways and energetic analysis*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 5, 1133–1139.
204. Zhao X., Chen Z.L., Wang X.Ch., Shen J.M., Xu H., 2014. *PPCPs removal by aerobic granular sludge membrane bioreactor*. Applied Microbiology and Biotechnology, 98, 9843–9848.
205. Zhong D.F., Sun L., Liu L., Huang H.H., 2003. *Microbial transformation of naproxen by Cunninghamhamella species*. Acta Pharmacologica Sinica, 24, 442–447.
206. Zhou Y., Zha J., Wang Z., 2012. *Occurrence and fate of steroid estrogens in the largest wastewater treatment plant in Beijing, China*. Environmental Monitoring Assessment, 184, 6799–6813.

Dyrektywy i inne dokumenty

1. Dyrektywa 2000/60/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 23 października 2000 roku ustanawiająca ramy wspólnotowego działania w dziedzinie polityki wodnej, Dz.Urz. L 327 z 22 grudnia 2000.
2. Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady i Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego. Strategiczne podejście Unii Europejskiej do substancji farmaceutycznych w środowisku. Bruksela, 11 marca 2019, https://www.wody.gov.pl/images/Pliki_do_pobrania/Komunikat_farmaceutyki.pdf.
3. Decyzja wykonawcza Komisji (UE) 2018/840 z dnia 5 czerwca 2018 roku ustanawiająca listę obserwacyjną substancji do celów monitorowania obejmującego całą Unię w zakresie polityki wodnej na podstawie dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2008/105/WE i uchylająca decyzję wykonawczą Komisji (UE) 2015/495, Dz.Urz. L 141 z 7 czerwca 2018.

4. Lista obserwacyjna wód gruntowych: badanie pilotażowe dotyczące substancji farmaceutycznych, Groundwater Watch List: Pharmaceuticals Pilot Study, 2016, <https://circa-bc.europa.eu/w/browse/a1e23792-6ecd-4b34-b86c-dcb6f1c7ad1c>.
5. Ustawa o prawie farmaceutycznym z dnia 6 września 2001, Dz.U. z 2016 r., poz. 2142 z późn. zm.
6. Raport Instytutu IQVIA – Globalne zużycie leków w 2019 roku z prognozą do 2023 roku, <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports/the-global-use-of-medicine-in-2019-and-outlook-to-2023>.

Spis tabel

Tabela 1.1.	Najczęściej wykrywane leki w ściekach szpitalnych na świecie	13
Tabela 1.2.	Najczęściej wykrywane leki z grupy NSAIDs i wybrane metabolity w matrycach środowiskowych	16
Tabela 1.3.	Ogólna charakterystyka głównych leków z grupy SSRIs i ich metabolitów	25
Tabela 1.4.	Wybrane leki antynowotworowe najczęściej wykrywane w ściekach	29
Tabela 1.5.	Wybrane antybiotyki najczęściej wykrywane w ściekach miejskich	32
Tabela 1.6.	Wybrane leki sercowo-naczyniowe oraz statyny najczęściej wykrywane w ściekach miejskich	35
Tabela 1.7.	Estrogeny naturalne oraz syntetyczne najczęściej wykrywane w ściekach	38
Tabela 3.1.	Wybrane wskaźniki zanieczyszczeń w ściekach surowych i oczyszczonych.....	65
Tabela 3.2.	Substancje czynne leków i metabolitów wykorzystane w badaniach.....	65
Tabela 3.3.	Skład analizowanych prób oraz stężenie badanych związków podane w mg/dm ³	67
Tabela 3.4.	Modelowe szczepy <i>E. coli</i> wykorzystane w badaniach oraz stosowane metody.....	68
Tabela 5.1.	Wybrane mieszaniny wykazujące najwyższą toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność względem testowych szczepów <i>E. coli</i> w porównaniu z kontrolą w MH, ŚS oraz ŚO	126
Tabela 5.2.	Mieszaniny wykazujące wyższą toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność w porównaniu z sumaryczną toksycznością, cytotoksycznością oraz genotoksycznością ich pojedynczych składników, badane w MH, ŚS oraz ŚO.....	127
Tabela A.1.	Inhibicja żywotności [%] <i>E. coli</i> K-12 po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	135
Tabela A.2.	Różnice w wartościach inhibicji żywotności [%] <i>E. coli</i> K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	136
Tabela A.3.	Inhibicja żywotności [%] <i>E. coli</i> K-12 po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	137

Tabela A.4. Różnice w wartościach inhibicji żywotności [%] <i>E. coli</i> K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	138
Tabela A.5. Inhibicja żywotności [%] <i>E. coli</i> K-12 po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	139
Tabela A.6. Różnice w wartościach inhibicji żywotności [%] <i>E. coli</i> K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	140
Tabela A.7. Inhibicja fluorescencji białka GFP [%] w <i>E. coli</i> MM294-GFP po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	141
Tabela A.8. Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP [%] w <i>E. coli</i> MM294-GFP pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	142
Tabela A.9. Inhibicja fluorescencji białka GFP [%] w <i>E. coli</i> MM294-GFP po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	143
Tabela A.10. Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP [%] w <i>E. coli</i> MM294-GFP pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	144
Tabela A.11. Inhibicja fluorescencji białka GFP [%] w <i>E. coli</i> MM294-GFP po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	145
Tabela A.12. Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji białka GFP [%] w <i>E. coli</i> MM294-GFP pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	146
Tabela A.13. Indukcja promotora <i>recA</i> [%] w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	147
Tabela A.14. Różnice w wartościach indukcji promotora <i>recA</i> [%] w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	148
Tabela A.15. Indukcja promotora <i>recA</i> [%] w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	149
Tabela A.16. Różnice w wartościach indukcji promotora <i>recA</i> [%] w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	150
Tabela A.17. Indukcja promotora <i>recA</i> [%] w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	151

Tabela A.18. Różnice w wartościach indukcji promotora <i>recA</i> [%] w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	152
Tabela B.1. Wyniki testu Shapiro–Wilka	153
Tabela B.2. Wyniki testu Bartletta dla zmiennych przyjętych do testu NIR Tukeya względem medium hodowlanego (MH)	154
Tabela B.3. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	155
Tabela B.4. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	157
Tabela B.5. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	159
Tabela B.6. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	161
Tabela B.7. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	163
Tabela B.8. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	165
Tabela B.9. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH.....	167
Tabela B.10. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS.....	169
Tabela B.11. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO.....	171
Tabela B.12. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	173
Tabela B.13. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	175
Tabela B.14. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	177
Tabela B.15. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	179

Tabela B.16. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	181
Tabela B.17. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	183
Tabela B.18. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH.....	185
Tabela B.19. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS	187
Tabela B.20. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO.....	189
Tabela B.21. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	191
Tabela B.22. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	193
Tabela B.23. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	195
Tabela B.24. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	197
Tabela B.25. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	199
Tabela B.26. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	201
Tabela B.27. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH.....	203
Tabela B.28. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS	205
Tabela B.29. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO.....	207
Tabela B.30. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	209
Tabela B.31. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	211

Tabela B.32. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	213
Tabela B.33. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	215
Tabela B.34. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	217
Tabela B.35. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	219
Tabela B.36. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH	221
Tabela B.37. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS	223
Tabela B.38. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO	225
Tabela B.39. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	227
Tabela B.40. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	229
Tabela B.41. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	231
Tabela B.42. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	233
Tabela B.43. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	235
Tabela B.44. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	237
Tabela B.45. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH	239
Tabela B.46. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS	241

Tabela B.47. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO	243
Tabela B.48. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	245
Tabela B.49. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	247
Tabela B.50. Analiza statystyczna wyników inhibicji żywotności <i>E. coli</i> inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	249
Tabela B.51. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w MH	251
Tabela B.52. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚS	253
Tabela B.53. Analiza statystyczna wyników inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294-GFP inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszaninami w ŚO	255
Tabela B.54. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w MH.....	257
Tabela B.55. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚS.....	259
Tabela B.56. Analiza statystyczna wyników indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 inkubowanej z CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszaninami w ŚO.....	261

Spis rycin

Ryc. 1.1.	Biotransformacja diklofenaku i jego główne metabolity – 4'-hydroksydiklofenak i 5-hydroksydiklofenak	21
Ryc. 1.2.	Biotransformacja ibuprofenu i jego główne metabolity: 1-hydroksyibuprofen, 2-hydroksyibuprofen oraz 1,2-dihydroksyibuprofen	22
Ryc. 1.3.	Biotransformacja naproksenu i jego główne metabolity – 6-O-desmetylonaproksen oraz siarczan 6-O-desmetylonaproksenu	23
Ryc. 1.4.	Karbamazepina (CBZ) – wzór strukturalny	27
Ryc. 1.5.	Benzodiazepina (BDZ) – wzór strukturalny	27
Ryc. 1.6.	Główne źródła metabolitów i produktów transformacji farmaceutyków w matrycach środowiskowych.....	41
Ryc. 1.7.	Główne drogi przedostawiania się metabolitów i produktów transformacji leków do ścieków i wód powierzchniowych.....	41
Ryc. 1.8.	Mechanizm AOPs	55
Ryc. 1.9.	Typy procesów stosowanych do degradacji farmaceutyków w ściekach.....	56
Ryc. 3.1.	Schemat miejskiej oczyszczalni ścieków w Stawiskach z zaznaczonymi miejscami poboru próbek	64
Ryc. 3.2.	Mapa genetyczna plazmidu pKK-GFP z genem reporterowym <i>gfp</i> znajdującym się pod kontrolą <i>trc</i> promotora	70
Ryc. 3.3.	Mapa genetyczna plazmidu pBRlux-trp z genem reporterowym <i>luxCDABE</i>	72
Ryc. 4.1.	Różnice w inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń	76
Ryc. 4.2.	Różnice w wartościach inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i między ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	80
Ryc. 4.3.	Różnice w inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń	82
Ryc. 4.4.	Różnice w wartościach inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	85

Ryc. 4.5.	Różnice w inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń.....	86
Ryc. 4.6.	Różnice w wartościach inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU.....	89
Ryc. 4.7.	Różnice w inhibicji fluorescencji GFP w <i>E. coli</i> MM294 po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń.....	92
Ryc. 4.8.	Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji GFP w <i>E. coli</i> MM294 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU.....	94
Ryc. 4.9.	Różnice w inhibicji fluorescencji GFP w <i>E. coli</i> MM294 po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń	97
Ryc. 4.10.	Różnice w wartościach inhibicji fluorescencji GFP w <i>E. coli</i> MM294 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	100
Ryc. 4.11.	Różnice w inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń.....	102
Ryc. 4.12.	Różnice w inhibicji fluorescencji GFP w <i>E. coli</i> MM294 pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU.....	104
Ryc. 4.13.	Różnice w wartościach indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> po inkubacji z SER i Nor-SER, ich mieszaninami oraz mieszaninami z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń.	107
Ryc. 4.14.	Różnice w wartościach indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) i po ekspozycji na SER i Nor-SER, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	110
Ryc. 4.15.	Różnice w wartościach indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> po inkubacji z FLU, Nor-FLU, ich mieszaninami oraz mieszaninami z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń	112
Ryc. 4.16.	Różnice w wartościach indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na FLU i Nor-FLU, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	115

Ryc. 4.17. Różnice w wartościach indukcji promotora <i>recA</i> w <i>E. coli</i> SM342 <i>recA:luxCDABE</i> po inkubacji z CIT i D-CIT, ich mieszaninami oraz mieszaninami z CIS i 5-FU. Słupki błędów wskazują błąd standardowy średniej z trzech niezależnych powtórzeń	116
Ryc. 4.18. Różnice w wartościach indukcji promotora <i>recA</i> pomiędzy ŚS a MH (ŚS/MH), ŚO a MH (ŚO/MH) i pomiędzy ŚO a ŚS (ŚO/ŚS) po ekspozycji na CIT i D-CIT, ich mieszaniny oraz mieszaniny z CIS i 5-FU	118
Ryc. C.1. Podobieństwo inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 w MH wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin	263
Ryc. C.2. Podobieństwo inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 w ŚS wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin	264
Ryc. C.3. Podobieństwo inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 w ŚO wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin	264
Ryc. C.4. Podobieństwo inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 w MH wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	265
Ryc. C.5. Podobieństwo inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 w ŚS wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	265
Ryc. C.6. Podobieństwo inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 w ŚO wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	266
Ryc. C.7. Podobieństwo inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 w MH wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	266
Ryc. C.8. Podobieństwo inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 w ŚS wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	267
Ryc. C.9. Podobieństwo inhibicji żywotności <i>E. coli</i> K-12 w ŚO wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	267
Ryc. C.10. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 w MH wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	268
Ryc. C.11. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 w ŚS wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	268
Ryc. C.12. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 w ŚO wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	269
Ryc. C.13. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 w MH wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	269
Ryc. C.14. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 w ŚS wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	270
Ryc. C.15. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 w ŚO wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	270
Ryc. C.16. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 w MH wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	271
Ryc. C.17. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 w ŚS wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	271

Ryc. C.18. Podobieństwo inhibicji fluorescencji białka GFP w <i>E. coli</i> MM294 w ŚO wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU i ich mieszanin	272
Ryc. C.19. Podobieństwo indukcji promotora <i>recA</i> w MH wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin.....	272
Ryc. C.20. Podobieństwo indukcji promotora <i>recA</i> w ŚS wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin.....	273
Ryc. C.21. Podobieństwo indukcji promotora <i>recA</i> w ŚO wywołanej działaniem SER, Nor-SER, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin.....	273
Ryc. C.22. Podobieństwo indukcji promotora <i>recA</i> w MH wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin.....	274
Ryc. C.23. Podobieństwo indukcji promotora <i>recA</i> w ŚS wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin.....	274
Ryc. C.24. Podobieństwo indukcji promotora <i>recA</i> w ŚO wywołanej działaniem FLU, Nor-FLU, CIS, 5-FU oraz ich mieszanin.....	275
Ryc. C.25. Podobieństwo indukcji promotora <i>recA</i> w MH wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	275
Ryc. C.26. Podobieństwo indukcji promotora <i>recA</i> w ŚS wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	276
Ryc. C.27. Podobieństwo indukcji promotora <i>recA</i> w ŚS wywołanej działaniem CIT, D-CIT, CIS i 5-FU oraz ich mieszanin	276

Streszczenie

Toksyczność wybranych farmaceutyków i ich mieszanin w ściekach w stosunku do *Escherichia coli*

Przeprowadzone badania dotyczyły określenia toksyczności, cytotoksyczności i genotoksyczności wybranych leków antydepresyjnych SER, FLU i CIT, ich metabolitów Nor-SER, Nor-FLU i D-CIT, ich mieszanin oraz mieszanin z lekami antynowotworowymi CIS i 5-FU w trzech różnych środowiskach – medium hodowlanym (MH), ściekach surowych (ŚS) oraz ściekach oczyszczonych (ŚO).

Uzyskane rezultaty dowiodły, że ścieki surowe i oczyszczone w porównaniu z podłożami mikrobiologicznymi nie wpływały w istotnym stopniu na toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność badanych substancji czynnych leków, metabolitów oraz ich mieszanin. Na podstawie otrzymanych w monografii wyników stwierdzono, że pośród badanych leków antydepresyjnych, ich metabolitów i mieszanin z lekami antynowotworowymi najwyższą toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność w trzech badanych środowiskach – w porównaniu z kontrolą – wykazują SER, Nor-SER oraz ich mieszaniny z CIS. Ponadto wykryto, że metabolity leków antydepresyjnych charakteryzowały się podobną toksycznością, cytotoksycznością i genotoksycznością jak leki macierzyste SER, FLU i CIT, niezależnie od badanego środowiska (podłoże mikrobiologiczne, ścieki surowe i oczyszczone). Najwyższą toksyczność, cytotoksyczność i genotoksyczność względem szczepów *E. coli* wykryto po ekspozycji hodowli bakterii na mieszaniny wieloskładnikowe zawierające w swoim składzie CIS, jak: SER w stężeniu 1 mg/dm³ z Nor-SER (0,1 mg/dm³) z CIS (0,1 mg/dm³), FLU (1 mg/dm³) z Nor-FLU (0,1 mg/dm³) z CIS (0,1 mg/dm³), SER (1 mg/dm³) z CIS (0,1 mg/dm³) oraz FLU (1 mg/dm³) z CIS (0,1 mg/dm³) w trzech badanych środowiskach. Przeprowadzone badania toksyczności, cytotoksyczności i genotoksyczności wykazały, że pośród wszystkich badanych w pracy mieszanin najwyższe wartości badanych parametrów względem szczepów *E. coli* w trzech środowiskach osiągała SER (1 mg/dm³) z Nor-SER (0,1 mg/dm³) i z CIS (0,1 mg/dm³). W porównaniu z kontrolą dla mieszaniny tej wartości wzrostu toksyczności, cytotoksyczności i genotoksyczności były wyższe odpowiednio o ponad 20% i około 50% w MH, ŚS i ŚO.

Odnosząc ten fakt do warunków oczyszczalni ścieków, istotne wydaje się spostrzeżenie, że farmaceutyki i ich metabolity znajdujące się w trafiających do oczyszczalni ściekach mogą wchodzić w różnego rodzaju interakcje prowadzące do efektu synergistycznego działania składników mieszanin. Skutkuje to wzrostem toksyczności

ścieków i silniejszym ich oddziaływaniem na osad czynny, prowadząc do zakłócenia jego prawidłowego funkcjonowania i obniżenia wydajności biodegradacji zanieczyszczeń w ściekach. Sugeruje to potrzebę podczyszczania ścieków szczególnie obciążonych ładunkiem farmaceutyków, takich jak ścieki szpitalne oraz ścieki z zakładów produkcji leków.

Abstract

Toxicity of selected pharmaceuticals and their mixtures in wastewaters against *Escherichia coli*

The conducted studies concerned the determination of the toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of selected antidepressants SER, FLU and CIT, their metabolites Nor-SER, Nor-FLU and D-CIT, their mixtures and mixtures with anti-cancer drugs CIS and 5-FU in three different environments, microbiological media (MM), raw wastewaters (RW) and treated wastewaters (TW).

The obtained results proved that the raw and treated wastewaters, compared to microbiological media, did not significantly affect the toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of the tested active substances of drugs, metabolites and their mixtures. On the basis of the results obtained in the monograph, it was found that among the tested antidepressants, their metabolites and mixtures with anticancer drugs, the highest toxicity, cytotoxicity and genotoxicity, compared to the control, was demonstrated by SER, Nor-SER and their mixtures with CIS in the three examined environments MM, RW and TW. Moreover, it was found that the metabolites of antidepressants showed similar toxicity, cytotoxicity and genotoxicity compared to the parent drugs SER, FLU and CIT, regardless of the environment studied (microbiological media, raw and treated wastewaters). The highest toxicity, cytotoxicity and genotoxicity to *E. coli* strains was detected after exposing the bacterial culture to multicomponent mixtures containing CIS in their composition, such as: SER at a concentration of 1 mg/dm³ with Nor-SER (0,1 mg/dm³) with CIS (0,1 mg/dm³), FLU (1 mg/dm³) with Nor-FLU (0,1 mg/dm³) with CIS (0,1 mg/dm³), SER (1 mg/dm³) with CIS (0, 1 mg/dm³) and FLU (1 mg/dm³) with CIS (0,1 mg/dm³) in the three tested environments: MM, RW and TW. The studies of toxicity, cytotoxicity and genotoxicity showed that among all the mixtures tested in the work, the highest values of the parameters tested in relation to *E. coli* strains in three environments were achieved by SER (1 mg/dm³) with Nor-SER (0,1 mg/dm³) and with CIS (0,1 mg/dm³). Compared to the control, for this mixture the increase in toxicity, cytotoxicity and genotoxicity values were higher by more than 20% and about 50%, respectively, in the three tested environments MM, RW and TW.

Relating this fact to the conditions of wastewaters treatment plants (WWTPs), it seems important to note that pharmaceuticals and their metabolites in the wastewaters reaching the WWTPs may interact in various ways, leading to the synergistic

effect of mixture components. This results in an increase in the toxicity of wastewaters and its stronger impact on the activated sludge, leading to the disturbance of its proper functioning and lowering the efficiency of biodegradation of pollutants in wastewaters. This suggests, the need to treat wastewaters particularly loaded with pharmaceuticals, such as hospital wastewaters and wastewaters from drug production plants.

