

**POLITECHNIKA ŚLĄSKA**  
**WYDZIAŁ CHEMICZNY**  
**KATEDRA CHEMII NIEORGANICZNEJ, ANALITYCZNEJ**  
**I ELEKTROCHEMII**

**mgr inż. Klaudia Stando**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Opracowanie i zastosowanie nowych  
procedur analitycznych do oznaczania  
wybranych zanieczyszczeń oraz produktów  
ich transformacji w środowisku**

*Przewodnik po monotematycznym cyklu publikacji*

**Development and application of new  
analytical procedures for determining  
selected pollutants and their  
transformation products in the  
environment**

*Guide to a Thematic Series of Publications*

**Promotor: dr hab. inż. Sylwia Bajkacz, prof. PŚ**

**GLIWICE 2024**

*Chciałbym serdecznie podziękować:*

***Pani dr hab. inż. Sylwii Bajkacz, prof. PŚ**, której nieoceniona pomoc, rady i profesjonalizm stały się fundamentem mojej naukowej podróży.*

*Moim rodzicom **Katarzynie i Dariuszowi**, których nieustające wsparcie i wiara we mnie były moją największą inspiracją.*

*Mężowi **Grzegorzowi**, który trwał przy mnie we wszystkich wyjątkowych chwilach i był źródłem siły oraz determinacji.*

*Synowi **Wincentowi**, którego uśmiech motywował mnie do pracy i dodawał sił każdego dnia.*

## Abstrakt

Monitorowanie losów środków farmaceutycznych w środowiskach wodnym oraz lądowym stało się niezwykle istotne w dobie rosnącej świadomości ekologicznej społeczeństwa. Na szczególną uwagę zasługują środki bakteriobójcze (AMs; *ang. antimicrobial agents*) ze względu na korelacje pomiędzy szybkim rozwojem lekooporności bakterii, a ich wzmożoną konsumpcją i obecnością w środowisku. Najczęściej w próbkach środowiskowych monitorowane są wybrane zanieczyszczenia, uregulowane przepisami prawnymi lub będące przedmiotem zainteresowania opinii publicznej. Powszechnie stosowana analiza celowana nie jest wystarczająca do obiektywnej oceny stanu środowiska, ponieważ można ją stosować wyłącznie do ograniczonej liczby związków, dla których dostępne są substancje wzorcowe. Ponadto AMs ulegają przemianom pod wpływem działania czynników środowiskowych, tworząc produkty transformacji (TPs; *ang. transformation products*) o nieznanym budowie i właściwościach. **Celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było opracowanie nowych metod analitycznych, użytecznych w analizie wybranych AMs oraz ich TPs obecnych w próbkach środowiskowych.** Monitorowanie rozprzestrzenienia się zarówno AMs, jak i ich TPs w próbkach środowiskowych jest możliwe z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Wykorzystanie różnych trybów skanowania tandemowego spektrometru mas, pozwala na analizę przesiewową oraz analizę niecelowaną szerokiej grupy zanieczyszczeń obecnych w próbce. Na podstawie dostępnych raportów dotyczących spożycia leków w Europie wybrano do analiz 22 AMs z 7 grup leków (sulfonamidów, tetracyklin, fluorochinolonów, makrolidów,  $\beta$ -laktamów, linozyamidów oraz glikopeptydów). Rozprawa jest zbiorem dziewięciu prac opublikowanych w zagranicznych czasopiśmie naukowych. Na etapie przeprowadzonego studium literaturowego wytypowano najczęściej stosowane w medycynie oraz weterynarii AMs. Następnie opracowano metody ich ekstrakcji i oznaczania z użyciem LC-MS/MS dla różnych typów próbek środowiskowych (wody, gleby, tkanki roślinne). Opracowane procedury zastosowano w badaniach rozpowszechnienia badanych AMs w środowisku wodnym oraz glebie na terenie województwa śląskiego. Wskazano dwa główne źródła AMs w środowisku – oczyszczalnie ścieków oraz nawozy odzwierzęce. Następnie oceniono ich zdolność do akumulacji i trwałość w warunkach środowiskowych. Badania poszerzono o NTA, w celu identyfikacji TPs i zaproponowania ścieżek ich transformacji. Stwierdzono, że obecnie stosowane metody oczyszczania ścieków nie są wystarczające, aby w pełni usunąć AMs ze ścieków i zaproponowano dwie metody alternatywne dla oczyszczania wód i ścieków (fotokataliza, fitoremediacja).

## Abstract

Monitoring the fate and presence of pharmaceuticals in aquatic and terrestrial environments has become extremely important due to society's developing ecological awareness. Antimicrobial agents (AMs) deserve special attention due to the correlation between the rapid increase in drug resistance of bacteria connected with growth of their consumption and occurrence in the environment. Most often, monitoring covers selected pollutants regulated by law or being of public interest. The commonly used targeted analysis is insufficient for an objective assessment of the state of the environment because it can only be applied to a limited number of compounds for which a reference standard is available. Moreover, AMs are transformed under the influence of environmental factors, creating transformation products (TPs) with unknown structures and properties. **The doctoral thesis aimed to develop new analytical methods that are useful in analyzing the occurrence of selected AMs and their TPs in environmental samples.** Determination of the distribution of AMs and their TPs in environmental samples is possible using liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). The application of various scanning modes of tandem mass spectrometer permits screening and non-targeted analysis of a wide range of contaminants in the sample. Based on the available reports on pharmaceutical consumption in Europe, 22 AMs from 7 drug classes (sulfonamides, tetracyclines, fluoroquinolones, macrolides,  $\beta$ -lactams, lincosamides, and glycopeptides) were selected. The dissertation is based on nine peer-reviewed publications in international scientific journals. As a result of the literature review, the AMs most frequently used in medicine and veterinary medicine were selected. Their extraction and determination methods using LC-MS/MS were developed for various environmental samples (water, soil, plant tissues). The developed procedures were used in monitoring studies of the prevalence of selected AMs in the aquatic environment and soil in the Silesian Voivodeship. Two primary sources of AMs in the environment were identified – wastewater treatment plants and animal fertilizers – and their ability to accumulate and persist in environmental conditions was assessed. The research was extended to include NTA to identify TPs and propose paths for their transformation. Finally, it was found that currently used wastewater treatment methods are not sufficient to fully remove AMs from wastewater and surface water, so two alternative water treatment methods were proposed (photocatalysis and phytoremediation).

# Spis treści

1. Kontekst badawczy i przegląd literatury .....	13
1.1. Pochodzenie i dystrybucja środków bakteriobójczych w środowisku .....	13
1.2. Rozpowszechnienie wybranych środków bakteriobójczych w środowisku wodnym i lądowym... 17	
1.3. Konwencjonalne oraz alternatywne metody oczyszczania ścieków oraz wody ze środków bakteriobójczych .....	21
1.4. Właściwości fizykochemiczne wybranych środków bakteriobójczych .....	27
1.5. Metody analityczne wykorzystywane w oznaczaniu środków bakteriobójczych w próbkach środowiskowych .....	35
1.6. Analiza niecelowana jako narzędzie do poszukiwania produktów transformacji środków bakteriobójczych w środowisku.....	43
2. Wyniki badań i ich znaczenie.....	45
2.1. Wydzielanie i oznaczanie wybranych środków bakteriobójczych oraz ich produktów transformacji w próbkach środowiskowych.....	45
2.1.1. Wydzielanie środków bakteriobójczych z ciekłych próbek środowiskowych.....	45
2.1.2. Wydzielanie środków bakteriobójczych ze stałych próbek środowiskowych .....	47
2.1.3. Dobór parametrów pracy spektrometru mas .....	54
2.2. Środki bakteriobójcze w środowisku wodnym: metody analityczne w identyfikacji źródeł ich wprowadzania oraz rozpowszechnienia .....	58
2.3. Losy środków bakteriobójczych w glebie – metody analityczne w ocenie ich mobilności oraz dostępności dla roślin .....	62
2.4. Fitoremediacja oraz fotokataliza jako alternatywne metody oczyszczania wody z mikrozanieczyszczeń środkami bakteriobójczymi .....	65
2.5. Ścieżki transformacji środków bakteriobójczych w środowisku .....	73
Podsumowanie i wnioski .....	88
Bibliografia .....	91
Dorobek naukowy .....	101
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej .....	105

## Wykaz skrótów i akronimów

<i>Akronim/skrót</i>	<i>Termin w języku polskim</i>	<i>Termin w języku angielskim</i>
14-OH-CLR	14-hydroksy-klarytromycyna	14-hydroxy-clarithromycin
AcA	kwas octowy	acetic acid
ACN	acetonitryl	acetonitrile
Ac-SFM	4-N-acetylosulfametazyna	4-N-acetylsulfamethazine
AMOX	amoksycylina	amoxicillin
AMP	ampicylina	ampicillin
AMs	środki bakteriobójcze	antimicrobial agents
AOPs	zaawansowane procesy utleniania	advanced oxidation processes
AS	osad czynny	activated sludge
AZI	azytromycyna	azithromycin
BAF	współczynnik bioakumulacji	bioaccumulator factor
CAD	gaz kolizyjny	collision gas
CE	energia kolizji	collision energy
CEC	zdolność do wymiany kationów	cation exchange capacity
CEL	cefaklor	cefaclor
CFM	cefiksym	cefixime
CFX	cefaleksyna	cephalexin
CIP	ciprofloksacyna	ciprofloxacin
CLD	klindamycyna	clindamycin
CLR	klarytromycyna	clarithromycin
CQD	węgłowe kropki kwantowe	carbon quantum dots
CTX	cefotaksym	cefotaxime
CUR	gaz kurtynowy	curtain gas
CV	współczynnik zmienności	coefficient of variation
CXP	energia na wyjściu z komory kolizyjnej	collision cell exit potential
DAD	detektor z matrycą diodową	diode array detector
DANO	danofloksacyna	danofloxacin
DDD	definiowana dzienna dawka	defined daily doses
DIF	difloksacyna	difloxacin
DOX	doksycyklina	doxycycline
DP	potencjał deklasteryzacji	declustering potential
DRW	woda rzeczna pobrana za punktem zrzutu ścieków oczyszczonych	downstream river water
DW	sucha masa	dry weight
EC50	-	half maximal effective concentration
ECDC	Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	kwas (etylenodiamino)tetraoctowy	ethylenediaminetetraacetic acid
EMS	wzmocnione skanowanie MS	enhanced MS scan
ENF	enrofloksacyna	enrofloxacin
ENO	enoksacyna	enoxacin
EP	potencjał na wejściu do komory kolizyjnej	entrance potential
EPI	wzmocnione skanowanie jonów potomnych	enhanced product ion
ERY	erytromycyna	erythromycin
ESI	jonizacja przez elektrorozpylanie	electrospray ionization
FA	kwas mrówkowy	formic acid

FL	detektor fluorescencyjny	fluorescence detector
FLO	florfenikol	florfenicol
FLU	flumechina	flumequine
FQs	fluorochinolony	fluoroquinolones
GO	tlenek grafenu	graphene oxide
GS	gaz nośny	ion source gas
HCl	kwask chlorowodorowy	hydrochloric acid
HLB	równowaga hydrofilowo-lipofilowa	hydrophilic-lipophilic balance
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa	high performance liquid chromatography
HQC	próbka kontrolna o wysokiej zawartości analitu	high-quality control sample
HRMS	spektrometr mas wysokiej rozdzielczości	high resolution mass spectrometer
IC50	-	half maximal inhibitory concentration
IDA	akwizycja zależna danych	information-dependent acquisition
IS	napięcie źródła jonów	ion spray voltage
I <sub>s</sub>	siła jonowa	ionic strength
I <sub>T</sub>	indeks translokacji	translocation index
LAs	linkozyamidy	lincozamides
LC	chromatografia cieczowa	liquid chromatography
LIN	linkomycyna	lincomycin
LIT	liniowa pułapka jonowa	linear ion trap
LLE	ekstrakcja ciecz-ciecz	liquid-liquid extraction
LOD	granica wykrywalności	limit of detection
LOM	lomefloksacyna	lomefloxacin
LOQ	granica oznaczalności	limit of quantification
LPME	mikroekstrakcję do fazy ciekłej	liquid phase microextraction
LQC	próbka kontrolna o niskiej zawartości analitu	low-quality control sample
LVF	lewofloksacyna	levofloxacin
MAR	marbofloksacyna	marbofloxacin
MAX	wymiana anionowa w trybie mieszanym	mixed-mode anion-exchange
ME	efekt matrycowy	matrix effect
MeOH	metanol	methanol
MET	metronidazol	metronidazole
MQC	próbka kontrolna o średniej zawartości analitu	medium-quality control sample
MQs	makrolidy	macrolides
MR	stopień mineralizacji	mineralization rate
MRM	tryb monitorowania reakcji następczych	multiple reactions monitoring mode
MS	spektrometr mas	mass spectrometer
MS/MS	tandemowy spektrometr mas	tandem mass spectrometry
MXF	moksyfloksacyna	moxifloxacin
n.d.	brak danych	no data
NAL	kwask nalidyksowy	nalidixic acid
N-DES-CLR	N-desmetylkларыtromycyna	N-desmethylclarithromycin
NFC	norfloksacyna	norfloxacin
NL	utrata cząsteczki obojętnej	neutral loss scan
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy	nuclear magnetic resonance
NTA	analiza niecelowana	non-target analysis
OC	węgiel organiczny	organic carbon

OFC	ofloksacyna	ofloxacin
ORB	orbifloksacyna	orbifloxacin
OTC	oksytetracyklina	oxytetracycline
OXA	kwas oksolinowy	oxolinic acid
PEN	penicyliny	penicillins
PENI	penicylina	penicillin
PI	skanowanie jonów pierwotnych	precursor ion scan
PIP	kwas pipemidowy	pipemidic acid
PLE	ekstrakcja cieczą pod ciśnieniem	pressurized liquid extraction
p-MRM	pseudo-MRM	pseudo-MRM
QNs	chinolony	quinolones
QuEChERS	-	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
QqQ	potrójny kwadrupol	triple quadrupole
RGO	zredukowany tlenek grafenu	reduced graphene oxide
RTM	roksytromycyna	roxithromycin
SAC	sulfacetamid	sulfacetamide
SAMs	syntetyczne środki bakteriobójcze	synthetic antimicrobial agents
SARA	sarafloksacyna	sarafloxacin
SAs	sulfonamidy	sulfonamides
SBZ	sulfabenzamid	sulfabenzamide
SCP	sulfachloropirydazyna	sulfachloropyridazine
SCT	sukcynylosulfatiazol	succinyl-sulfathiazole
SCX	sulfachinoksalina	sulfaquinoxaline
SCZ	sulfaklozyna	sulfaclozine
SD	odchylenie standardowe	standard deviation
SDM	sulfadimetoksyna	sulfadimethoxine
SDX	sulfadoksyna	sulfadoxine
SFD	sulfadiazyna	sulfadiazine
SFG	sulfaguanidyna	sulfaguanidina
SFH	sulfametizol	sulfamethizole
SFM	sulfametazyna	sulfamethazine
SFP	sulfapirydyna	sulfapyridine
SFR	sulfamerazyna	sulfamerazine
SFT	sulfatiazol	sulfathiazole
SFX	sulfizoksazol	sulfisoxazole
SH	sulfachinoksalina	sulfachinoxaline
SLE	ekstrakcja ciało stałe-ciecz	solid-liquid extraction
SM	sulfameter	sulfameter
SMM	sulfamonometoksyna	sulfamonomethoxine
SMP	sulfametoksyropydazyna	sulfamethoxypyridazine
SMX	sulfametoksazol	sulfamethoxazole
SN	sulfanitran	sulfanitran
SPE	ekstrakcja do fazy stałej	solid-phase extraction
SPI	spiramycyna	spiramycin
SSM	sulfisomidin	sulfisomidin
TA	analiza celowana	target analysis
TC	tetracyklina	tetracycline
TCCI	chlorotetracyklina	chlortetracycline



TCs	tetracykliny	tetracyclines
TEM	temperatura źródła jonów	ion source temperature
TFA	kwask trifluorooctowy	trifluoroacetic acid
TIL	tylmikozyna	tylmycosin
TOF/MS	spektrometr masowy czasu przelotu	time-of-flight mass spectrometer
TPs	produkty transformacji	transformation products
TRI	trimetoprim	trimethoprim
TWW	ściek oczyszczony	treated wastewater
TYL	tylozyna	tylosin
UHPLC	ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa	ultra-high-performance liquid chromatography
URW	woda rzeczna pobrana przed punktem zrzutu ścieków oczyszczonych	upstream river water
UWW	ściek nieoczyszczony	untreated wastewater
VAN	wankomycyna	vancomycin
WCX	słaby wymienniacz kationów	weak cation exchange
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia	World Health Organization
WW	mokra masa	wet weight
WWTP	oczyszczalnia ścieków	wastewater treatment plant
WWTPs	oczyszczalnie ścieków	wastewater treatment plants
XPS	rentgenowska spektrometria fotoelektronów	X-ray photoelectron spectroscopy
β-Ls	betalaktamy	beta-lactams

## Lista jednotematycznych publikacji

Na niniejszą pracę składa się następujący zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów:

[P1] **Kokoszka (Stando), K.**; Wilk, J.; Felis, E.; Bajkacz, S.\* Application of UHPLC-MS/MS method to study occurrence and fate of sulfonamide antibiotics and their transformation products in surface water in highly urbanized areas. *Chemosphere* **2021**, 283, 131189, doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131189. **(IF=8,943; 140 pkt)**

[P2] **Kokoszka (Stando), K.**; Zieliński, W.; Korzeniewska, E.; Felis, E.; Harnisz, M.; Bajkacz, S.\* Suspect screening of antimicrobial agents transformation products in environmental samples development of LC-QTrap method running in pseudo MRM transitions. *Sci. Total. Environ.* **2022**, 808, 152114, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152114. **(IF=10,753; 200 pkt)**

[P3] **Stando, K.\***; Kasprzyk, P.; Felis, E.; Bajkacz, S. Heterogeneous Photocatalysis of Metronidazole in Aquatic Samples. *Molecules* **2021**, 26(24), 1-16, doi: 10.3390/molecules26247612. **(IF=4,927, 140 pkt)**

[P4] **Stando, K.**; Korzeniewska, E.; Felis, E.; Harnisz, M.; Buta M.; Bajkacz, S.\* Determination of antimicrobial agents and their transformation products in an agricultural water-soil system modified with manure. *Sci. Rep.* 2022, 12, 17529, doi: 10.1038/s41598-022-22440-5. **(IF=4,996; 140 pkt)**

[P5] **Stando, K.\***; Korzeniewska, E.; Felis, E.; Harnisz, M.; Bajkacz, S.\* Uptake of pharmaceutical pollutants and their metabolites from soil fertilized with manure to parsley tissues. *Molecules* **2022**, 27(14), 1–20, doi: 10.3390/molecules27144378. **(IF=4,927; 140 pkt)**

[P6] **Stando, K.\***; Czyż, A.; Gajda, M.; Felis, E.; Bajkacz, S.\* Study of the Phytoextraction and Phytodegradation of Sulfamethoxazole and Trimethoprim from Water by *Limnobium laevigatum*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, 19, 1-18, doi:10.3390/ijerph192416994. **(IF=4,614; 140 pkt)**

[P7] **Stando, K.**; Wilk, J.; Jakóbi-Kolon, A.; Felis, E.; Bajkacz, S.\* Application of UHPLC-MS/MS method to monitor the occurrence of sulfonamides and their transformation products in soil in Silesia, Poland. *Enviro. Sci. & Pollution Res.* **2023**, 30, 112922–112942, doi: 10.1007/s11356-023-30146-y. **(IF=5,800; 100 pkt)**

[P8] **Stando, K.**; Grzybowski, M.; Byczek-Wyrostek, A.; Bajkacz, S.\* Efficiency of phytoremediation and identification of biotransformation pathways of fluoroquinolones in the aquatic environment. *Int. J. Phytoremediation* **2023**, 26(7), 1027–1037, doi: 10.1080/15226514.2023.2288898. **(IF= 3,700; 100 pkt)**

[P9] **Stando, K.\***; Kopiec, M.; Pieszczyk, M.; Zogornik, P.; Kowalska, K.; Felis, E.; Bajkacz, S.\* Degradation of fluoroquinolones and macrolides by solar light-driven heterogeneous photocatalysis – Proposed drug transformation pathways. *J. Photochem. Photobiol. A* **2024**, 453, 115651, doi: 10.1016/j.jphotochem.2024.115651. **(IF=4,300; 70 pkt)**

$$\sum_{IF (P1-P9)} = 52,960$$

$$\sum_{MNI_{SW} (P1-P9)} = 1170$$

\* – autor korespondencyjny

## **Wkład autorski doktorantki**

Oświadczam, że jestem współautorem wiodącym przedstawionego cyklu publikacji **P1 – P9**. Mój udział w wymienionych pracach polegał na opracowaniu metodologii badań, analizie formalnej, walidacji, zarządzaniu danymi, wizualizacji, prowadzeniu badań, pozyskiwaniu funduszy, przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu oraz jego poprawkach redakcyjnych.

*Oświadczenia współautorów publikacji szczegółowo określające ich indywidualny wkład autorski znajdują się w załącznikach do niniejszej rozprawy.*

## Cel pracy

Celem przedłożonej rozprawy doktorskiej było **opracowanie nowych metod analitycznych, użytecznych w badaniach obecności oraz stabilności szerokiej gamy środków bakteriobójczych (AMs) oraz produktów ich transformacji (TPs) w próbkach środowiskowych. Uzupełniono również lukę badawczą, dotyczącą losów oraz ścieżek transformacji AMs po ich wprowadzeniu do środowiska.**

## Zakres badań

- I. Opracowano warunki oznaczania wybranych AMs w czterech rodzajach próbek środowiskowych (woda, ścieki, gleby, tkanki roślinne) z użyciem LC-ESI-MS/MS [P1–P9].
- II. Opracowano procedury ekstrakcji wybranych AMs z czterech rodzajów próbek środowiskowych [P1,P2,P4–P8].
- III. Scharakteryzowano właściwości fizykochemiczne wybranych próbek środowiskowych i określono, które z nich mogą wpływać na odtwarzalność metod [P2,P7].
- IV. Wykonano walidację opracowanych procedur analitycznych [P1,P2,P4–P8].
- V. Przeprowadzono badania monitoringowe środowiska wodnego, w celu ustalenia źródeł wprowadzania AMs do środowiska oraz oceny ich rozpowszechnienia [P1,P2].
- VI. Zbadano mobilność oraz biodostępność wybranych AMs weterynaryjnych po ich wprowadzeniu wraz z obornikiem do gleby w warunkach polowych [P4,P5,P7].
- VII. Zbadano skuteczność usuwania AMs ze środowiska wodnego za pomocą dwóch metod oczyszczania – fotokatalizy oraz fitoremediacji – jako alternatywnych dla tradycyjnej metody z użyciem osadu czynnego [P3,P6,P8,P9].
- VIII. W każdej z badanych próbek środowiskowych zidentyfikowano obecne TPs AMs i jeżeli było to możliwe, zaproponowano ich ścieżkę transformacji [P1–P9].

## Teza pracy

Sformułowano trzy główne tezy badawcze, których weryfikacja była celem niniejszej pracy:

- (I) Środki bakteriobójcze są **powszechnym** zanieczyszczeniem środowiska, które w zależności od swoich właściwości fizykochemicznych wykazują zdolność do **migracji lub akumulacji** w wodach powierzchniowych, gruntowych oraz glebach.
- (II) **Po wprowadzeniu do środowiska środki bakteriobójcze ulegają transformacji** pod wpływem czynników biotycznych oraz abiotycznych. Powstałe produkty transformacji nie są **wykrywane w tradycyjnych badaniach przesiewowych**, ze względu na brak informacji o ich strukturze oraz właściwościach fizykochemicznych.
- (III) Powszechnie stosowane w Polsce **metody oczyszczania ścieków** z użyciem osadu czynnego **nie są wystarczające**, aby w pełni usunąć pozostałości środków bakteriobójczych ze ścieków. **Ścieki oczyszczone odprowadzane do wód powierzchniowych są źródłem zarówno zanieczyszczeń farmaceutycznych, jak i ich produktów transformacji.**

## 1. Kontekst badawczy i przegląd literatury

### 1.1. Pochodzenie i dystrybucja środków bakteriobójczych w środowisku

Od lat 40 XX wieku obserwuje się silny rozwój przemysłu farmaceutycznego, który wpłynął znacząco na zmniejszenie śmiertelności ludzi oraz zachorowalności na różnego rodzaju infekcje [1]. Za podstawę leczenia chorób zakaźnych przyjęto terapię środkami bakteriobójczymi (AMs; *ang. antimicrobial agents*). Pojęcie AMs definiuje środki farmaceutyczne, które zabijają lub hamują rozwój bakterii, takie jak antybiotyki oraz syntetyczne środki bakteriobójcze (SAMs). Zapotrzebowanie na AMs stale rośnie, ze względu na powszechne stosowanie w medycynie, jak i weterynarii. W 2015 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *ang. World Health Organisation*) zainicjowała globalny program nadzoru spożycia środków przeciwdrobnoustrojowych, w odpowiedzi na brak ujednoliconej metodologii gromadzenia danych oraz brak danych dotyczących spożycia AMs. Jako wspólny wskaźnik zużycia leków przyjęto Dawkę Dobową Definiowaną (DDD) na tysiąc mieszkańców [2]. W raporcie WHO obejmującym lata 2016 – 2018 w regionie Europejskim spożycie AMs było w zakresie 17,9 DDD (IQR (rozstęp ćwiartkowy): 14,5–24,3) na 1000 mieszkańców, przy czym w Polsce wynosiło ono 24,3 DDD na 1000 mieszkańców, co odpowiada 306,61 tonom skonsumowanych leków [3]. Natomiast w raportach Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC, *ang. European Centre for Disease Prevention and Control*) średnie całkowite spożycie (obejmujące sektor społeczny i szpitalny) AMs w regionie Europejskim wynosiło w latach 2019, 2020 oraz 2021 odpowiednio: 19,8, 16,4 oraz 16,4 DDD na 1000 mieszkańców [4,5]. W latach 2019 – 2021 spożycie AMs w Polsce nadal było ponad średnią Europejską, w zakresie 18,5 – 23,6 DDD na tysiąc mieszkańców [4,5].

AMs były przez lata stosowane także w hodowli zwierząt oraz akwakulturze w celu zapobiegania chorobom, przyspieszania wzrostu zwierząt oraz poprawy wydajności produkcji produktów pochodzenia zwierzęcego. Spożycie AMs u zwierząt gospodarskich (bydła, drobiu, trzody chlewnej) wynosiło  $63151 \pm 1560$  ton w 2010 r., a według rokowań wzrośnie ono o 67% do 2030 roku [6]. Na terenie Unii Europejskiej już w 2003 roku wprowadzono regulacje ograniczające stosowanie AMs w hodowli zwierząt oraz promowano praktyki, które zmniejszały konieczność ich używania [7]. Pozostałości AMs stosowanych w leczeniu weterynaryjnym znajdują się odchodach zwierząt, które w postaci obornika są stosowane jako naturalny nawóz. W badaniach przesiewowych odchodów kur z 5 farm wykryto obecność 12 AMs weterynaryjnych z grup sulfonamidów (SAs), tetracyklin (TCs), fluorochinolonów (FQs) oraz SAMs, których stężenia były w zakresach odpowiednio: 0,02 – 1,77  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 0,49 – 19,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1,75 – 41,78  $\mu\text{g}/\text{kg}$  oraz 0,04 – 1,88  $\mu\text{g}/\text{kg}$  [8]. W oborniku bydlęcym obecne były głównie AMs z grupy TCs oraz FQs w zakresach stężeń odpowiednio 0,4 – 46,0  $\text{mg}/\text{kg}$  oraz 0,02 – 103  $\text{mg}/\text{kg}$  [9]. Szeroki zakres stężeń w jakim wykrywano są AMs w odchodach zwierzęcych może wynikać z trzech przyczyn: (I) różne tempo metabolizmu AMs w jelitach zwierząt, w zależności od gatunku zwierzęcia, (II) stosowanie różnych ilości, typów oraz dawek AMs, w zależności od regulacji prawnych w danym kraju, (III) różnice wynikające z techniki oznaczenia oraz parametrów walidacyjnych zastosowanej metody [9,10]. Istotnym czynnikiem jest również proces kompostowania pozostałości przemysłowych (ściółka, odchody, pióra,

pasze), prowadzący do poprawy jakości i dostępności składników odżywczych w oborniku, a także eliminacji organizmów chorobotwórczych [11]. W ustawie z dnia 27 kwietnia 2001 r. „Prawo ochrony środowiska” widnieje zapis o konieczności rekultywacji gleby w przypadku wykrycia w niej zanieczyszczeń. W rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 1 września 2016 r. w sprawie sposobu prowadzenia oceny zanieczyszczenia powierzchni ziemi, na liście substancji szczególnie ryzykownych dla stanu środowiska ujęto wybrane metale i niemetale, cyjanki, węglowodory alifatyczne, aromatyczne i chlorowane, środki ochrony roślin oraz wybrane rozpuszczalniki organiczne, natomiast nie znalazły się żadne AMs. W rozporządzeniu UE 2019/1009 z dnia 5 czerwca 2019 ustanowiono, że w produktach nawozowych powstałych z bioodpadów należy zapobiegać występowaniu zanieczyszczeń albo je ograniczać. Ustalono maksymalne dopuszczalne zawartości metali ciężkich oraz wybranych związków organicznych (biuret) i nieorganicznych, natomiast nie uwzględniono pozostałości AMs.

Po wprowadzeniu do gleby wraz z obornikiem, AMs w zależności od ich właściwości fizykochemicznych mogą (I) migrować w glebie, w konsekwencji zanieczyszczając wody powierzchniowe i gruntowe, (II) akumulować się w środowisku lub (III) podlegać transformacjom na skutek czynników biotycznych (mikroorganizmy) oraz abiotycznych (fotodegradacja, hydroliza) z utworzeniem nowych produktów transformacji (TPs, *ang. transformation products*). Kluczowym procesem decydującym o mobilności AMs w glebie jest sorpcja, na którą wpływ mają takie parametry gleby jak: pH, zawartość węgla organicznego (OC, *ang. organic carbon*), zdolność do wymiany kationów (CEC, *ang. cation exchange capacity*), siła jonowa ( $I_s$ , *ang. ionic strength*), temperatura otoczenia i tekstura gleby [12,13]. Przyjmując za kryterium zdolność sorpcyjną gleby, można wyróżnić jej 3 rodzaje: o słabej zdolności sorpcyjnej (np. piargi, piasek), średniej zdolności sorpcyjnej (np. o wysokiej zawartości tlenków żelaza) oraz dużej zdolności sorpcyjnej (np. o wysokiej zawartości kwasów humusowych i OC) [14]. W zależności od wartości  $pK_a$  oraz pH gleby, AMs mogą występować częściowo lub w całości w postaci zjonizowanej (anionowej lub kationowej), obojnaczej lub niezjonizowanej [13,15]. Sorpcja cząsteczek w postaci niezjonizowanej jest kontrolowana przez oddziaływania van der Waalsa oraz wiązania donorowo-akceptorowe ze składnikami organicznymi gleby. Cząsteczki w postaci zjonizowanej oddziałują z ładunkami powierzchniowymi gleby poprzez oddziaływania elektrostatyczne (wymiana kationowa, mostkowanie kationowe, kompleksowanie) [14,16]. Materia organiczna zwiększa sorpcję AMs do gleby na 3 sposoby: (I) poprzez zwiększenie ładunku ujemnego na powierzchni tlenków żelaza, zwiększając przyciąganie elektrostatyczne AMs o ładunku dodatnim, (II) poprawę stabilności koloidów tlenków żelaza, a przez to zwiększenie ilości centr aktywnych sorpcji oraz (III) poprzez białka zawarte w materii organicznej sprzyjające adsorpcji AMs, działające w roli pomostu w tworzeniu kompleksów pomiędzy AMs, a składnikami gleby [14,17]. Wpływ temperatury otoczenia na proces sorpcji odzwierciedla się głównie w szybkościach dyfuzji endotermicznej, egzotermicznej i molekularnej AMs w glebie [18].  $I_s$  może wpływać na sorpcję AMs, hamując ją poprzez zmniejszanie ilości centrów aktywnych, wpływając na przepływ ładunków w warstwie elektrostatycznej gleby oraz wielkość porów, a co za tym idzie całkowitą liczbę miejsc sorpcyjnych [14]. W niektórych przypadkach obserwowany był efekt odwrotny, gdzie wzrost  $I_s$  promował adsorpcję AMs do gleby poprzez wystąpienie efektu wysalania i wytrącania AMs, mostkowania kationów  $Ca^{2+}$ , które tworzyły kompleks z AMs lub

zmniejszenie odpychania elektrostatycznego pomiędzy kwasami humusowymi, a AMs [14]. Dodatek obornika zwierzęcego może zwiększać pojemność sorpcyjną gleby wobec niektórych SAs, FQs oraz TCs, a w związku z tym zmniejszyć ich mobilność [19,20]. Można zauważyć, że po uwolnieniu AMs do środowiska o ich mobilności i tendencji do akumulacji decydują zarówno właściwości fizykochemiczne (rozpuszczalność, lotność,  $pK_a$ ,  $\log P$ ), jak i właściwości gleby (pH, zawartość OC,  $I_s$ , CAC) oraz warunki środowiska (temperatura, opady deszczu). AMs po wprowadzeniu do gleby mogą wpływać na wzrost i kondycję roślin, a także akumulować się w ich tkankach. Parametry takie jak, rozpuszczalność w wodzie, zdolność do adsorpcji i forma jonowa związku wpływają bezpośrednio na efektywność pochłaniania AMs z gleby oraz wody [21].

Na obszarach miejskich oczyszczalnie ścieków (WWTPs, *ang. wastewater treatment plants*) są głównym źródłem wprowadzającym AMs do środowiska, poprzez zrzuty oczyszczonych ścieków do rzek [22]. AMs trafiają do ścieków bytowych (I) po wprowadzeniu do kanalizacji miejskiej wraz z wydaliniami człowieka oraz (II) przez nieprawidłową utylizację przeterminowanych leków [23]. Również ścieki przemysłowe, a w szczególności pochodzące z zakładów przetwórstwa mięsnego zawierają znaczne ilości AMs, ze względu na stosowanie antybiotykoterapii u zwierząt [24]. Rodzaj oraz stężenie wykrywanych AMs w ściekach zależą od pory roku, popularności leków w sezonie chorobowym, klimatu (ilość opadów, intensywność promieniowania słonecznego, temperatura wody) oraz źródeł, z których one pochodzą (miejskie, szpitalne, przemysłowe) [23,25]. W zależności od stosowanego w WWTPs systemu oczyszczania ścieków, AMs zostają częściowo lub całkowicie usunięte, a także mogą ulegać transformacjom z utworzeniem TPs [26,27]. Skuteczność usuwania AMs oraz ich obecność w ściekach oczyszczonych nie są rutynowo monitorowane. Dlatego, jeśli związek jest odporny wobec wybranej metody oczyszczania, to po oczyszczeniu ścieków jest uwalniany do środowiska wraz ze ściekami oczyszczonymi poprzez ich odprowadzenie do zbiorników wodnych. Skuteczność tych mechanizmów usuwania w dużym stopniu zależy od właściwości fizykochemicznych i struktury chemicznej obecnych w ściekach AMs. Wiele doniesień literaturowych z całego świata udowadnia, że ścieki są rezerwuarem bakterii antybioopornych, genów antybioopornych oraz zjadliwości [28–31]. Ilość oraz rodzaj genów lekooporności zależy od rodzaju ścieków oraz źródła ich pochodzenia [32]. Geny antybiooporności rozpowszechniają się w glebach rolniczych w wyniku nawożenia ich obornikiem zwierzęcym, osadami z oczyszczalni ścieków oraz podlewania ściekami [9,33]. W 2018 roku w Polsce weszła w życie ustawa z dnia 20 lipca 2017 roku o nazwie Prawo Wodne. Wprowadziła ona pojęcie substancji priorytetowej, czyli zanieczyszczenia chemicznego wód powierzchniowych, które może być toksyczne dla organizmów wodnych, zdolne do akumulacji w środowisku i którego emisję należy stopniowo ograniczać, ponieważ powoduje ono spadek różnorodności biologicznej oraz jest zagrożeniem dla zdrowia ludzkiego. W wykazie substancji priorytetowych z 2019 r. ujęto 45 szczególnie szkodliwych zanieczyszczeń wody z różnych grup związków (m.in. niemetale, metale, biocydy, węglowodory ropopochodne, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, związki halogenoorganiczne). W żadnej z wymienionych kategorii nie ujęto zanieczyszczeń farmaceutycznych, pomimo ich stałego wprowadzania do środowiska. Wybrane AMs, takie jak amoksycylina (AMOX), ciprofloksacyna (CIP), sulfametoksazol (SMX), trimetoprim (TRI),

klindamycyna (CLD), ofloksacyna (OFC), cefaleksyna (CFX) zostały ujęte na listach obserwowanych substancji (*ang. watch list*) w wodach powierzchniowych zgodnie z dyrektywą 2013/39/UE, która pośrednio podlega pod ramową dyrektywę wodną (2006/60/WE). Lista obserwowanych substancji nie stanowi jednak formalnego dokumentu prawnego, który nakładałby bezpośrednią obligację monitorowania wymienionych w niej związków. W dniu 10 kwietnia 2024 roku Parlament Europejski zatwierdził nowe unijne przepisy dotyczące zbierania, oczyszczania i odprowadzania ścieków komunalnych (P9\_TA(2024)0222). Nakładają one na państwa członkowskie obowiązek monitorowania oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe w ściekach komunalnych.

Tabela 1. Porównanie toksyczności wybranych AMs wobec mikroorganizmów oraz organizmów wodnych na podstawie parametrów EC<sub>50</sub> oraz IC<sub>50</sub>

AMs	Gatunek (Gromada)	Parametr (stężenie) [mg/l]	Literatura
NOR; TYL SMX; TC	<i>Bacillus subtilis</i> (Bakteria)	IC <sub>50</sub> (0,16); IC <sub>50</sub> (1,00); IC <sub>50</sub> (3,60); IC <sub>50</sub> (0,46)	[34]
LVF; NFC; TYL SMX; TC	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Bakteria)	IC <sub>50</sub> (0,10); IC <sub>50</sub> (0,12); IC <sub>50</sub> (25,82); IC <sub>50</sub> (3,90); IC <sub>50</sub> (0,25)	[34]
SDM [48 h]; SMX [48 h] SFP [48 h]; TRI [48 h]	<i>Chlorella vulgaris</i> (Algi zielone)	EC <sub>50</sub> (5,19); EC <sub>50</sub> (0,98); EC <sub>50</sub> (1,93); EC <sub>50</sub> (123,22)	[35]
SDM [72 h]; SMX [72 h] SFP [72 h]; TRI [72 h]	<i>Chlorella vulgaris</i> (Algi zielone)	EC <sub>50</sub> (7,65); EC <sub>50</sub> (1,51); EC <sub>50</sub> (1,00); EC <sub>50</sub> (90,86)	[35]
CLR; 14-OH-CLR; N-DES-CLR	<i>Danio rerio</i> (Ryba)	EC <sub>50</sub> (<2000); EC <sub>50</sub> (<2000); EC <sub>50</sub> (<2000)	[36]
MET; FLO OTC	<i>Scenedesmus vacuolatus</i> (Alga zielona)	EC <sub>50</sub> (705,00); EC <sub>50</sub> (18,00); EC <sub>50</sub> (40,40)	[37]
MET; FLO OTC	<i>Lemna minor</i> (Roślina naczyniowa)	EC <sub>50</sub> (>25,00); EC <sub>50</sub> (2,96); EC <sub>50</sub> (3,26)	[37]
MET; FLO OTC	<i>Daphnia magna</i> (Skrzelonóg)	EC <sub>50</sub> (211,00); EC <sub>50</sub> (337,00); EC <sub>50</sub> (114,00)	[37]
OTC SMX	<i>Vibrio fischeri</i> (Bakteria)	EC <sub>50</sub> (64,50) EC <sub>50</sub> (23,30)	[38]
ERY; OTC; SMX; OFC; LIN; CLR	<i>Brachionus calyciflorus</i> (Wrotki)	EC <sub>50</sub> (27,53); EC <sub>50</sub> (34,21); EC <sub>50</sub> (26,27); EC <sub>50</sub> (29,88); EC <sub>50</sub> (24,94); EC <sub>50</sub> (35,46)	[38]
ERY; OTC; SMX OFC; LIN; CLR	<i>Thamnocephalus platyurus</i> (Stawonóg)	EC <sub>50</sub> (17,68); EC <sub>50</sub> (25,00); EC <sub>50</sub> (35,36); EC <sub>50</sub> (33,98); EC <sub>50</sub> (30,00); EC <sub>50</sub> (33,64)	[38]
ERY; OTC; SMX; OFC; LIN; CLR	<i>Daphnia magna</i> (Skrzelonóg)	EC <sub>50</sub> (22,45); EC <sub>50</sub> (22,64); EC <sub>50</sub> (25,20); EC <sub>50</sub> (31,75); EC <sub>50</sub> (23,18); EC <sub>50</sub> (25,72)	[38]
ERY; OTC; SMX OFC; LIN; CLR	<i>Ceriodaphnia dubia</i> (Stawonogi)	EC <sub>50</sub> (10,23); EC <sub>50</sub> (18,65); EC <sub>50</sub> (15,51); EC <sub>50</sub> (17,10); EC <sub>50</sub> (13,98); EC <sub>50</sub> (18,66)	[38]

14-OH-CLR – 14-hydroksy-klarytromycyna, CLR – klarytromycyna, ERY – erytromycyna, FLO – florfenicol, LIN – linkomycyna, LVF – lewofloksacyna, MET – metronidazol, N-DES-CLR – N-desmetylklarytromycyna, NFC – norfloksacyna, OFC – ofloksacyna, OTC – oksytetracyklina, SDM – sulfadimetoksin, SFP – sulfapyrydyna, SMX – sulfametoksazol, TC – tetracyklina, TRI – trimetoprim, TYL – tylozyna.

W tabeli 1 zestawiono parametry EC<sub>50</sub> oraz IC<sub>50</sub> wybranych AMs dla mikroorganizmów oraz organizmów wodnych, w celu porównania ich ekotoksyczności. Wartości EC<sub>50</sub> przedstawione w tabeli 1 są w zakresie 0,13 do 2000 mg/l w zależności od gatunku organizmu. Podany zakres EC<sub>50</sub> pokrywa się z zakresem stężeń, w jakim AMs występują w środowisku wodnym (ng/l – mg/l). Zatem nawet jeśli wartość EC<sub>50</sub> dla AMs wobec danego gatunku jest wyższa niż jego stężenie w środowisku, to w dalszym ciągu należy pamiętać, że zanieczyszczenia te mogą występować w mieszaninach, wywierając addytywny efekt toksyczny. Ponadto parametry EC<sub>50</sub> oraz IC<sub>50</sub> określają toksyczność ostrą, występującą w wyniku krótkoterminowego kontaktu organizmu z zanieczyszczeniem. W przypadku długoterminowego kontaktu organizmu z AMs efekt toksyczny mogą wywoływać nawet jego znacznie niższe stężenia. Z tego powodu coraz większą uwagę przywiązuje się do monitorowania zawartości AMs w środowisku oraz opracowywania strategii mających na celu ograniczenie ich wprowadzania.



## **1.2. Rozpowszechnienie wybranych środków bakteriobójczych w środowisku wodnym i lądowym**

WHO w 2015 roku opracowała globalny plan działania w sprawie zatrzymania zjawiska lekooporności bakterii, w którym postulowano ograniczenie niewłaściwego stosowania AMs u ludzi oraz zwierząt [39]. W pierwszym cyklu globalnego nadzoru nad spożyciem AMs przeprowadzonym przez WHO obejmującym lata 2016 – 2018 zestawiono dane z 65 krajów. W Europie najczęściej stosowane były leki z grupy penicylin (PEN), TCs, SAs, chinolonów (QNs) oraz MQs, linozyamidów (LAs) oraz streptogramin [3]. Dane dotyczące rozpowszechnienia AMs w środowisku są silnie zróżnicowane. Zaobserwowane różnice wynikają z wyboru i zakresu danych źródłowych, regionalnych różnic stosowania leków oraz zastosowanej do ich oznaczenia metody analitycznej. Zawartość AMs w środowisku jest zmienna w czasie i zależy od warunków atmosferycznych, składu próbki oraz ich stabilności.

Analiza danych zestawionych w tabelach 2 i 3 pozwoliła określić, które AMs są najczęściej wykrywane w środowisku oraz jaki jest zakres ich stężeń w konkretnym rodzaju próbki środowiskowej. W tabeli 4 zebrano dane dotyczące pobierania AMs z gleby przez rośliny, aby ocenić ich zdolność do bioakumulacji i translokacji. Najczęściej badania przesiewowe stałych próbek środowiskowych były ukierunkowane na wybranych przedstawicielach z 5 klas leków – FQs, TCs, SAs, MQs oraz SAMs. Stabilność AMs w środowisku lądowym wahała się od kilku godzin do wielu miesięcy, na co wpływa struktura chemiczna związku oraz temperatura otoczenia [40]. Szeroki zakres w jakim wykrywane są AMs w środowisku jest wypadkową działania czynników środowiskowych wpływających na ich sorpcję w glebie, zmian czasowych oraz miejsca poboru próbki [20]. Do predykcji losów AMs w glebie najczęściej wykorzystywany jest wyznaczony eksperymentalnie współczynnik dystrybucji pomiędzy glebą, a wodą ( $K_D$ ) dla wybranego stężenia farmaceutyku [12]. Wartość  $K_D$  jest zależna od zmiennych parametrów środowiska takich jak: pH, siła jonowa oraz zawartość OC w glebie [12,14].

Mobilność AMs w środowisku zależy od ich właściwości fizykochemicznych m.in. od rozpuszczalności, hydrofilowości oraz potencjału sorpcyjnego. Ponadto, skład gleby, jej tekstura oraz pH mogą wpływać na mechanizmy sorpcji i stopień ich akumulacji [12,41,42]. pH gleby wpływa na jonizację AMs, decydując o tym, jaką formę przyjmują (kationową, anionową, obojętną, obojnaczą) oraz o udziale tych form [43]. Siła jonowa może promować lub hamować adsorpcję AMs przez minerały zawarte w glebie [44]. Temperatura oraz wilgotność wpływają pośrednio na szybkość rozpraszania oraz sorpcję AMs do gleby. Charakter materii organicznej – jej polarność oraz struktura – jest wrażliwy na zmiany wilgotności gleby. Woda w systemie glebowym pełni rolę plastyfikatora, zwiększając dostępność miejsc sorpcyjnych oraz materii organicznej, a wraz ze zmniejszeniem jej udziału zwiększa się sztywność gleby, co wpływa na mechanizm sorpcji i sprzyja tworzeniu się nieekstrahowanych zanieczyszczeń [45]. Dodatek nawozów organicznych pochodzenia zwierzęcego do gleby zwiększa zawartość rozpuszczonego w glebie OC, który może wpłynąć na mobilność AMs na 3 sposoby: (I) ograniczyć ją poprzez zwiększenie pojemności sorpcyjnej gleby, (II) ułatwić ją poprzez konkurencję składników obornika z miejscami aktywnymi gleby lub (III) wpływać na procesy degradacji AMs w środowisku [46,47]. SAs oddziałują z materią organiczną gleby głównie

Tabela 2. Zawartość AMs w próbkach gleb zebranych w różnych krajach świata

Lp.	AMs	Rodzaj próbki	Stężenie	Metoda analityczna	Miejsce poboru	Lit.
1	TCs (TC, OTC, TCCI, DOX); SAs (SMX, SFD, SFM, SMM, SCX, SDM, SM, SCZ); FQs (NFC, OFC, CIP, ENF); MQs (RTM)	Gleby nawożone nawozami organicznymi oraz nieorganicznymi	TCs: 2,0 – 397,6 µg/kg SAs :0,1 – 26,5 µg/kg FQs: 1,7 – 61,1 µg/kg MQs: 0,3 – 1,3 µg/kg	LC-MS/MS	Prowincje Jiangsu, Shanghai oraz Yunnan (Chiny, Azja)	[48]
2		Gleby nawożone kompostem organicznym	TCs : 1,0 – 13,4 µg/kg SAs : 0,3 – 17,8 µg/kg FQs: 3,8 – 22,4 µg/kg MQs: 0,4 – 1,1 µg/kg			
3	SAs (SSM, SFR, SH, SCT, SDX, SAC, SBZ, SFD, SDM, SFM, SMX, SFP, SFT, SN, SFX, SMP)	Gleba	0,11 – 8,53 ng/g	LC-MS/MS	Katalonia (Hiszpania, Europa)	[49]
5	SAs (SMX, SFD, SDM) FQs (ENF) SAMs (MET, TRI)	Gleba	SAs: 3,6 – 16,7 µg/kg FQs: 6,7 – 57,0 µg/kg SAMs: 3,9 – 47,8 µg/kg	LC-MS/MS	Północne Rejony Polski, (Polska, Europa)	[50]
6	SAs (SMX, SFD, SM, SFM) SAMs (TRI) TCs (TC, OTC, DOX, TCCI) FQs (CIP, ENF, NFC, OFC)	Osady rzeczne (lato/zima)	SAs: 0,2 – 2,7 ng/g / 0,1 – 2,3 ng/g SAMs: 1,9 ng/g / 3,8 ng/g TCs: 0,9 – 3,5 ng/g / 1,2 – 2,8 ng/g FQs: 0,9 – 2,0 ng/g / 1,1 – 1,9 ng/g	LC-MS/MS	Rzeka Hanjiang (Chiny, Azja)	[51]
8	TCs (TC, OTC, DOX, TCCI) SAs (SMX, SFH, SFM, SFX, SCP) FQs (ENF, CIP, NFC, OFC, FLU, DIF, LOM, SARA, DANO, OXA) MQs (CLR, TYL, ERY, SPI, RTM)	Gleba uprawna (lato/zima)	TCs: 4,40 – 41,43 ng/g / 4,02 – 105,72 ng/g SAs: 0,01 – 0,07 ng/g / 0,02 – 0,28 ng/g FQs: 1,11 – 8,97 ng/g / 1,86 – 19,35 ng/g MQs: 0,11 – 0,35 ng/g / 0,60 – 0,95 ng/g	LC-MS/MS	Delta rzeki Jangcy, (Chiny, Azja)	[52]
9		Gleba leśna (lato/zima)	TCs: 0,12 – 0,31 ng/g / 0,17 – 2,93 ng/g SAs: < 0,02 ng/g / < 0,06 ng/g FQs: 0,18 – 0,62 ng/g / 0,08 – 0,64 ng/g MQs: 0,13 – 0,16 ng/g / 0,20 – 0,38 ng/g			
10		Gleba z sadu owocowego (lato/zima)	TCs: 0,57 – 2,49 ng/g / 0,13 – 19,35 ng/g SAs: 0,01 – 0,03 ng/g / < 0,08 ng/g FQs: 0,23 – 1,09 ng/g / 0,53 – 2,85 ng/g MQs: 0,08 – 0,21 ng/g / 0,20 – 0,37 ng/g			
11	TCs (TC); SAs (SFM); FQs (NFC, ERY)	Gleby (głębokość: 0 – 10 cm / 10 – 20 cm)	TCs: 8,9 – 21,9 µg/kg / 5,0 – 19,7 µg/kg SAs: 1,4 – 4,2 µg/kg / 1,3 – 4,0 µg/kg FQs: 1,1 – 66,7 µg/kg / 2,2 – 60,8 µg/kg	LC-MS/MS	Delta rzeki Perłowej, (Chiny, Azja)	[53]

CIP – ciprofloksacyna, CLR – klarytromycyna, DANO – danofloksacyna, DIF – difloksacyna, DOX – doksycyklina, ENF – enrofloksacyna, ERY – erytromycyna, FLU – flumechina, FQs – fluorochinolony, LOM – lomefloksacyna, MET – metronidazol, MQs – makrolidy, NFC – norfloksacyna; OFC – ofloksacyna, OTC – oksytetracyklina, OXA – kwas oksolinowy, RTM – roksytromycyna, SAC – sulfacetamid, SAMs – syntetyczne środki bakteriobójcze, SARA – sarafloksacyna, SAs – sulfonamidy, SBZ – sulfabenzamid, SCP – sulfachloropirydazyna, SCT – sukcyńnosulfatiazol; SCX – sulfachinoksalina, SCZ – sulfaklozyna, SDM – sulfadimetoksyna, SDX – sulfadoksyna; SFD – sulfadiazyna, SFH – sulfametizol, SFM – Sulfametazyna, SFP – sulfapirydyna, SFR – sulfamerazyna, SFT – sulfatiazol, SFX – sulfisoksazol, SFX – sulfisoksazol, SH – sulfachinoksalina, SM – sulfameter, SMM – sulfamonometoksyna, SMP – sulfametoksyperydazyna, SMX – sulfametoksazol, SN – sulfanitran; SPI – spiramycyna, SSM – sulfisomidin, TC – tetracyklina, TCCI – chlorotetracyklina, TCs – tetracykliny, TRI – trimetoprim, TYL – tylozyna.

Tabela 3. Zawartość AMs w próbkach wód i ścieków zebranych w różnych krajach świata

Lp.	AMs	Rodzaj próbki	Stężenie	Metoda analityczna	Miejsce poboru	Lit.
1	SAs (SMX, SFD, SM, SFM); SAMs (TRI); TCs (TC, OTC, DOX, TCCI); FQs (CIP, ENF, NFC, OFC)	Wody powierzchniowe lato/zima (rzeki, jeziora)	SAs: 3,3 – 6,5 ng/l / 1,2 – 3,8 ng/l SAMs: 2,8 ng/l / 1,2 ng/l TCs: 1,5 – 3,4 ng/l / 1,3 – 2,7 ng/l FQs: 0,5 – 2,9 ng/l / 0,6 – 2,0 ng/l	LC-MS/MS	Rzeka Hanjiang (Chiny, Azja)	[51]
2	SAs (SMX); FQs (CIP, NFC, OFC, MXF); MQs (CLR, AZI); SAMs (TRI); β-Ls (CFM, CTX, CEL, CFX, AMOX, AMP);	Wody powierzchniowe (jeziora)	SAs: 4,54 – 806,5 ng/l FQs: 0,19 – 158,7 ng/l MQs: 0,56 – 243 ng/l SAMs: 0,65 – 67,90 ng/l β-Ls: 0,23 – 1572 ng/l	LC-MS/MS	Hanoi (Wietnam, Azja)	[54]
3	SAs (SMX, SFD); FQs (CIP, OFC); MQs (ERY, RTM)	Wody powierzchniowe (jeziora)	SAs: 2,48 – 657,02 ng/l FQs: 4,05 – 106,4 ng/l MQs: 0,80 – 1139,40 ng/l	LC-MS/MS	Dorzecze rzeki Jangcy (Chiny, Azja)	[55]
4	SAs (SSM, SN, SFG, SFR, SCX, SAC, SDX, SFD, SFP, SCT, SBZ, SFX, SFT, SMX, SFH, SFM, SDM, SMP, Ac-SFM)	UWW	SAs: 2,15 – 855 ng/l / SAs: 1,88 – 302 ng/l	LC-MS/MS	Barcelona (Hiszpania, Europa)	[56]
5		Woda gruntowa	SAs: 0,05 – 53,90 ng/l			
6		Woda powierzchniowa (rzeki)	SAs: 0,16 – 32,20 ng/l			
7	β-Ls (AMOX, PEN, CFX, CFM); FQs (CIP); MQs (AZI, ERY)	UWW / TWW	β-Ls: 0,0363 – 0,9777 µg/l / 0,0097 – 0,4221 µg/l FQs: 0,7062 – 0,7962 µg/l / 0,2487 – 0,2950 µg/l MQs: 0,0433 – 0,1595 µg/l / 0,0144 – 0,2333 µg/l	LC-MS/MS	Teheran (Iran, Azja)	[57]
9	FQs (NFC, LOM, OFC, CIP) MQs (RTM, ERY) TCs (TC, OTC)	UWW (lato/zima)	FQs: 58 – 2030 ng/l / 20 – 265 ng/l MQs: <122 ng/l / 109 – 181 ng/l TCs: 6,7 – 34 ng/l / 101 – 132 ng/l	LC-MS	Chiny (Azja)	[58]
10		TWW (lato/zima)	FQs: 11 – 2730 ng/l / 4 – 224 ng/l MQs: 18 – 75 ng/l / 26 – 166 ng/l TCs: 1,8 – 12,0 ng/l / 24 – 127 ng/l			
11	MQs (CLR, CLD, ERY) SAMs (TRI, MET) LAs (LIN) FQs (OFC) SAs (SMX)	Wody powierzchniowe (jeziora)	MQs: 1,7 – 31,1 ng/l SAMs: 0,8 – 5,1 ng/l LAs: 6,0 – 19,5 ng/l FQs: <4,8 ng/l SAs: 0,8 ng/l	LC-MS/MS	Chiny (Azja)	[59]
12		Wody powierzchniowe (rzeki)	LAs: 10,5 – 31,1 ng/l SAMs: 1,1 – 9,8 ng/l FQs: 1,9 – 2,3 ng/l SAs: 0,8 – 1,8 ng/l			
13	SAs (SMX, SFD, SFM, SDX) SAMs (TRI, MET) FQs (CIP, LVF)	Wody powierzchniowe (zbiorniki wodne)	SAs: 0,0009 – 38,9 ng/l SAMs: 0,024 – 6,95 ng/l FQs: 0,012 – 0,51 ng/l	LC-MS	(różne regiony Afryki)	[60]
14		UWW / TWW	SAs: 0,71 – 59,3 ng/l / 0,05 – 4,09 ng/l SAMs: 0,13 – 72,9 ng/l / 0,004 – 0,16 ng/l FQs: 0,16 – 0,27 ng/l / <0,07 ng/l			

AC-SFM - 4-N-acetylosulfametazyna, AMOX - amoksylicyna, AMP - ampicylina, AZI - azytromycyna, CEL - cefaclor, CFM - cefiksym, CFX - cefaleksyna, CIP - ciprofloksacyna, CLD - klindamycyna, CLR - klarytromycyna, CTX - cefotaksym, DOX - doksycyklina, ENF - enrofloksacyna, ERY - erytromycyna, FQs - fluorchinolony, LAs - linkozamidy, LC-MS/MS - chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas, LIN - linkomycyna, LOM - lomefloksacyna, LVF - lewofloksacyna, MET - metronidazol, MQs - makrolidy, MXF - moksyfloksacyna, NFC - norfloksacyna, OFC - ofloksacyna, ORB - orbifloksacyna, OTC - oksytetracyklina, PEN - penicyliny, PIP - kwas pipemidowy, QNs - chinolony, RTM - roksytromycyna, SAC - sulfacetamid, SAMs - syntetyczne środki bakteriobójcze, SAs - sulfonamidy, SBZ - sulfabenzamid, SCT - sukcyńnosulfatazol, SCX - sulfachinoksalina, SDM - sulfadimetoksyna, SDX - sulfadoksyna, SFD - sulfadiazyna, SFG - sulfaguaniodyna, SFH - sulfametizol, SFM - sulfametazyna, SFP - sulfapirydyna, SFR - sulfamerazyna, SFT - sulfatazol, SFX - sulfizoksazol, SM - sulfameter, SMP - sulfametoksypyridazyna, SMX - sulfametoksazol, SN - sulfanitrant, SSM - sulfiomidin, TC - tetracyklina, TCCI - chlorotetracyklina, TCs - tetracykliny, TRI - trimetoprim, TWW - ściek oczyszczony, TYL - tylozyna, UWW - ściek nieoczyszczony, β-Ls - beta-laktamy.

Tabela 4. Zestawienie zawartości wybranych AMs pobranych przez rośliny na drodze transportu korzeniowego z podłoża

Lp.	AMs	Gatunek rośliny	Stężenie AMs w roślinie (tkanka)	Początkowe stężenie AMs w glebie/wodzie	Typ badań	Metoda analityczna	Lit.
1	ENF CIP	Ogórek (roślina)	ENF: 9 µg/g, C <sub>0</sub> : 50 µg/g, po 28 dniach ENF: 22 µg/g, C <sub>0</sub> : 200 µg/g, po 28 dniach ENF: 36 µg/g, C <sub>0</sub> : 500 µg/g, po 28 dniach CIP: 40 µg/g, C <sub>0</sub> : 500 µg/g, po 42 dniach	10 µg/g 50 µg/g 200 µg/g 500 µg/g	Warunki laboratoryjne	UV-VIS	[61]
2	TRI SMX	Salata lodowa (liście) Szpinak (liście)	TRI: 1,1 ng/g <sub>DW</sub> ; SMX: n.d. TRI: 1,1 ng/g <sub>DW</sub> ; SMX: n.d.	500 ng/l	Hodowla hydroponiczna, warunki laboratoryjne	LC-MS/MS	[62]
4	ENF CIP	Salata (roślina)	ENF: 7 µg/g, C <sub>0</sub> : 50 µg/g, po 28 dniach ENF: 27 µg/g, C <sub>0</sub> : 200 µg/g, po 28 dniach ENF: 76 µg/g, C <sub>0</sub> : 500 µg/g, po 28 dniach CIP: 44 µg/g, C <sub>0</sub> : 10 µg/g, po 42 dniach CIP: 58 µg/g, C <sub>0</sub> : 50 µg/g, po 42 dniach CIP: 163 µg/g, C <sub>0</sub> : 200 µg/g, po 42 dniach CIP: 223 µg/g, C <sub>0</sub> : 500 µg/g, po 42 dniach	10 µg/g 50 µg/g 200 µg/g 500 µg/g	Warunki laboratoryjne	UV-VIS	[61]
5	TC	Salata (roślina)	TC: 5 – 8 ng/g <sub>DW</sub> , (C <sub>0</sub> = 0,1 mg/l) TC: 8 – 10 ng/g <sub>DW</sub> , (C <sub>0</sub> = 1,0 mg/l) TC: 12 – 21 ng/g <sub>DW</sub> , (C <sub>0</sub> = 10,0 mg/l) TC: 21 – 26 ng/g <sub>DW</sub> , (C <sub>0</sub> = 15,0 mg/l)	0,1 – 15 mg/l wody którą podlewano rośliny	Warunki szklarniowe (kontrolowana wilgotność, temperatura, naświetlenie)	LC-MS	[63]
6	TC	Marchew (korzeń)	TC: 12 – 15 ng/g <sub>DW</sub> , (C <sub>0</sub> = 0,1 mg/l) TC: 22 – 24 ng/g <sub>DW</sub> , (C <sub>0</sub> = 1,0 mg/l) TC: 26 – 28 ng/g <sub>DW</sub> , (C <sub>0</sub> = 10,0 mg/l) TC: 32 – 36 ng/g <sub>DW</sub> , (C <sub>0</sub> = 15,0 mg/l)	0,1 – 15 mg/l wody którą podlewano rośliny	Warunki szklarniowe (kontrolowana wilgotność, temperatura, naświetlenie)	LC-MS	[63]
7	CIP ENF SMX SFM	Salata (liście)	CIP: <4 ng/g <sub>FW</sub> , po 21 dniach CIP: <4 ng/g <sub>FW</sub> , po 36 dniach CIP: <4 ng/g <sub>FW</sub> , po 55 dniach SFM: 21 ng/g <sub>FW</sub> , po 21 dniach SFM: 8 ng/g <sub>FW</sub> , po 36 dniach SFM: <6 ng/g <sub>FW</sub> , po 55 dniach ENF: 8 ng/g <sub>FW</sub> , po 21 dniach ENF: <4 ng/g <sub>FW</sub> , po 36 dniach ENF: <2 ng/g <sub>FW</sub> , po 36 dniach SMX: 44 ng/g <sub>FW</sub> , po 21 dniach SMX: 10 ng/g <sub>FW</sub> , po 36 dniach SMX: 9 ng/g <sub>FW</sub> , po 36 dniach	2,5 mg/kg gleby Nawożonej obornikiem	Warunki środowiskowe	LC-MS/MS	[64]
8	ENF CIP	Jęczmień pospolity (roślina)	ENF: 8 µg/g, C <sub>0</sub> : 50 µg/g, po 28 dniach ENF: 14 µg/g, C <sub>0</sub> : 200 µg/g, po 28 dniach ENF: 20 µg/g, C <sub>0</sub> : 500 µg/g, po 28 dniach CIP: 13 µg/g, C <sub>0</sub> : 500 µg/g, po 42 dniach	10 µg/g 50 µg/g 200 µg/g 500 µg/g	Warunki laboratoryjne	UV-VIS	[61]

b.d. – brak danych, C<sub>0</sub> – stężenie początkowe w glebie/wodzie, CIP – ciprofloksacyna, DW – sucha masa, ENF – enrofloksacyna, FW – mokra masa, MET – metronidazol, ND – nie wykryto, SFM – sulfametazyna, SMX – sulfametoksazol, TC – tetracyklina, TRI – trimetoprim.

poprzez oddziaływania hydrofobowe [12,65]. Grupy podstawnikowe TCs oraz FQs mają niewielki wpływ na oddziaływania sorpcyjne związków, ponieważ mechanizm ich sorpcji polega na wymianie kationowej, kompleksowaniu oraz mostkowaniu kationowym [65]. Sorpcja FQs jest kontrolowana przez interakcje ich podstawowego szkieletu strukturalnego z glebą, przy czym jest ona wrażliwa na różnice specjacyjne przy wartościach  $\text{pH} > 8,5$ . Ponadto sorpcja silnie zależy od pojemności kationowymiennej gleby, natomiast słabiej od zawartości tlenków nieorganicznych oraz OC [65]. Podstawniki umiejscowione w pozycjach 5 oraz 7 pierścienia tetracyklinowego nie wpływają znacząco na różnice w wartościach  $K_D$  TC, OTC i TCCI. Sorpcja tych TCs zależy od pojemności kationowymiennej gleby oraz interakcji z tlenkami nieorganicznymi w zakresie  $\text{pH} 5,5 - 8,5$  [65]. Wartości  $K_D$  są wrażliwe na zmiany w strukturze SAs, a ich sorpcja zależy od zawartości OC w glebie [65].

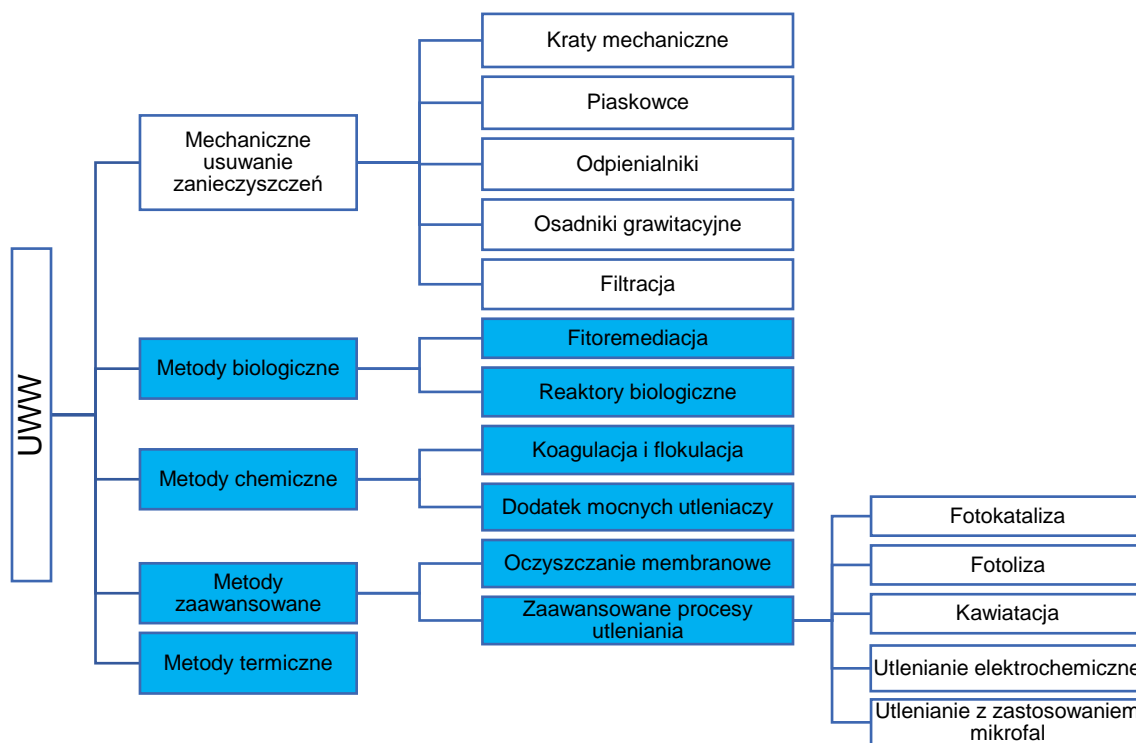
Na podstawie danych zebranych w tabeli 3 stwierdzono, że rodzaj oraz zawartość AMs ( $\text{ng/l} - \mu\text{g/l}$ ) w próbkach ciekłych zależy od umiejscowienia geograficznego punktu poboru próbki oraz jego charakterystyki (liczba ludności aglomeracji, dostępność do kanalizacji, popularność wybranego leku) [56,58]. Zawartość AMs w ciekłych próbkach środowiskowych (wodach gruntowych, powierzchniowych, ściekach nieoczyszczonych (UWW) oraz ściekach oczyszczonych (TWW)) podlega wahaniom sezonowym. Niska częstotliwość opadów i temperatury oraz zmniejszone nasłonecznienie mogą sprzyjać akumulacji AMs w wodach gruntowych i powierzchniowych, ponieważ zmniejsza się udział biodegradacji i fotodegradacji w ich usuwaniu [51]. Porównując stężenia AMs w UWW i TWW można zauważyć, że niezależnie od umiejscowienia WWTP oraz parametrów procesu oczyszczania, AMs nie zostają w pełni usunięte ze ścieków [58,60,66].

Obecność AMs w tkankach roślinnych wynika bezpośrednio z wchłaniania ich przez roślinę z zanieczyszczonej gleby drogą korzeniową. W tabeli 4 zestawiono stężenia AMs w tkankach różnych gatunków roślin, uprawianych w warunkach środowiskowych lub laboratoryjnych. Należy zauważyć, że przeważająca większość zestawionych w tabeli 4 badań została przeprowadzona w warunkach laboratoryjnych (kontrolowana temperatura, wilgotność) oraz kontrolowanego narażenia na określone stężenie AMs. W warunkach środowiskowych pobieranie AMs zależy od ich biodostępności, która będzie się zmieniać w zależności od temperatury, wilgotności,  $\text{pH}$  oraz składu gleby [67]. Ze względu na duże rozproszenie AMs w glebie są one trudne do usunięcia, a rośliny uprawiane na zanieczyszczonej glebie, mogą gromadzić je w tkankach nawet jeśli ich stężenia są niskie ( $\text{ng/g} - \mu\text{g/g}$ ).

### **1.3. Konwencjonalne oraz alternatywne metody oczyszczania ścieków oraz wody ze środków bakteriobójczych**

Oczyszczanie ścieków to złożony proces, w którym zwykle stosuje się kombinację kilku technologii, wykorzystujących procesy mechaniczne, fizyczne, biologiczne oraz chemiczne (Rysunek 1). Każda z technologii ma swoje mocne strony i ograniczenia, a ich wybór zależy głównie od składu doprowadzanego ścieku [68]. Ostatecznie wybrana technologia optymalna dla jednego rodzaju zanieczyszczeń, może nie być odpowiednia dla innego [68]. W ramach rozprawy doktorskiej zbadano skuteczność usuwania wybranych AMs trzema metodami –

z użyciem reaktorów biologicznych wypełnionych osadem aktywnym, z zastosowaniem fotokatalizy heterogenicznej oraz w procesie fitoremediacji – których mechanizm działania omówiono w dalszej części pracy.



Rysunek 1. Podział metod oczyszczania ścieków (kolorem zaznaczono etapy, w których możliwe jest częściowe lub całkowite usunięcie AMs).

W polskich WWTPs najczęściej wykorzystuje się mikroorganizmy w formie zawiesiny lub osadu czynnego (AS, *ang. activated sludge*). Systemy biologicznego oczyszczania ścieków z mikrozanieczyszczeń AMs są jedynie w umiarkowanym stopniu skuteczne, a wpływają na to następujące czynniki: rodzaj zanieczyszczenia, skład populacji mikroorganizmów oraz parametry procesu (temperatura, czas retencji osadu, typ bioreaktora) [69]. Niska temperatura procesu spowalnia procesy metaboliczne mikroorganizmów oraz zmniejsza tempo ich wzrostu, co jest przyczyną zmniejszenia skuteczności usuwania AMs [70,71]. AMs obecne w UWW znacząco wpływają na skład zbiorowisk bakterii osadu czynnego, promując wzrost gatunków o wyższej tolerancji na zanieczyszczenie i ograniczając wzrost bardziej wrażliwych organizmów [70]. W procesach oczyszczania ścieków z użyciem osadu czynnego głównymi mechanizmami odpowiadającymi za usuwanie AMs są adsorpcja i biodegradacja. Oba mechanizmy zależą od właściwości fizykochemicznych AMs, takich jak logP, rozpuszczalność, pK<sub>a</sub> oraz forma jonowa związku [69]. Jeśli dany związek ma w swojej strukturze wiele grup funkcyjnych mogących ulegać dysocjacji, to skuteczność ich usuwania będzie zależała również od pH ścieków. Adsorpcja AMs przez osad aktywny zależy od jego właściwości chemicznych, rodzaju AMs oraz parametrów procesu (temperatura, obecność jonów metali, pH) [69]. Biodegradacja AMs może przebiegać całkowicie – poprzez ich pełną mineralizację do CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O lub niecałkowicie, z utworzeniem TP<sub>s</sub> na drodze reakcji metabolicznych mikroorganizmów [69].

Fitoremediacja to przyjazna dla środowiska, ekonomiczna metoda oczyszczania wody wykorzystująca do tego celu rośliny [72]. Fitoekstrakcja zanieczyszczeń z gleby lub wody odbywa się na drodze transportu korzeniowego, a jej efektywność jest zależna od biodostępności zanieczyszczenia [17]. Po pobraniu przez roślinę zanieczyszczenia ulegają fitoakumulacji, czyli są osadzane w wakuolach, wbudowywane w ściany i błony komórkowe oraz niereaktywne metabolicznie części tkanek roślinnych [73]. Zanieczyszczenia mogą być również unieruchomione poprzez adsorpcję na powierzchni korzenia lub wytrącanie się w strefie korzeniowej (fitostabilizacja), uwalniane do atmosfery w procesie transpiracji (fitowolatyżacja) lub przekształcane w reakcjach metabolicznych z utworzeniem TPs [72,74]. Metabolizm zanieczyszczeń organicznych w roślinie odbywa się zarówno na skutek reakcji biotransformacji I fazy (utlenianie, redukcja, hydroliza), jak i II fazy (reakcje koniugacji). Przypuszcza się, że metabolizacja zanieczyszczeń organicznych przez rośliny jest ich mechanizmem obronnym, wskutek którego zmniejsza się ich toksyczność [75,76]. Końcowo substancja macierzysta i jej metabolit mogą mieć różne właściwości fizykochemiczne, aktywność biologiczną oraz toksyczność [75]. Aby roślina mogła być zastosowana do fitoremediacji, musi wykazywać szereg specyficznych cech: szybkie tempo wzrostu, szeroki zakres tolerancji na zmienne warunki środowiskowe oraz wysokie stężenia zanieczyszczeń, odporność na stres biotyczny oraz abiotyczny, duża biomasa, a także łatwość w uprawie i zbiorze [73,77]. Do oceny skuteczności pochłaniania zanieczyszczeń przez rośliny najczęściej stosowane są parametry, takie jak [78,79]:

- efektywność (E) fitoremediacji – mierzona jako iloraz stężenia zanieczyszczenia w medium, w którym przebywała roślina (gleba, woda) w trakcie procesu fitoremediacji, do wyjściowego stężenia tego zanieczyszczenia.

$$E(\%) = \frac{C_i}{C_0} \cdot 100\%$$

$C_i$  – stężenie związku po „i” dniach fitoremediacji w wodzie/glebie [mg/l lub mg/kg];  $C_0$  – wyjściowe stężenie zanieczyszczenia [mg/l lub mg/kg].

- indeks translokacji ( $I_T$ ) – informujący o zdolności rośliny do fitoekstrakcji oraz różnic w biologicznej dostępności zanieczyszczeń dla roślin. Obliczany jako iloraz stężenia wybranego związku w tkankach organów nadziemnych (liść, łodyga) do stężenia tego związku w tkankach organów podziemnych (korzeń).

$$I_T = \frac{C_N}{C_P}$$

$C_N$  – stężenie związku w tkankach organów nadziemnych [mg/kg];  $C_P$  – stężenie związku w tkankach organów podziemnych [mg/kg].

- współczynnik bioakumulacji (BAF; ang. *bioaccumulator factor*) – wyrażony jako iloraz stężenia wybranego związku w roślinie (lub wybranych jej tkankach) do jego zawartości w medium, w którym hodowana jest roślina (gleba/woda).

$$BAF = \frac{C_R}{C_M}$$

$C_R$  – stężenie związku w roślinie (lub wybranych jej tkankach) [mg/kg];  $C_M$  – stężenie związku w glebie lub wodzie [mg/kg].

W tabeli 5 zestawiono gatunki roślin, których zdolność do fitoremediacji wybranych AMs z wody oraz ścieków została wyznaczona.

Tabela 5. Zestawienie roślin stosowanych do fitoremediacji pozostałości AMs z wody oraz ścieków

Nazwa zwyczajowa	Nazwa naukowa	AMS	C <sub>0</sub> [µg/l]	Czas [dni]	E [%]	I <sub>r</sub>	BAF	IGO	TPs	Lit.
Salwinia uciążliwa	<i>Salvinia molesta</i>	CIP	1 10	4	97 79	nd	n.d.	+	n.d.	[80]
Paciorecznik indyjski	<i>Canna indica</i>	SMX SFD SFR SFM	n.d.	7	40 – 80 70 – 90 70 – 98 65 – 95 70 – 95	n.d.	n.d.	-	n.d.	[81]
Kosaciec żółty	<i>Iris pseudacorus</i>	SMX SFD SFP SFR SFM	n.d.	7	12 – 21 30 – 50 40 – 75 22 – 61 59 – 35	n.d.	n.d.	-	SFD (3) SFR (6) SFM (6)	[81]
Pistia rozetkowa	<i>Pistia Stratiotes</i>	CIP	10	7	70	n.d.	n.d.	+	n.d.	[82]
Krwawnica pospolita	<i>Lythrum salicaria</i>	SAs (SMX, SFP, SFR, SFM, SFX, SMM, SM, SCP, SDM, SDX)	500	32	44 (ΣSAs)	SMX (1 – 9) SFP (6 – 10) SFR (10 – 18) SFM (8 – 18) SFX (n.d.) SMM (n.d.) SM (4 – 8) SCP (9 – 17) SDM (n.d.) SDX (n.d.)	SMX (0,02 – 0,20) SFP (0,07 – 0,15) SFR (0,02 – 0,09) SFM (0,03 – 0,07) SFX (n.d.) SMM (n.d.) SM (0,10 – 0,18) SCP (0,02 – 0,04) SDM (n.d.) SDX (n.d.) (korzeń)	-	n.d.	[83]
Petunia meksykańska	<i>Ruellia simplex</i>				46 (ΣSAs)			-	n.d.	
Tatarak zwyczajny	<i>Acorus calamus</i>				49 (ΣSAs)			-	n.d.	
Cibora papyrusowa	<i>Cyperus papyrus</i>				56 (ΣSAs)			-	n.d.	
<i>Thalia dealbata</i>	<i>Thalia dealbata</i>				50 (ΣSAs)			-	n.d.	
Kapusta sitowata	<i>Brassica juncea</i>	TC	5000 – 225 000	24	71	-	-		n.d.	[84]
Fasola złota	<i>Vigna radiata</i>	TC	150 000 200 000 300 000 400 000 500 000	28	48 60 29 59 36	0,60 0,95 0,24 0,67 0,57	7,2 7,0 3,6 6,0 4,0	-	n.d.	[85]
Fasola złota	<i>Vigna radiata</i>	AMOX	150 000 200 000 300 000 400 000 500 000	28	92 40 41 28 52	1,40 0,22 0,82 0,56 1,13	8,7 5,1 0,4 3,2 5,7	-	n.d.	[85]

„-” – nieobecne, „+” – obecne, AMOX – amoksycylina, AMS – środki bakteriobójcze, BAF – współczynnik bioakumulacji, C<sub>0</sub> – wyjściowe stężenie, CIP – ciprofloksacyna, E – efektywność fitoremediacji, IGO – inwazyjny gatunek obcy według wytycznych UE, IT – indeks translokacji, n.d. – brak danych, SCP – sulfachloropirydazyna, SDM – sulfadimetoksyna, SDX – sulfadioksyn, SFD – sulfadiazyna, SFM – sulfametazyna, SFP – sulfapirydyna, SFR – sulfamerazyna, SFX – sulfisoksazol, SM – sulfameter, SMM – sulfamonometazyna, SMX – sulfametoksazol, TC – tetracyklina; TPs – produkty transformacji, UWW – ścieki nieoczyszczone.

Fotoliza oraz fotokataliza, należące do grupy zaawansowanych procesów utleniania (AOPs; ang. *advanced oxidation processes*) charakteryzują się wysoką efektywnością usuwania różnego typu zanieczyszczeń organicznych, ze względu na brak selektywności rodników hydroksylowych wytwarzanych w trakcie procesu oczyszczania [86]. Wzbudzają one duże zainteresowanie ze względu na niski koszt, wysoką wydajność oraz brak toksyczności. Fotoliza to proces, w którym wiązania chemiczne obecne w związku organicznym lub nieorganicznym zostają zerwane w wyniku absorpcji promieniowania (fotoliza bezpośrednia)



Tabela 6. Porównanie skuteczności usuwania AMs metodą fotokatalizy heterogenicznej

AMs (stężenie)	Katalizator (stężenie)	Parametry procesu	Skuteczność usuwania AMs [%]	TPs	Toksyczność	Lit.
AMOX (104 mg/l)	ZnO (0,5 g/l)	Lampa UV 6 W; $\lambda=365$ nm; Temperatura: 22°C; pH=8; Czas: 300 min	100	n.d.	n.d.	[87]
AMOX (1,0 – 2,0 $\mu$ M)	WO <sub>3</sub> (0,1 – 0,5 g/l)	Lampa ksenonowa 300 W; Temperatura: 25°C; pH: 4 – 8; Czas: 180 min	50 (C <sub>AMOX</sub> =1,0 $\mu$ M, pH=4, WO <sub>3</sub> =0,3 g/l) 15 (C <sub>AMOX</sub> =1,5 $\mu$ M, pH=6, WO <sub>3</sub> =0,3 g/l) 28 (C <sub>AMOX</sub> =2,0 $\mu$ M, pH=4, WO <sub>3</sub> =0,3 g/l) 90 (C <sub>AMOX</sub> =1,0 $\mu$ M, pH=6, WO <sub>3</sub> =0,1 g/l) 70 (C <sub>AMOX</sub> =2,0 $\mu$ M, pH=6, WO <sub>3</sub> =0,1 g/l) 100 (C <sub>AMOX</sub> =1,0 $\mu$ M, pH=4, WO <sub>3</sub> =0,3 g/l) 90 (C <sub>AMOX</sub> =2,0 $\mu$ M, pH=4, WO <sub>3</sub> =0,3 g/l) 99 (C <sub>AMOX</sub> =1,0 $\mu$ M, pH=6, WO <sub>3</sub> =0,5 g/l) 90 (C <sub>AMOX</sub> =2,0 $\mu$ M, pH=6, WO <sub>3</sub> =0,5 g/l) 90 (C <sub>AMOX</sub> =1,0 $\mu$ M, pH=6, WO <sub>3</sub> =0,1 g/l) 99 (C <sub>AMOX</sub> =1,0 $\mu$ M, pH=6, WO <sub>3</sub> =0,5 g/l) 70 (C <sub>AMOX</sub> =1,5 $\mu$ M, pH=8, WO <sub>3</sub> =0,1 g/l) 90 (C <sub>AMOX</sub> =1,5 $\mu$ M, pH=8, WO <sub>3</sub> =0,5 g/l) 70 (C <sub>AMOX</sub> =2,0 $\mu$ M, pH=6, WO <sub>3</sub> =0,1 g/l) 90 (C <sub>AMOX</sub> =2,0 $\mu$ M, pH=6, WO <sub>3</sub> =0,5 g/l)	n.d.	n.d.	[88]
AMOX (104 mg/l)	TiO <sub>2</sub> -anataz (0,5 – 2,0 g/l)	Lampa UV 6 W; $\lambda=365$ nm; Temperatura: 22°C; pH: 3 – 11; Czas: 300 min	40 (TiO <sub>2</sub> =0,5 g/l, pH=5) 55 (TiO <sub>2</sub> =1,0 g/l, pH=5) 55 (TiO <sub>2</sub> =1,5 g/l, pH=5) 55 (TiO <sub>2</sub> =2,0 g/l, pH=5) 55 (TiO <sub>2</sub> =1,0 g/l, pH=3) 60 (TiO <sub>2</sub> =1,0 g/l, pH=8) 70 (TiO <sub>2</sub> =1,0 g/l, pH=11)	n.d.	n.d.	[89]
AMOX (5 – 50 mg/l)	TiO <sub>2</sub> -P25 (1,5 g/l)	Lampa UV-C 100 W; Temperatura: 20°C; Irradiancja: 6,5 mW/cm <sup>2</sup> ; pH=7; Czas: 120 min	72	8	n.d.	[90]
AMP (105 ng/l)	ZnO (0,5 g/l)	Lampa UV 6 W; $\lambda=365$ nm; Temperatura: 22°C; pH=11; Czas: 300 min	100	n.d.	n.d.	[87]
AMP (105 mg/l)	TiO <sub>2</sub> -anataz (0,5 – 2,0 g/l)	Lampa UV 6 W $\lambda=365$ nm Temperatura: 22°C pH: 3 – 11 Czas: 300 min	30 (TiO <sub>2</sub> =0,5 g/l, pH=5) 50 (TiO <sub>2</sub> =1,0 g/l, pH=5) 50 (TiO <sub>2</sub> =1,5 g/l, pH=5) 50 (TiO <sub>2</sub> =2,0 g/l, pH=5) 78 (TiO <sub>2</sub> =1,0 g/l, pH=3) 75 (TiO <sub>2</sub> =1,0 g/l, pH=8) 90 (TiO <sub>2</sub> =1,0 g/l, pH=11)	n.d.	n.d.	[89]
AMP (10 mg/l)	WO <sub>3</sub> (1 g/l)	Lampa ksenonowa 150 W; Irradiancja: 50 W/m <sup>2</sup> ; pH=7; Czas: 240 min	80	n.d.	n.d.	[91]
	WO <sub>3</sub> :ZrO <sub>2</sub> 2:1 w/w (1 g/l)		90	n.d.	n.d.	
	WO <sub>3</sub> :ZrO <sub>2</sub> 1:1 w/w (1 g/l)		99	n.d.	n.d.	
	WO <sub>3</sub> :ZrO <sub>2</sub> 2:3 w/w (1 g/l)		85	n.d.	n.d.	
	ZrO <sub>2</sub> (1 g/l)		2	n.d.	n.d.	
Ru/WO <sub>3</sub> /ZrO <sub>2</sub> (1 g/l)	100	n.d.	n.d.			
CIP (4 mg/l)	ZnO <sub>nanocząsteczki</sub> (20 mg/l)	Lampa ksenonowa UV; $\lambda=365$ nm; pH: 4 – 10; Czas: 60 min	20 (pH=4) 60 (pH=7) 55 (pH=10)	n.d.	n.d.	[92]

AMs (stężenie)	Katalizator (stężenie)	Parametry procesu	Skuteczność usuwania AMs [%]	TPs	Toksyczność	Lit.
CIP (10 mg/l)	ZnO <sub>nanocząsteczki</sub> (0,05 – 0,2 g/l <sup>1</sup> )	Niskociśnieniowa lampa rtęciowa UV 9 W; λ=254 nm; pH: 3 – 8; Czas: 140 min	30 (pH=3, 0,1 g/l) 60 (pH=4, 0,1 g/l) 95 (pH=5, 0,1 g/l) 80 (pH=6, 0,1 g/l) 55 (pH=7, 0,1 g/l) 50 (pH=8, 0,1 g/l) 70 (pH=5, 0,05 g/l) 99 (pH=5, 0,15 g/l) 85 (pH=5, 0,20 g/l)	n.d.	n.d.	[93]
CIP (5-20 mg/l)	ZnO <sub>nanocząsteczki</sub> (0,15 g/l)	Niskociśnieniowa lampa rtęciowa 9 W; pH=5; Czas: 140 min	90 (CIP=5 mg/l) 90 (CIP=10 mg/l) 85 (CIP=15 mg/l) 80 (CIP=20 mg/l)	n.d.	n.d.	[94]
CIP (10 mg/l)	BiFeO <sub>3</sub> (1 g/l)	Lampa ksenonowa 300 W; światło widzialne; λ>420 nm; Czas: 120 min	50	n.d.	n.d.	[95]
	5% BiFeO <sub>3</sub> /grafen (1 g/l)		70	n.d.	n.d.	
	10% BiFeO <sub>3</sub> /grafen (1 g/l)		88	n.d.	n.d.	
	15% BiFeO <sub>3</sub> /grafen (1 g/l)		96	n.d.	n.d.	
	20% BiFeO <sub>3</sub> /grafen (1 g/l)		98	n.d.	n.d.	
MET (50 mg/l)	TiO <sub>2</sub> -P25 (1,5 g/l)	Lampa UV-C 100 W; Temperatura: 20°C; Irradiancja: 6,5 mW/cm <sup>2</sup> ; pH=7; Czas: 120 min	77	7	n.d.	[90]
OTC (50 g/l)	TiO <sub>2</sub> (0,6 g/l)	Lampa halogenowa 300 W; Czas: 60 min Temperatura pokojowa	35	n.d.	n.d.	[96]
	TiO <sub>2</sub> /RGO (0,6 g/l)		80	n.d.	n.d.	
SMX (25 – 100 mg/l)	TiO <sub>2</sub> -anataz (500 mg/l)	Lampa UVC; pH: 3 – 4; Czas: 150 min	100 (25 mg/l, pH=4, 70 min) 100 (50 mg/l, pH=4, 90 min) 100 (75 mg/l, pH=4, 120 min) 100 (100 mg/l, pH=4, 150 min)	n.d.	n.d.	[97]
	WO <sub>3</sub> (750 mg/l)		85 (25 mg/l, pH=3, 150 min) 75 (50 mg/l, pH=3, 150 min) 70 (75 mg/l, pH=3, 150 min) 65 (100 mg/l, pH=3, 150 min)	n.d.	n.d.	
TC (20 mg/l)	CeVO <sub>4</sub> (500 mg/l)	Lampa ksenonowa 500 W; Czas: 30 – 60 min; Temperatura pokojowa	31 (60 min) 18 (30 min)	n.d.	n.d.	[98]
	BiVO <sub>4</sub> (500 mg/l)		34 (60 min) 25 (30 min)	n.d.	n.d.	
	BiVO <sub>4</sub> /3D RGO areożel/CeVO <sub>4</sub> (500 mg/l)		100 (60 min) 69 (30 min)	n.d.	n.d.	
TC (20 mg/l)	TiO <sub>2</sub> -P25 (0,5 – 1,5 g/l)	Lampa ksenonowa; Irradiancja: 250 W/m <sup>2</sup> ; pH: 3 – 11; Czas: 2 – 15 min	100 (TiO <sub>2</sub> =1,5 g/l, pH=8,7, 15 min)	n.d.	n.d.	[99]
	ZnO <sub>nanocząsteczki</sub> (0,2 – 1,5 g/l)		100 (ZnO=1,0 g/l, pH=11, 10 min)	n.d.	n.d.	

AMOX – amoksycylina, AMP – ampicylina, CIP – ciprofloksacyna, CQD – węglowe kropki kwantowe, GO – tlenek grafenu, MET – metronidazol, n.d. – brak danych, NFC – norfloksacyna, OFC – ofloksacyna, OTC – oksytetracyklina, RGO – zredukowany tlenek grafenu, SFH – sulfametizol, SFT – sulfatiazol, SFX – sulfizoksazol, SMX – sulfometoksazol, TC – tetracyklina.

lub pochłonięcia go przez cząsteczkę pełniącą rolę fotouczulacza ( $O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $HO_2^\cdot$ ), z którego zostaje przeniesiona do docelowego zanieczyszczenia (fotoliza pośrednia) [100]. W procesie fotokatalizy stosowane są katalizatory (homo- lub heterogeniczne), które absorbują promieniowanie świetlne i zmieniają szybkość reakcji fotodegradacji, nie ulegając przy tym zużyciu. W katalizie heterogenicznej najpowszechniej stosowane są tlenki metali o charakterze półprzewodników ( $TiO_2$ ,  $ZnO$ ,  $WO_3$ ) w formie proszku lub osadzone na nośniku [92,96,101,102]. Tlenki metali o charakterze półprzewodnika ( $TiO_2$ ,  $ZnO$ ,  $NiO$ ,  $WO_3$ ), mają unikalne cechy, takie jak struktura elektronowa, charakterystyka transportu ładunku, zdolność do pochłaniania światła z zakresu UV-VIS oraz spowolnienie rekombinacji ładunków [103]. Reaktywność fotokatalizatora heterogenicznego nie zależy wyłącznie od jego składu, ale również od morfologii (chropowatość powierzchni, rozmiar cząsteczek, dostępność miejsc aktywnych, defekty strukturalne) oraz pH środowiska reakcyjnego [104].

Związki organiczne mogą ulegać fotodegradacji według różnych mechanizmów, w zależności od ich struktury, a w szczególności ilości i rodzaju grup funkcyjnych [105]. Skuteczność usuwania zanieczyszczeń w procesie katalizy heterogenicznej zależy od parametrów procesu, takich jak: dawka katalizatora, pH, temperatura, ilość rozpuszczonego tlenu, początkowe stężenie zanieczyszczenia oraz parametry źródła światła [105]. Dobór parametrów katalizy heterogenicznej dla ścieków jest utrudniony, ze względu na ich zmienny skład i różną reaktywność akceptorów rodnikowych (kwasy huminowe i fluwonowe, białka, aminokwasy, węglowodany, jony nieorganiczne) [106]. Zmiana pH ścieku w procesie oczyszczania wiąże się z kosztami związanymi z jego regulacją, stałą kontrolą, a końcowo zobojętnieniem przed wprowadzeniem do środowiska. Ponadto zmiana pH ukierunkowana dla konkretnej grupy związków, może skutkować zmniejszeniem skuteczności usuwania innych zanieczyszczeń obecnych w roztworze. Z kolei stosowanie skrajnych warunków pH może wpłynąć na skrócenie żywotności fotokatalizatora i utraty jego aktywności. Utlenianie związków organicznych w procesie fotokatalizy heterogenicznej może również prowadzić do wytworzenia TPAs o aktywności biologicznej oraz toksyczności podobnej lub wyższej od związku macierzystego [107]. W tabeli 6 zestawiono skuteczność usuwania wybranych AMs z wody oraz ścieków z zastosowaniem fotokatalizy heterogenicznej wraz z parametrami charakterystycznymi procesu. Skuteczność usuwania AMs badano w szerokim zakresie stężeń (4 – 105 mg/l), a proces prowadzono przez 15 – 300 min, w temperaturze od 20 do 25°C. Warto zauważyć, że porównanie skuteczności usuwania AMs przez poszczególne katalizatory jest utrudnione ze względu na zróżnicowane warunki reakcji stosowane w procesie.

#### **1.4. Właściwości fizykochemiczne wybranych środków bakteriobójczych**

Do badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej wybrano 22 AMs z 7 grup leków (SAs, TCs, FQs, MQs,  $\beta$ -Ls, LAs oraz glikopeptydów), a ich wybrane parametry fizykochemiczne przedstawiono w tabeli 7. Dobór AMs wykonano na podstawie raportu WHO na temat nadzoru nad spożyciem antybiotyków w latach 2016 – 2018 [3], wyników badań

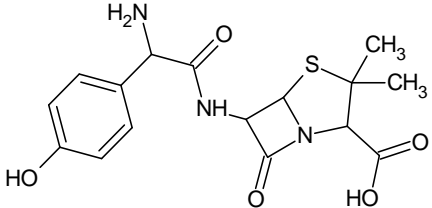
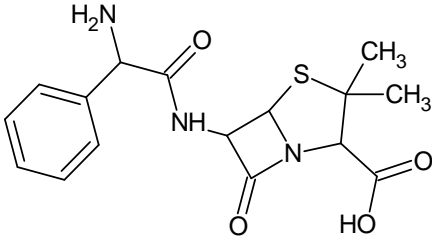
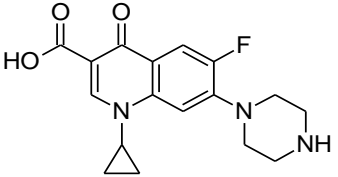
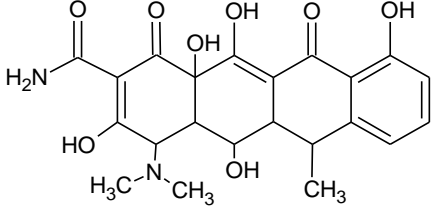
przesiewowych środowiska [50,108–110] oraz analizy spożycia leków [111,112] na terenie Polski. Na podstawie urzędowych wykazów produktów leczniczych oraz weterynaryjnych dopuszczonych do obrotu na terenie Rzeczypospolitej Polskiej określono, w jakim celu oraz wobec których organizmów docelowych są stosowane wybrane AMs.

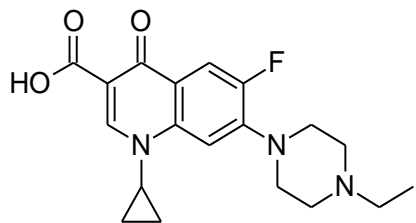
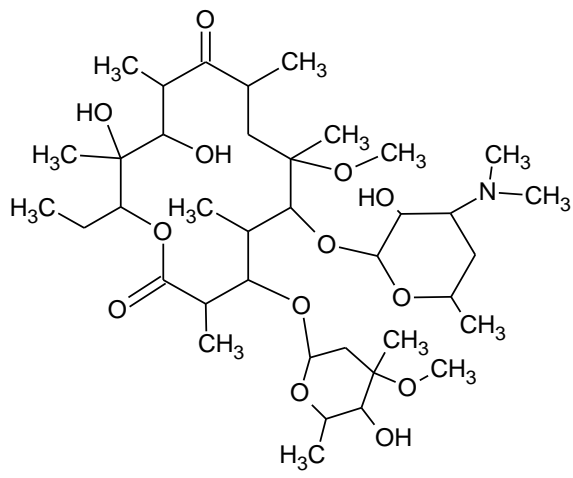
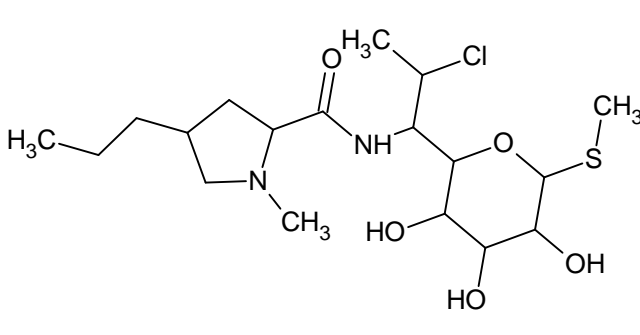
Użytecznymi parametrami w opracowaniu profilu środowiskowego i przewidywaniu losów AMs są współczynnik  $\log P$  oraz stała dysocjacji kwasowej ( $pK_a$ ). Właściwości biologiczne AMs, takie jak tendencja do bioakumulacji (w organizmie lub środowisku) mogą zostać oszacowane na podstawie jego wartości  $\log P$ . Zgodnie z jedną z pięciu reguł Lipińskiego, aby AMs był przeznaczony do podania doustnego, to jego  $\log P$  powinien być mniejszy niż 5. Związki silnie lipofilowe ( $\log P > 5$ ) przez niską rozpuszczalność w wodzie mają gorszą biodostępność, mogą być akumulowane w tkance tłuszczowej oraz mieć utrudnioną penetrację barier biologicznych [113]. Zastosowanie  $\log P$  w badaniach środowiskowych pozwala przewidzieć mobilność i biodostępność związku po wprowadzeniu do gleby. Zgodnie z trzecią zasadą Briggsa, aby związek chemiczny był biodostępny, jego wartość  $\log P$  powinna być poniżej 3. Zapewnia to zachowanie równowagi pomiędzy rozpuszczalnością związku w wodzie, a lipofilowością, tak aby mógł być stosowany do oprysku w roztworze wodnym i pobierany przez roślinę, przy jednoczesnym ograniczeniu jego wypłukiwania do wód gruntowych [114].

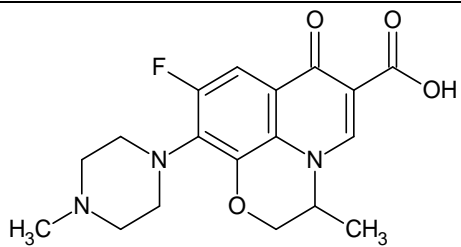
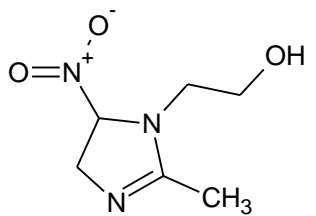
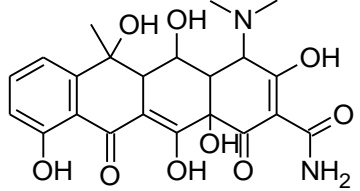
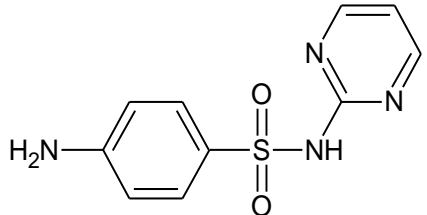
Migracja AMs jest zjawiskiem złożonym, zależnym zarówno od charakteru związku, jak i czynników środowiskowych (temperatura, wilgotność, skład gleby). Migracja związków o charakterze bardziej lipofilowym będzie ograniczona, przez ich tendencję do akumulacji w glebie. Związki o charakterze mniej lipofilowym, będą wymywane z gleby przez deszcz, w konsekwencji zanieczyszczając wody gruntowe i powierzchniowe. AMs zebrane w tabeli 7 mają zróżnicowane wartości  $\log P$  w zakresie od -3,7 (DOX) do 3,16 (CLR). Do AMs o charakterze hydrofilowym ( $\log P < 1$ ) należą: AMOX, DOX, ENF, LVF, MET, OTC, SFD, SFR, SFM, SFH, SFP, SFT, TC oraz VAN. Jedynie CLR ma charakter bardziej lipofilowy ( $\log P > 3$ ), natomiast AMs (AMP, CIP, CLD, SMX, SFX, TRI, TYL) mają charakter pośredni ( $1 < \log P < 3$ ). Większość z AMs przedstawionych w tabeli 7 ma więcej niż jedną grupę funkcyjną zdolną do przyjęcia lub oddania protonu, a do każdej z nich przypisano wartość  $pK_a$ . Forma jonowa AMs, a dokładniej liczba i rozkład ładunków w cząsteczce, wpływa na ich rozpuszczalność w wodzie, więc również na zdolność do migracji w środowisku. Po wprowadzeniu AMs do układu fizjologicznego (spożycie przez człowieka lub absorpcja przez roślinę) jego forma jonowa ma wpływ na szybkość z jaką dyfunduje on przez błony komórkowe. Wartość  $pK_a$  wpływa także na jego rozpuszczalność, wchłanianie, dystrybucję w organizmie oraz metabolizm [176]. Jednym z narzędzi, którym można posłużyć się w celu określenia mobilności AMs w roślinie dla fizjologicznego pH jest model Bromilowa. Uwzględnia on wielkość cząsteczek, ich lipofilowość ( $\log P$ ) oraz kwasowość ( $pK_a$ ), co pozwala przewidzieć, czy dany AMs jest mobilny i jaką drogą (floemowo-ksylemową czy ksylemową) będzie transportowany w roślinie [177].

Podsumowując, wartości  $\log P$ ,  $pK_a$  oraz masa związku są użyteczne w przewidywaniu losów AMs w środowisku, natomiast ostatecznie na ich mobilność wpływają również parametry środowiskowe (temperatura, wilgotność, rodzaj gleby, ilość opadów, obecność roślin) [115].

Tabela 7. Charakterystyka oraz właściwości fizykochemiczne wybranych środków bakteriobójczych

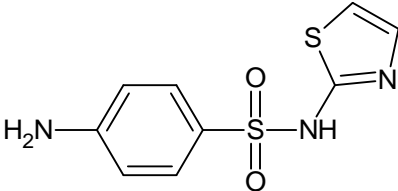
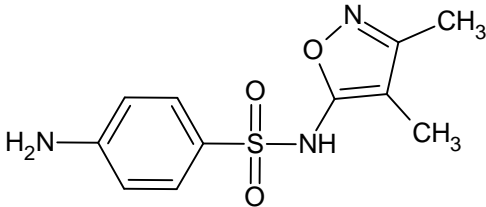
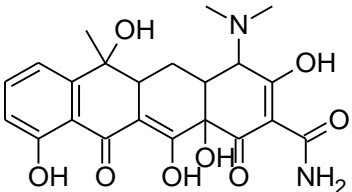
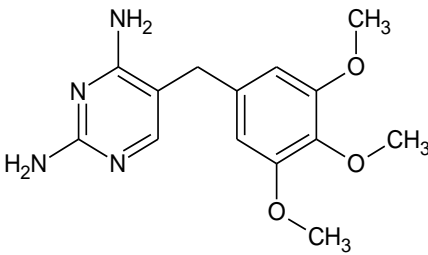
Nazwa AMs (skrót) [grupa leków]	Struktura	Wzór sumaryczny	Masa	logP	pK <sub>a</sub>	Zastosowanie (zwierzę)	Lit.
Amoksycylina (AMOX) [β-laktamy]		C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	365,40	0,90	2,6/7,2/9,6	Medycyna: (+) Weterynaria: (+) (kury, świnie, psy, koty, indyki, bydło)	[108, 116]
Ampicylina (AMP) [β-laktamy]		C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>4</sub> S	349,40	1,35	3,7/7,3	Medycyna: (+) Weterynaria: (+) (bydło, psy, świnie)	[117]
Ciprofloksacyna (CIP) [Fluorochinolony]		C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	331,35	0,30 – 1,30	5,9/8,9	Medycyna: (+) Weterynaria: (-)	[108]
Doksycyklina (DOX) [Tetracykliny]		C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	444,43	-3,70	3,0/7,9/9,2	Medycyna: (+) Weterynaria: (+) (cielęta, świnie, kury, indyki, bydło, gołębie, papugi)	[108, 118]

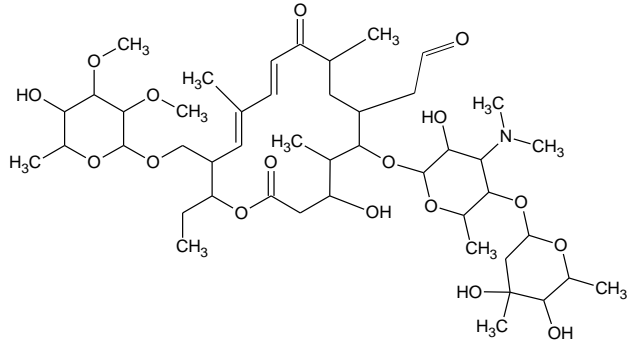
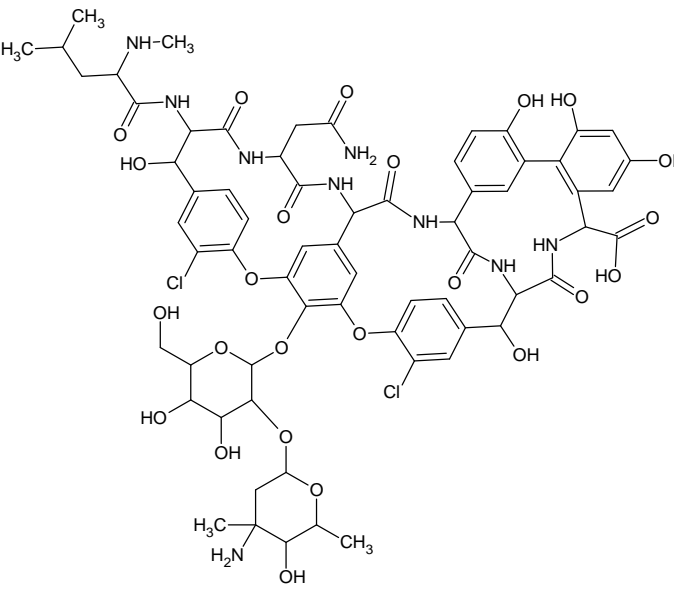
Nazwa AMs (skrót) [grupa leków]	Struktura	Wzór sumaryczny	Masa	logP	pK <sub>a</sub>	Zastosowanie (zwierzę)	Lit.
Enrofloksacyna (ENF) [Fluorochinolony]	 <p>The structure shows a quinolone core with a cyclopropyl group at position 8, a piperazine ring at position 7, and a carboxylic acid group at position 4. A fluorine atom is attached to the benzene ring at position 6.</p>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	359,40	0,70	6,0/8,8	<p>Medycyna: (-)</p> <p>Weterynaria: (+) (kury, indyki, króliki, było, świnię, gołębie, psy, koty, cielęta, zwierzęta egzotyczne)</p>	[119]
Klarytromycyna (CLR) [Makrolidy]	 <p>The structure shows a 14-membered macrolide ring with a methyl group at C1, a trimethylammonium group at C2, and a methyl group at C3. It is linked via an ether bridge to a 14-membered lactone ring, which has methyl groups at C1 and C3, and a methyl group at C5. The lactone ring is further substituted with a methyl group at C6 and a methyl group at C8.</p>	C <sub>38</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>13</sub>	747,95	3,16	8,3	<p>Medycyna: (+)</p> <p>Weterynaria: (-)</p>	[120]
Klindamycyna (CLD) [Linkozamidy]	 <p>The structure shows a 5-membered imidazole ring with a methyl group at N1 and a propyl group at C2. It is linked via an amide bond to a 6-membered ring containing a chlorine atom and a methyl group. This ring is further linked to a 6-membered pyranose ring with hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a methylsulfanyl group at C5.</p>	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	424,98	2,16	7,8	<p>Medycyna: (+)</p> <p>Weterynaria: (+) (psy, koty)</p>	[121]

Nazwa AMs (skrót) [grupa leków]	Struktura	Wzór sumaryczny	Masa	logP	pK <sub>a</sub>	Zastosowanie (zwierzę)	Lit.
Lewofloksacyna (LVF) [Fluorochinolony]		C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	361,37	0,28 – 0,35	6,2/8,3	Medycyna: (+) Weterynaria: (-)	[120, 122]
Metronidazol (MET) [Syntetyczne środki bakteriobójcze]		C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	171,16	-0,30 – 0,02	2,4	Medycyna: (+) Weterynaria: (+) (psy)	[108]
Oksytetracyklina (OTC) [Tetracykliny]		C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	460,43	-0,90	3,3/7,3/9,1	Medycyna: (+) Weterynaria: (+) (kury, świnię, ryby, bydło, indyki, cielęta, owce, konie, kozy)	[42, 119]
Sulfadiazyna (SFD) [Sulfonamidy]		C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	250,28	-0,09	6,4	Medycyna: (+) Weterynaria: (+) (psy, koty, konie, bydło, świnię, owce, lisy, norki, nutrie)	[119]

Nazwa AMs (skrót) [grupa leków]	Struktura	Wzór sumaryczny	Masa	logP	pK <sub>a</sub>	Zastosowanie (zwierzę)	Lit.
Sulfamerazyna (SFR) [Sulfonamidy]		C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	264,30	0,13	1,6/ 7,3	Medycyna: (-) Weterynaria: (+) (bydło, świnię, konie)	[19, 123]
Sulfametazyna (SFM) [Sulfonamidy]		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	278,33	0,28 – 1,01	1,6/ 7,8	Medycyna: (-) Weterynaria: (+) (psy, konie, świnię, owce, bydło)	[19, 124]
Sulfametizol (SFH) [Sulfonamidy]		C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	270,33	0,26 – 0,54	2,2/5,4	Medycyna: (+) Weterynaria: (-)	[124]
Sulfametoksazol (SMX) [Sulfonamidy]		C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	253,28	0,90 – 2,50	1,8/5,6	Medycyna: (+) Weterynaria: (+) (kury, świnię)	[108, 118]
Sulfapirydyna (SFP) [Sulfonamidy]		C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	249,29	-0,01	8,4	Medycyna: (-) (produkt transformacji sulfasalazyny) Weterynaria: (-)	[123]



Nazwa AMs (skrót) [grupa leków]	Struktura	Wzór sumaryczny	Masa	logP	pK <sub>a</sub>	Zastosowanie (zwierzę)	Lit.
Sulfatiazol (SFT) [Sulfonamidy]		C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	255,31	0,05 – 0,72	2,1/7,1	Medycyna: (+)  Weterynaria: (+) (psy, konie, świnię, owce, bydło)	[124]
Sulfizoksazol (SFX) [Sulfonamidy]		C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	267,30	1,08	4,9	Medycyna: (+)  Weterynaria: (-)	[123]
Tetracyklina (TC) [Tetracykliny]		C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	444,43	-1,30 – 0,05	3,3/7,7/9,3	Medycyna: (+)  Weterynaria: (+) (bydło, świnię, kury)	[42, 125]
Trimetoprim (TRI) [Syntetyczne środki bakteriobójcze]		C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	290,32	0,80 – 1,40	6,6/7,1	Medycyna: (+)  Weterynaria: (+) (kury, świnię, psy, koty, konie, bydło, króliki, indyki, owce, lisy, nutria, norki)	[108]

Nazwa AMs (skrót) [grupa leków]	Struktura	Wzór sumaryczny	Masa	logP	pK <sub>a</sub>	Zastosowanie (zwierzę)	Lit.
Tylozyna (TYL) [Makrolidy]		C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	1066,20	1,63	7,7	<p>Medycyna: (-)</p> <hr/> <p>Weterynaria: (+) (świnie, kury, kozy, bydło, owce, indyki, psy, koty)</p>	[118, 119]
Wankomycyna (VAN) [Glikopeptydy]		C <sub>66</sub> H <sub>75</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>9</sub> O <sub>24</sub>	1449,25	-3,10	3,6/8,2/9,0/ 9,2/10,3/ 10,8	<p>Medycyna: (+)</p> <hr/> <p>Weterynaria: (-)</p>	[117]

## **1.5. Metody analityczne wykorzystywane w oznaczaniu środków bakteriobójczych w próbkach środowiskowych**

Na przestrzeni ostatnich 10 lat metody chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) były powszechnie wykorzystywane do analizy AMs w próbkach środowiskowych. Zastosowanie spektrometru mas jako detektora umożliwiło uzyskanie niskich granic wykrywalności (LOD; *ang. limit of detection*) związków na poziomie ng/l lub ng/g. Wysoka czułość, selektywność oraz wszechstronność LC-MS sprawiają, że jest to metoda pierwszego wyboru w analizie śladowych ilości AMs w złożonych matrycach środowiskowych. Główną wadą LC-MS w szczególności, gdy stosowana jest jonizacja przez elektrorozpylanie (ESI), jest efekt matrycowy (ME), który może skutkować tłumieniem lub wzmocnieniem sygnałów analitycznych [126]. W tabelach 8 – 10 przedstawiono przegląd metod analitycznych stosowanych do ekstrakcji i oznaczenia AMs w ciekłych oraz stałych próbkach środowiskowych. Należy zauważyć, że opracowanie procedury jednoczesnej ekstrakcji i oznaczenia AMs z różnych grup leków, wymaga kompromisu w doborze warunków eksperymentalnych. Kompromis ten umożliwi zastosowanie jednej procedury w rutynowych badaniach próbek, dostarczając dużej ilości danych o ich składzie jakościowym oraz ilościowym, jednakże odzysk poszczególnych AMs może różnić się pomiędzy sobą o nawet 40% [127–129]. Różnice we właściwościach fizykochemicznych AMs, takie jak polarność, rozpuszczalność,  $pK_a$ , logP oraz stabilność znacząco wpływają na odzysk w metodzie analitycznej [130]. Ponadto, składniki matrycowe próbki, takie jak OC, kwasy humusowe, sole nieorganiczne również wpływają na spadek efektywności ekstrakcji AMs z próbek [13].

Do izolacji AMs z próbek ciekłych (wody, ścieki) najczęściej stosowana jest ekstrakcja do fazy stałej (SPE, *ang. solid phase extraction*) [126,131,132], rzadziej opisywane są procedury wykorzystujące mikroekstrakcję do fazy stałej [133] oraz mikroekstrakcję do fazy ciekłej (LPME, *ang. Liquid-Phase Microextraction*) [134]. Najistotniejszymi parametrami wpływającymi na efektywność SPE są wybór odpowiedniego materiału oraz masy sorbentu, pH próbki oraz skład i objętość eluentu. Najczęściej stosowanym sorbentem do ekstrakcji wielu AMs o różnych właściwościach fizykochemicznych jest kopolimer N-winylopirolidonu z diwinylobenzenem o właściwościach hydrofilowo-lipofilowych pod nazwą handlową OASIS HLB [19,127,128,135]. Sorbent ten skutecznie zatrzymuje AMs o charakterze kwaśnym, zasadowym oraz obojętnym w szerokim zakresie pH próbki. Stosowanie HLB do próbek środowiskowych o złożonym składzie może prowadzić do koekstrakcji dużej ilości składników matrycowych, stąd też często łączy się go w tandemie z sorbentem o odmiennych właściwościach fizykochemicznych, którego celem jest ich zatrzymanie. Tandemowe połączenie sorbentu SAX o właściwościach silnego wymiennicza anionowego z sorbentem HLB jest najczęściej stosowane do oczyszczenia i wzbogacania w AMs ekstraktów glebowych [130,136]. Sorbent SAX umieszczony jako pierwszy zatrzymuje anionowe cząsteczki kwasów humusowych, a na sorbent HLB nanoszony jest wstępnie oczyszczony ekstrakt. Parametry elucji w SPE, takie jak rodzaj rozpuszczalnika, jego objętość oraz natężenie przepływu są dobierane eksperymentalnie, w zależności od wybranego sorbentu oraz ilości i charakteru AMs. Do elucji najczęściej stosowane są rozpuszczalniki organiczne, takie jak MeOH, ACN, aceton oraz ich mieszaniny.

Tabela 8. Metody analityczne w analizie wybranych środków bakteriobójczych w wodzie oraz ściekach

Lp.	AMs	Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	LOD/LOQ	Kolumna	Faza ruchoma	Detektor	Odzysk (SD) [%]	Lit.
1	OFC, CIP, ENF, NFC, LOM	UWW TWW	<b>SPE:</b> Próbkę ścieku (100 ml) doprowadzono do pH=3 z użyciem H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> i przesączono przez filtr z włókna szklanego. Następnie, próbkę naniesiono na sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowany 5 ml MeOH oraz 5 ml H <sub>2</sub> O o pH=3. Sorbent przemyto 5 ml 5% MeOH w H <sub>2</sub> O i suszono próżniowo przez 40 minut. Elucję przeprowadzono 8 ml MeOH, a ekstrakt odparowano w koncentratorze próżniowym. Przed analizą pozostałości rozpuszczono w 500 µl 0,1% FA w H <sub>2</sub> O i przefiltrowano przez filtr PTFE (0,22 µm).	MDL: 6,80 – 22,3 ng/l  MQL: 59,0 – 197 ng/l	Cortecs™ UPLC® C18+ (2,1 x 100 mm, 1,6 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,3 ml/min	LC-MS (ESI)	OFC: 64 (16) CIP: 51 (15) ENF: 100 (12) NFC: 72 (12) LOM: 107 (10)	[137]
2	SFP, SMX, SFT, SFR, SFM, TRI	TWW	<b>SPE:</b> Próbkę ścieku (50 ml) rozcieńczono 200 ml wody i doprowadzono do pH=4 z użyciem 40% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Następnie, naniesiono ją na sorbent OASIS HLB (200 mg, 6 ml) kondycjonowany 6 ml MeOH, 6 ml 0,5 mol/l HCL i 6 ml H <sub>2</sub> O. Po ekstrakcji sorbent suszono próżniowo 20 minut, a następnie przeprowadzono jego elucję 8 ml MeOH. Ekstrakt odparowano w strumieniu azotu do objętości 50 µl. Pozostałości rozpuszczono w 500 µl 0,1% FA w H <sub>2</sub> O i przefiltrowano przez filtr strzykawkowy (0,45 µm) bezpośrednio przed analizą.	MDL: 7,0 – 10,0 ng/l MQL: 12,0 – 20,0 ng/l	Xterra MS C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: 0,1% FA w ACN B: 10 mM octan amonu, 0,1% FA oraz 10% ACN w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,2 ml/min	LC-MS/MS (ESI)	SFP: 77 (7) – 89 (8) SMX: 99 (5) – 110 (4) SFT: 79 (14) – 87 (10) SFR: 80 (15) – 91 (11) SFM: 72 (18) – 82 (15) TRI: 80 (15) – 103 (14)	[138]
3	<b>SAs</b> (SAC, SFP, SFX, SCP, SDX, SDM, SM, SFR, SFH); <b>TCs</b> (TC, TCCI, OTC, DOX) <b>FQs</b> (ENF, CIP, NFC, OFC, LOM, DIF, MXF, DANO, ENO); <b>QNs</b> (FLU, OXA, NAL, PIP); <b>MQs</b> (ERY, LIN, SPI, RTM)	WS	<b>SPE:</b> Do 1 l wody dodano 6,0 g Na <sub>2</sub> EDTA i doprowadzono do pH 4,3 – 4,5 z użyciem HCl. Próbkę naniesiono na sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml), który kondycjonowano 6 ml MeOH oraz 6 ml 0,1 g/l Na <sub>2</sub> EDTA w H <sub>2</sub> O. Sorbent przemyto 10 ml H <sub>2</sub> O i suszono w strumieniu azotu przez 30 minut. Elucję przeprowadzono 6 ml mieszaniny NH <sub>3</sub> :MeOH (5:95; v/v). Eluent odparowano w strumieniu azotu do sucha a następnie rozpuszczono w 1 ml MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1; v/v).	MDL 0,29 – 4,03 ng/l	ACQUITY UPLC BEH C18 2,1 x 50 mm, n.d. µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: 0,1% FA w MeOH:ACN (1:1; v/v) B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,2 ml/min	LC-MS/MS (ESI)	34 (n.d.) – 115 (n.d.)	[139]
4	MAR, NFC, CIP, DANO, ENF, FLU	UWW, WS, TWW	<b>HF-LPME:</b> Włókna polipropylenowe Accurell PP nasączono 1-oktanołem i wypełniono H <sub>2</sub> O (pH=12) pełniącą rolę fazy akceptorowej. Włókna zanurzone w 50 ml próbki przefiltrowanej przez filtr z włókna szklanego GDU1 (10-1 µm), doprowadzono do pH=7 z dodatkiem 2 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Próbkę mieszano przez 5,5 h mieszając z prędkością 300 rpm. Włókno wyjęto, odcięto jeden z końców, za pomocą strzykawki pobrano fazę akceptorową i wstrzyknięto do układu LC.	LOD (DAD): 7 – 20 ng/l LOD (FL): 0,3 – 16 ng/l	LichroCART® 75-4 Purosphere® STAR RP-18e (4,0 x 75 mm, 3 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,8 ml/min	LC <sub>DAD</sub> λ <sub>max</sub> : 274 – 315 nm LC <sub>FL</sub> λ <sub>ex</sub> : 278 – 330 nm λ <sub>em</sub> : 368 – 515 nm	MAR: 95 (1) – 100 (1) NFC: 99 (1) – 100 (1) CIP: 99 (2) – 100 (1) DANO: >99 (1) ENF: >99 (1) FLU: 76 (2) – 79 (2)	[134]

Lp.	AMs	Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	LOD/LOQ	Kolumna	Faza ruchoma	Detektor	Odzysk (SD) [%]	Lit.
4	AZI, CLR, CLD, OFC, PENI, RTM, SMX, TRI, VAN	UWW TWW	<b>SPE:</b> Próbkę ścieków doprowadzono do pH=3,5, a następnie naniesiono na sorbent OASIS HLB (30 mg, 1 ml) kondycjonowany 1 ml mieszaniny MeOH:H <sub>2</sub> O:H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (90/9/1; v/v/v), 1 ml H <sub>2</sub> O i 1 ml 10 mM Na <sub>2</sub> EDTA. Sorbent przemyto 1 ml H <sub>2</sub> O i suszono strumieniem powietrza. Elucję przeprowadzono 0,5 ml mieszaniny MeOH:H <sub>2</sub> O:FA (90:9:1; v/v/v). Ekstrakt odparowano do sucha w strumieniu powietrza, pozostałości rozpuszczono w 250 µl mieszaniny rozpuszczalników fazy ruchomej A:B (50:50; v/v).	LOD: 0,2 – 73,5 ng/l	Synergi HydroRP (2,0 × 150 mm, 4 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN: 2 mM octan amonu: FA: (3/97/0,05; v/v/v) B: ACN: 2 mM octan amonu: FA: (95/5/0,05; v/v/v) <b>Natężenie przepływu:</b> 0,4 ml/min	LC-MS/MS (ESI)	AMOX: 77 (n.d.) AZI: 78 (n.d.) CEF: 94 (n.d.) CIP: 91 (n.d.) CLR: 69 (n.d.) CLD: 90 (n.d.) DOX: 111 (n.d.) LVF: 89 (n.d.) PENI: 68 (n.d.) RTM: 51 (n.d.) SMX: 63 (n.d.) TRI: 94 (n.d.) VAN: 88 (n.d.)	[131]
5	AMOX, CIP, DOX, LVF,			LOQ: 0,8 – 245,1 ng/l		<b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN: 2 mM octan amonu: FA: (3/97/0,05; v/v/v) B: ACN: 2 mM octan amonu: FA: (95/5/0,05; v/v/v) <b>Natężenie przepływu:</b> n.d.			
7	<b>FQs</b> (OFC, CIP, ENF, DANO, ORB, MXF) <b>QNs</b> (FLU, OXA, NAL, PIP) <b>MQs</b> (AZI, CLR, RTM, TYL, TIL, SPI) <b>PEN</b> (AMOX, AMP, PENI) <b>TCs</b> (TC, OTC, DOX, TCCI) <b>LAs</b> (CLD, LIN) <b>SAs</b> (SMX, SFD, SFT, SSM, SDM, SFP, SFM, SFR, SMP, SFX, SN, SBZ) <b>SAMs</b> (TRI)	UWW	<b>SPE:</b> Ścieki (25 – 100 ml) przefiltrowano przez filtr z włókna szklanego (2,7 µm), a następnie przez filtr z membraną nylonową (0,45 µm). Do próbki dodano 0,1 M Na <sub>2</sub> EDTA tak aby jego stężenie wynosiło 0,1% oraz doprowadzono pH do 2,5 z użyciem HCL. Próbkę naniesiono na sorbent OASIS HLB (60 mg, 3 ml) kondycjonowany 5 ml MeOH i 5 ml H <sub>2</sub> O (pH=2,5). Sorbent przepłukano 6 ml H <sub>2</sub> O i osuszono w strumieniu powietrza przez 5 minut. Elucję przeprowadzono 6 ml MeOH, ekstrakt odparowano do sucha w strumieniu azotu. Pozostałości rozpuszczono w 1 ml mieszaniny MeOH:H <sub>2</sub> O (50:50; v/v).	MDL: 0,31 – 77,71 ng/l  MQL: 1,04 – 272,50 ng/l	Acquity HSS T3 (2,1 × 50 mm, 1,8 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,5 ml/min	LC-MS/MS (ESI)	FQs: 30 (2) – 163 (10) QNs: 60 (6) – 176 (16) MQs: 50 (4) – 160 (17) TCs: 50 (7) – 180 (4) LAs: 63 (4) – 131 (3) SAs: 40 (11) – 126 (8) SAMs: 74 (6) – 122 (8)	[140]
8	<b>SAs</b> (SAC, SFP, SFX, SCP, SDX, SDM, SM, SFR, SFH) <b>TCs</b> (TC, TCCI, OTC, DOX) <b>FQs</b> (ENF, CIP, NFC, OFC, LOM, DIF, MXF, DANO, ENO) <b>QNs</b> (FLU, OXA, NAL, PIP) <b>MQs</b> (ERY, LIN, SPI, RTM)	WS	<b>SPE:</b> Do 1 l wody dodano 6,0 g Na <sub>2</sub> EDTA i doprowadzono do pH 4,3 – 4,5 z użyciem HCl. Próbkę naniesiono na sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml), który kondycjonowano 6 ml MeOH oraz 6 ml 0,1 g/l Na <sub>2</sub> EDTA w H <sub>2</sub> O. Sorbent przemyto 10 ml H <sub>2</sub> O i suszono w strumieniu azotu przez 30 minut. Elucję przeprowadzono 6 ml mieszaniny NH <sub>3</sub> :MeOH (5:95; v/v). Eluent odparowano w strumieniu azotu do sucha a następnie rozpuszczono w 1 ml MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1; v/v).	MDL 0,29 – 4,03 ng/l	ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 × 50 mm, n.d. µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: 0,1% FA w MeOH:ACN (1:1; v/v) B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,2 ml/min	LC-MS/MS (ESI)	34 (n.d.) – 115 (n.d.)	[139]

AMOX – amoksylicyna, AMP – ampicylina, AZI – azytromycyna, CIP – ciprofloksacyna, CLD – klindamycyna, CLR – klarytromycyna, DAD – detektor z matrycą diodową, DANO – danofloksacyna, DIF – difloksacyna, DOX – doksycyklina, ENF – enrofloksacyna, ENO – enoksacyna, ERY – erytromycyna, ESI – jonizacja przez elektrorozpylanie, FL – detektor fluorescencyjny, FLU – flumechina, FQs – fluorochinolony, HF-LPME – mikroekstrakcja w fazie ciekłej na bazie pustych włókien, LAs – linkozamidy, LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrem mas, LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona tandemowym spektrometrem mas, LC-QTRAP – chromatografia cieczowa sprzężona hybrydowym spektrometrem mas, LC-TOF – chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrem masowym czasu przelotu, LIN – linkomycyna, LOD – granica wykrywalności, LOM – lomefloksacyna, LOQ – granica oznaczalności, LVF – lewofloksacyna, MAR – marbofloksacyna, MDL – granica wykrywalności metody, MET – metronidazol, MQL – granica oznaczalności metody, MQs – makrolidy, MXF – moksifloksacyna, NAL – kwas nalidixowy, PIP – kwas pipemidowy, NFC – norfloksacyna, OFC – ofloksacyna, ORB – orbifloksacyna, OTC – oksytetracyklina, OXA – kwas oksolinowy, PEN – penicyliny, PENI – penicylina, QNs – chinolony, RTM – roksytromycyna, SAC – sulfacetamid, SAMs – syntetyczne środki bakteriobójcze, SAs – sulfonamidy, SBZ – sulfabenzamid, SCP – sulfachloropirydazyna, SDM – sulfadimetoksyna, SDX – sulfadoksyna, SFD – sulfadiazyna, SFH – sulfametizol, SFM – sulfametazyna, SFP – sulfapirydyna, SFR – sulfamerazyna, SFT – sulfatiazol, SFX – sulfizoksazol, SM – sulfameter, SMP – sulfametoksypirydazyna, SMX – sulfametoksazol, SN – sulfanitran, SPE – ekstrakcja do fazy stałej, SPI – spiramycyna, SSM – sulfisomidine, TC – tetracyklina, TCCI – chlorotetracyklina, TCs – tetracykliny, TC – tetracyklina, TIL – tylmikozyzna, TRI – trimetoprim, TWW – ściek oczyszczony, TYL – tylozyna, UWW – ściek nieoczyszczony, VAN – wankomycyna, WS – woda powierzchniowa,  $\lambda_{em}$  – długość fali emisji,  $\lambda_{ex}$  – długość fali wzbudzenia,  $\lambda_{max}$  – analityczna długość fali.

Tabela 9. Metody analityczne w analizie wybranych środków bakteriobójczych w próbkach gleb i obornika zwierzęcego

Lp.	AMS	Próbka	Przygotowanie próbki	LOD/LOQ	Kolumna	Faza ruchoma	Detektor	Odzysk (SD) [%]	Lit.
1	AZI, CLR, ERY, TYL, SMX, SFR, SFM, AMOX	SL	<p><b>SLE<sub>SAs+β-Ls</sub></b>: Do 1 g liofilizowanej gleby dodano 15 ml buforu fosforanowego (pH=2) i ekstrahowano w łaźni ultradźwiękowej przez 30 minut. Ekstrakcję powtórzono trzykrotnie, supernatanty połączone i zatężono na wyparce rotacyjnej. Następnie, ekstrakt rozcieńczono 200 ml wody i dodano 500 mg Na<sub>2</sub>EDTA×2H<sub>2</sub>O.</p> <p><b>SLE<sub>MQs</sub></b>: Do 1 g liofilizowanej gleby dodano 15 ml mieszaniny ACN:H<sub>2</sub>O (20:15; v/v) i ekstrahowano w łaźni ultradźwiękowej przez 30 minut. Ekstrakcję powtórzono trzykrotnie, supernatanty połączone i zatężono na wyparce rotacyjnej. Następnie, ekstrakt rozcieńczono 200 ml wody i dodano 500 mg Na<sub>2</sub>EDTA×2H<sub>2</sub>O.</p> <p><b>SPE</b>: Ekstrakt naniesiono na sorbent OASIS HLB (60 mg, 3 ml) kondycjonowany 10 ml MeOH oraz 6 ml H<sub>2</sub>O (o pH=2 dla SAs+β-Ls lub pH=7 dla MQs). Sorbenty suszono próżniowo przez 5 min, następnie eluowano 6 ml MeOH. Ekstrakt odparowano do sucha pod strumieniem azotu. Bezpośrednio przed analizą pozostałości rozpuszczono w mieszaninie 0,3 MeOH i 0,2 ml 5 mM octanu amonu.</p>	MQL: 0,5 – 10 ng/g	Agilent Poroshell 120 SB-C18 (50 × 2,1 mm, 2,7 μm)	<p><b>Elucja gradientowa:</b> A: 5 mM bufor octanu amonu B: ACN:MeOH (1:1; v/v) <b>Natężenie przepływu:</b> 0,5 ml/min</p>	LC-MS/MS (ESI)	AZI: 97 (21) CLR: 115 (5) ERY: 116 (10) TYL: 135 (20) SMX: 94 (15) SFR: 128 (11) SFM: 105 (6) AMOX: 64 (17)	[127]
2	SFD, SFR, SFM, SDM, SMX	SL+MAN	<p><b>SLE</b>: Do 20 g dodano 0,5 g Na<sub>2</sub>EDTA i 10 ml mieszaniny bufor fosforanowego:ACN (1:1; v/v). Ekstrakcję prowadzono przez 20 minut, wytrąsając próbkę mechanicznie a następnie poddano działaniu ultradźwięków przez 10 minut i odwirowano przez 8 minut z prędkością 6000 rpm. Supernatant rozcieńczono wodą do 300 ml i doprowadzono do pH=4 z użyciem 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.</p> <p><b>SPE</b>: Ekstrakt przepuszczono przez sorbenty OASIS HLB (n.d.), a następnie eluowano z sorbentu 2 ml MeOH oraz 2 ml mieszaniny MeOH:NH<sub>3</sub> (98:2; v/v). Ekstrakt odparowano do sucha w strumieniu azotu. Przed analizą pozostałość rozpuszczono w 1 ml MeOH:H<sub>2</sub>O (2:8; v/v).</p>	LOD: 0,01 – 0,02 ng/g	ACQUITY UPLC BEH C18 (100 × 2,1 mm, 1,7 μm)	<p><b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN B: 0,1% FA w H<sub>2</sub>O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,2 ml/min</p>	LC-MS/MS (ESI)	SFD: 91,6 (n.d.) SFR: 98,2 (n.d.) SFM: 97,8 (n.d.) SDM: 95,3 (n.d.) SMX: 98,9 (n.d.)	[19]
3	DOX, ENF, ERY, FLU, NFC, SFD, TRI, TYL	SL	<p><b>SLE</b>: Do 1 g próbki dodano 5 ml mieszaniny MeOH:ACN:0.1M EDTA:bufor Mcllvaine (pH=4) (30:20:25:25; v/v/v/v) i umieszczono w wortexie na 30 sekund, a następnie w łaźni ultradźwiękowej na 10 minut. Próbkę odwirowano przez 10 min z prędkością 4000 rpm, ekstrakt zdekantowano, a ekstrakcję powtórzono jeszcze dwukrotnie. Ekstrakty połączone, rozcieńczono 500 ml H<sub>2</sub>O i doprowadzono do pH=2,3 z użyciem H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Bezpośrednio przed SPE ekstrakt przefiltrowano przez filtr nylonowy o średnicy porów 0,45 μm.</p>	MDL: 0,5 – 3 μg/kg  MQL: 2 – 10 μg/kg	Waters Xterra MSC18 (100 × 2,1 mm, 3,5 μm)	<p><b>Elucja gradientowa:</b> A: 0,3% FA oraz 0,1% mrówczanu amonu w H<sub>2</sub>O B: ACN:MeOH (1:1; v/v) <b>Natężenie przepływu:</b> 0,25 ml/min<sup>1</sup></p>	LC-MS (ESI)	DOX: 98 (11) ENF: 102 (11) ERY: 102 (7) FLU: 92 (12) NFC: 82 (18) SFD: 72 (12) TRI: 102 (4) TYL: 103 (1)	[135]
4		MAN	<p><b>SPE</b>: Ekstrakt naniesiono na sorbent OASIS HLB (60 mg, 3 ml) kondycjonowany 3 ml MeOH i 3 ml H<sub>2</sub>O. Sorbent przemyto 6 ml H<sub>2</sub>O i suszono z użyciem próżni przez 30 minut. Elucję przeprowadzono 6 ml MeOH, a następnie odparowano do sucha pod strumieniem azotu. Pozostałości rozpuszczono bezpośrednio przed analizą w 1 ml 0,1% FA oraz 25% MeOH w H<sub>2</sub>O.</p>	MDL: 1 – 5 μg/kg  MQL: 3 – 14 μg/kg				DOX: 76 (13) ENF: 113 (7) ERY: 95 (10) FLU: 99 (6) NFC: 96 (12) SFD: 63 (10) TRI: 90 (11) TYL: 89 (16)	

Lp.	AMs	Rodzaj próbki	Przygotowanie próbeki	LOD/LOQ	Kolumna	Faza ruchoma	Detektor	Odzysk (SD) [%]	Lit.
5	LIN, CIP, ENF, DOX, TCCI, SFM, SMX	SL+MAN	<b>SLE:</b> Do 2 g gleby dodano 0,4 g Na <sub>2</sub> EDTA i homogenizowano przez 60 sekund w wirówce. Następnie, do próbki dodano 10 ml mieszaniny ACN:bufor fosforanowy pH=3,2 (1:1; v/v). Próbkę wirowano przez 15 minut, a następnie ekstrahowano 15 minut w łaźni ultradźwiękowej i ponownie odwirowywano przez 10 minut z prędkością 4500 rpm. Ekstrakcje powtórzono trzykrotnie, ekstrakty połączono i zateżono do 2 ml na wyparce rotacyjnej. Bezpośrednio przed analizą próbkę rozcieńczono do objętości 4 ml za pomocą 1% FA w ACN, tak aby proporcja ekstraktu do zakwaszonego ACN wynosiła 90:10 (v/v).	LOQ: 1 – 25 ng/g	Kinetex XB-C18 (100 x 3 mm, 2,6 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,3 ml/min	LC-MS/MS (ESI)	60 (n.d.) – 112 (n.d.)	[20]
6	TC, OTC, TCCI, DOX, SFD, SMX, SFM, SMM, SCX, SDM, SM, SCZ, NFC, OFC, CIP, ENF	SL	<b>SLE:</b> Do 2 g gleby wprowadzono 20 ml rozpuszczalnika EDTA-bufor fosforanowy:ACN:Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -NH <sub>3</sub> ×H <sub>2</sub> O (3:1; v/v) i pozostawiono na noc. Następnie wytrząsano przez 30 minut z prędkością 200 rpm w ciemności i poddano działaniu ultradźwięków przez 15 minut. Próbkę odwirowano przez 10 minut z prędkością 5000 rpm, supernatant zdekantowano. Procedurę powtórzono dwukrotnie, supernatanty połączono, przefiltrowano przez filtr GF/F (0,7 µm) i rozcieńczono do 500 ml wodą destylowaną. <b>SPE:</b> Ekstrakt wprowadzono na sorbent OSASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowany 10 ml MeOH i 10 ml H <sub>2</sub> O. Sorbenty przemyto 10 ml H <sub>2</sub> O i suszono pod strumieniem azotu przez 20 minut. Elucję przeprowadzono z użyciem 0,1% FA w MeOH, ekstrakt odparowano pod strumieniem azotu do objętości 100 µl. Bezpośrednio przed analizą próbkę rozcieńczono do objętości 1 ml mieszaniną MeOH:0,1% FA w H <sub>2</sub> O (3:2; v/v).	MDL 0,5 – 14,8 µg/kg	Kromasil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: MeOH B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,5 ml/min	LC-MS/MS (ESI)	TC: 103,6 (11,1) OTC: 94,6 (5,2) TCCI: 132,7 (8,3) DOX: 105,6 (13,1) SFD: 76,6 (10,2) SMX: 110,9 (5,1) SFM: 80,4 (14,4) SMM: 111,0 (3,8) SCX: 61,3 (12,1) SDM: 96,9 (1,6) SM: 99,4 (3,0) SCZ: 70,7 (1,9) NFC: 52,8 (2,1) OFC: 53,3 (1,4) CIP: 61,6 (11,1) ENF: 89,1 (13,8)	[129]
7	SFD, SMX, SFM, SMM, SCP, ENF, CIP, OFC, DOX, TCCI, TYL, TC OTC, TRI, RTM, ERY	SL	<b>SLE<sub>SL</sub>:</b> Do 1 g gleby dodano 0,1 g NaF i ekstrahowano 5 ml mieszaniny MeOH:EDTA:bufor cytrynianowy (3:2:1; v/v/v), wirowano przez 30 sekund z prędkością 2500 rpm, a następnie poddano działaniu ultradźwięków przez 15 minut i ponownie wirowano przez 5 minut z prędkością 4000 rpm. Procedurę wykonano trzykrotnie. Supernatanty połączono i odtłuszczono n-heksanem, a następnie rozcieńczono H <sub>2</sub> O do 250 ml, przesączono przez filtry z włókna szklanego i doprowadzono do pH=4. <b>SPE:</b> Połączone tandemowo sorbenty Waters SAX (200 mg, 3 ml) oraz OASIS HLB (500 mg, 6 ml) poddano kondycjonowaniu 5 ml MeOH oraz 5 ml H <sub>2</sub> O. Ekstrakt z gleby lub obornika naniesiono na sorbenty z prędkością 3 – 5 ml/min sorbent SAX odrzucono, natomiast sorbent OASIS HLB przemyto 10 ml wody i suszono próżniowo przez 30 min. Elucję prowadzono 5 ml mieszaniny metanol:aceton (80:20; v/v). Ekstrakt odparowano do sucha w strumieniu azotu, pozostałości rozpuszczono przed analizą w 1 ml 30% MeOH w H <sub>2</sub> O.	n.d.	UPLC BEH C18 (2.1 x100 mm, 1,7 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,45 ml/min	LC-MS/MS	TCs: 60,1 (n.d.) – 81,6 (n.d.) SAs: 65,6 (n.d.) – 90,0 (n.d.) FQs: 61,3 (n.d.) – 73,2 (n.d.) MQs: 47,3 (n.d.) – 73,4 (n.d.)	[136]

AMOX – amoksylicyna, AZI – azytromycyna, CIP – ciprofloksacyna, CLD – klindamycyna, CLR – klarytromycyna, DOX – doksycyklina, ENF – enrofloksacyna, ENO – enoksacyna, ERY – erytromycyna, ESI – jonizacja przez elektrorozpylanie, FAC – odchody, FLU – flumecyna, LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas, LIN – linkomycyna, LOQ – granica oznaczalności, MAN – obornik, MDL – granica wykrywalności metody, MQL – granica oznaczalności metody, NFC – norfloksacyna, OFC – ofloksacyna, OTC – oksytetracyklina, RTM – roksytromycyna, SAC – sulfacetamid, SARA – sarafloksacyna, SCP – sulfachloropirydazyna, SCX – sulfachinoksalina, SCZ – sulfakizyna, SDM – sulfadimetoksyna, SFD – sulfadiazyna, SFH – sulfametizol, SFM – sulfametazyna, SFP – sulfapiridyna, SFR – sulfamerazyna, SFT – sulfatiazol, SFX – sulfizoksazol, SL – gleba, SLE – ekstrakcja ciało stałe-ciecz, SM – sulfameter, SMM – sulfamonometoksyna, SMP – sulfametoksypirydazyna, SMX – sulfametoksazol, SPE – ekstrakcja do fazy stałej, TC – tetracyklina, TCCI – chlorotetracyklina, TRI – trimetoprim, TYL – tylozyna.

Tabela 10. Metody analityczne w analizie wybranych środków bakteriobójczych w próbkach tkanek roślinnych

Lp.	AMs	Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	LOD/LOQ	Kolumna	Faza ruchoma	Detektor	Odzysk (SD) [%]	Lit.
1	NFC, CIP, ENF	liście, korzenie, gałęzie	<b>SLE:</b> Do 1,0 g liofilizowanej rozdrobnionej tkanki roślinnej dodano 5 ml buforu 0,1 M EDTA-McIlvaine (pH=4), 5 ml mieszaniny ACN:FA (90:10; v/v) i traktowano ultradźwiękami przez 15 minut. Próbkę odwirowano przez 10 minut z prędkością 6000 rpm, supernatant zdekantowano. Ekstrakcje powtórzono trzykrotnie, ekstrakty połączone, przefiltrowano przez filtr nylonowy (0,45 µm) i rozcieńczono 200 ml H <sub>2</sub> O. <b>SPE:</b> Ekstrakt naniesiono na sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowany 6 ml MeOH i 6 ml H <sub>2</sub> O. Sorbent po ekstrakcji przemyto 5 ml 5% MeOH w H <sub>2</sub> O i 5 ml H <sub>2</sub> O i suszono przez 15 minut. Następnie wykonano elucję 10 ml 5% NH <sub>3</sub> w MeOH. Eluat odparowano do 300 µl pod strumieniem azotu i dopełniono do 1 ml mieszaniną MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40; v/v).	LOD: 5,0 – 7,0 ng/g	Synergi Hydro-RP 80A C18 (4,6 × 250 mm, 4 µm)	<b>Elucja izokratyczna:</b> A: ACN B: bufor fosforanowy (pH=4,5) A:B (18:82; v/v) <b>Natężenie przepływu:</b> 1,0 ml/min	LC-FL λ <sub>ex</sub> = 280 nm λ <sub>em</sub> = 452 nm	66 (5) – 85 (7)	[141]
2	SMP, TC, OFC, NFC, ENF, CIP	pędy, korzenie, sok ksylemowy	<b>SLE:</b> Do 10 g liofilizowanej próbki roślinnej dodano 10 ml ACN:MeOH (85:15; v/v), 1 g monohydratu kwasu cytrynowego i 0,5 g Na <sub>3</sub> Cit do uzyskania pH=4. Próbkę umieszczono w vortexie na 10 minut, a następnie dodano 4 g bezwodnego MgSO <sub>4</sub> i 1 g NaCl i ponownie mieszano przez 10 minut. Próbkę umieszczono w zamrażarce (-20°C) na 15 minut, a następnie odwirowywano przez 5 min z prędkością 1547g. <b>dSPE:</b> Do ekstraktu dodano 10 mg GCB oraz 50 mg C <sub>18</sub> i umieszczono w vortexie na 1 minutę. Próbkę odwirowano przez 5 minut z prędkością 3094g i zatężono do sucha w strumieniu azotu. Przed analizą pozostałość rozpuszczono w 1 ml 0,1% FA w H <sub>2</sub> O:aceton (95:5; v/v) i przesączono przez filtr nylonowy (0,22 µm).	LOD: 0,33 – 2,92 µg/kg  LOQ: 1,10 – 9,73 µg/kg	Waters T3 (2,1 × 100 mm, 1,8 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,3 ml/min	LC-MS/MS (ESI)	SMP: TC: 92 (14) – 110 (11) OFC: 72 (10) – 89 (9) NFC: 83 (11) – 92 (1) ENF: 61 (7) – 63 (7) CIP: 63 (17) – 82 (6)	[142,143]
3	TC, AMOX	bulwy	<b>PLE:</b> Do 0,1 g liofilizowanej próbki roślinnej dodano 5 g piasku ottawskiego i umieszczono w komorze ekstrakcyjnej. Próbki ekstrahowano ultraczystą H <sub>2</sub> O przez 10 minut w temperaturze 70°C i pod ciśnieniem 0,090 – 0,100 tora. <b>SPE:</b> Ekstrakt naniesiono na sorbent OASIS HLB (200 mg, 6 ml) kondycjonowanych 3 ml MeOH i 3 ml H <sub>2</sub> O. Sorbent przemyto 3 ml 6% MeOH w H <sub>2</sub> O i osuszono próżniowo. Elucję przeprowadzono 0,1% FA w MeOH i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Bezpośrednio przed analizą pozostałości rozpuszczono w 1 ml 1% MeOH w H <sub>2</sub> O.	n.d.	Kinetex® Biphenyl 100 A (2,1 × 50 mm, 2,6 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: 0,1% FA w MeOH B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,4 ml/min	LC-MS	Marchew: TC: 92 (n.d.) AMOX: 91 (n.d.) Kapusta: TC: 91 (n.d.) AMOX: 86 (n.d.)	[63]
4	SMX, SFP	liście, korzenie, bulwy	<b>PLE:</b> 1 g zmielonego liofilizowanego materiału roślinnego umieszczono w komorze ekstrakcyjnej. W obu końcach komory ekstrakcyjnej umieszczono filtr z włókna szklanego (0,27 µm) i dodano po 1 g florisilu (Mg <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Si). Ekstrakcję przeprowadzono dwukrotnie stosując 100% MeOH przez 5 minut, w temperaturze 80°C i pod ciśnieniem 10,34 MPa. Ekstrakt odparowano do sucha i rozpuszczono w mieszaninie ACN:H <sub>2</sub> O (30:70; v/v), sonikowano z mocą 37 kHz przez 10 minut, odwirowano przez 20 minut z prędkością 17000g przez i przefiltrowano przez filtr PTFE (0,22 µm).	LOD: 0,1 ng/g  LOQ: 0,25 – 0,50 ng/g	Gemini C-18 (2,0 × 150 mm, 3 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: 1,5% AcA w H <sub>2</sub> O B: 0,05% AcA w ACN <b>Natężenie przepływu:</b> n.d.	LC-MS	<b>Marchew (korzeń):</b> SMX: 97 (1) SFP: 92 (3) <b>Liście:</b> SMX: 120 (6) SFP: 61 (7) <b>Ślodkie ziemniaki:</b> SMX: 108 (1) SFP: 99 (1)	[144]



Lp.	AMs	Rodzaj próbki	Przygotowanie próbki	LOD/LOQ	Kolumna	Faza ruchoma	Detektor	Odzysk (SD) [%]	Lit.
5	TCCI, ENF, SFT	korzenie, liście	<b>QuEChERS:</b> Do 10 g próbki roślinnej dodano 10 ml buforu Mcllvaine (pH=8), 4 ml MeOH, 20 ml 1% AcA w ACN, 1 g Na <sub>3</sub> Cit·2H <sub>2</sub> O, 0,5 g Na <sub>2</sub> Cit·5H <sub>2</sub> O oraz 0,1 g Na <sub>2</sub> -EDTA. Próbkę umieszczono w vortexie na 5 minut i wirowano przez 5 minut z prędkością 4000 rpm. Górną warstwę przeniesiono do próbki wirowkowej i dodano 30 mg PSA i 30 mg C <sub>18</sub> . Próbkę wytrząsano przez 1 minutę i odwirowano przez 5 min z prędkością 4000 rpm. Ekstrakt zdekantowano, odparowano w strumieniu azotu, rozpuszczono w 0,2 ml 0,1% FA w MeOH:H <sub>2</sub> O (50:50; v/v) i przefiltrowano przez filtr strzykawkowy PTFE (0,2 µm).	LOD: 0,6 – 6,0 µg/kg LOQ: 2 - 20 µg/kg	Eclipse C18 (3,0 × 150 mm, 3,5 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: 0,1% FA i 5 mM mrówczanu amonu w MeOH B: 0,1% FA i 5 mM mrówczanu amonu w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,3 ml/min	LC-MS/MS	<b>Korzenie:</b> TCCI: 86,2 (8,9) – 100,0 (9,0) ENF: 103,5 (9,2) – 111,3 (3,2) SFT: 110,8 (7,5) – 114,7 (7,5) <b>Liście:</b> TCCI: 79,1 (7,6) – 79,4 (8,4) ENF: 98,1 (13,0) – 101,4 (11,0) SFT: 113,9 (7,4) – 114,8 (11,8)	[145]
6	DOX, SMX, NFC	warzywa	<b>SLE:</b> Do 2 g rozdrobnionej tkanki roślinnej dodano 10 ml ACN (ekstrakcja SMX) lub mieszaniny ACN+ 5 mol/l HCl (125:1; v/v) (ekstrakcja DOX, NFC). Próbkę umieszczono w vortexie na 30 sekund, sonikowano 30 minut i odwirowano przez 10 minut z prędkością 5000 rpm. <b>SPE:</b> Ekstrakt naniesiono na sorbent OASIS HLB (200 mg, 6 ml) kondycjonowany 5 ml MeOH i 5 ml H <sub>2</sub> O. Sorbent przemyto 15 ml H <sub>2</sub> O i osuszono próżniowo przez 20 min. Elucję przeprowadzono 6 ml 5% NH <sub>3</sub> w MeOH. Eluat odparowano w strumieniu azotu do objętości 1 ml.	LOD 1,2 – 1,8 µg/kg LOQ 3,6 – 5,0 µg/kg	Phenomenex C18 (2,0 × 150 mm, 3 µm)	<b>Elucja izokratyczna:</b> A: MeOH B: H <sub>2</sub> O SMX, DOX: A:B (40:60; v/v) NFC: A:B (50:50; v/v) <b>Natężenie przepływu:</b> 1,0 ml/min	LC-MS/MS	DOX: 72,7 (7,4) – 90,4 (7,5) SMX: 79,1 (7,3) – 93,9 (2,5) NFC: 73,6 (8,6) – 89,5 (4,2)	[146]
7	SFD, CLR	liście, korzenie	<b>SLE:</b> Do 500 mg liścia lub 300 mg korzenia dodano 5 ml MeOH i umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 30 min. Próbkę odwirowano przez 15 minut z prędkością 4000 rpm. Ekstrakcję wykonano dwukrotnie. <b>SPE:</b> Ekstrakt naniesiono na sorbent OASIS Prime HLB (60 mg, 3 ml) kondycjonowany 3 ml MeOH. Wkład odrzucono, a eluat wysuszono do sucha pod strumieniem azotu. Bezpośrednio przed analizą pozostałości rozpuszczono w 1 ml mieszaniny 0,1% FA w H <sub>2</sub> O:ACN (95:5; v/v) i przefiltrowano przez filtr z PTFE (0,2 µm).	n.d.	Acquity UPLC HSS-T3 (2,1 × 100 mm, 1,8 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: ACN B: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O <b>Natężenie przepływu:</b> 0,3 ml/min	LC-QTOF-MS/MS (ESI)	73 (n.d.) – 79 (n.d.)	[147]
8	SMX, TRI	liście, korzenie, łodygi	<b>PLE:</b> 8 g liofilizowanej tkanki roślinnej umieszczono w 10 ml kuwetach ekstrakcyjnych PLE ze stali nierdzewnej, które zamknięto na obu końcach okrągłymi filtrami z włókna szklanego i wysokociśnieniowymi zaślepkami. Próbki ekstrahowano trzykrotnie 55% ACN w H <sub>2</sub> O przez 5 minut w temperaturze 130°C i pod ciśnieniem 10 342 kPa. Następnie, ekstrakcję powtórzono stosując 85% ACN w H <sub>2</sub> O. Ekstrakty połączono i przefiltrowano. ACN odparowano pod strumieniem azotu. Pozostały ekstrakt wodny rozcieńczyli 10 mM buforem mrówczanowym (pH=3,7).	MDL <sub>SMX</sub> : 1,75 – 7,07 ng/g MDL <sub>TRI</sub> : 9,28 – 11,79 ng/g	Synergi 4 µm hydro-RP 80A (4,6 × 50 mm, 4 µm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: bufor mrówczan amonu/kwas mrówkowy (10 mM, pH 3,7) B: ACN <b>Natężenie przepływu:</b> 0,4 ml/min	LC-MS	Marchew: SMX: 78 (n.d.) – 98 (n.d.) TRI: 114 (n.d.) – 161 (n.d.)	[21]

ACN – acetonitryl, AMOX – amoksyicylina, CIP – ciprofloksacyna, CLR – klarytromycyna, DOX – doksycyklina, dSPE – dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej, ENF – enrofloksacyna, LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrem mas, LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemowym spektrometrem mas, LOD – granica wykrywalności, LOM – lomefloksacyna, LOQ – granica oznaczalności, MDL – granica wykrywalności metody, MeOH – metanol, Na<sub>3</sub>Cit – cytrynian trisodowy, NFC – norfloksacyna, OFC – ofloksacyna, PLE – przyspieszoną ekstrakcją za pomocą rozpuszczalnika, SFD – sulfadiazyna, SFP – sulfapyrydyna, SFT – sulfatiazol, SMP – sulfametoksyperydydyna, SMX – sulfametoksazol, SPE – ekstrakcja do fazy stałej, TC – tetracyklina, TCCI – chlorotetracyklina, TRI – trimetoprim, λ<sub>em</sub> – długość fali wzbudzenia, λ<sub>ex</sub> – długość fali emisji.

W stałych próbkach środowiskowych (gleba, obornik, tkanki roślinne) AMs są rozproszone, stąd ich stężenie jest bardzo niskie (ng/kg – µg/kg). Ponadto składniki mineralne oraz materia organiczna zawarta w próbkach mogą wchodzić w interakcję z AMs poprzez kompleksowanie, tworzenie wiązań wodorowych, oddziaływania hydrofobowe i wymianę jonową, utrudniając ich desorpcję podczas ekstrakcji [128]. Z tych przyczyn do izolacji AMs ze stałych próbek stosowane są bardziej złożone, wieloetapowe procedury niż dla próbek ciekłych (Tabela 9, 10). W pierwszym etapie ekstrakcji AMs z próbki stałej wykorzystuje się techniki takie jak: ekstrakcja ciało stałe-ciecz (SLE, *ang. solid-liquid extraction*), ekstrakcja cieczą pod ciśnieniem (PLE, *ang. pressurized liquid extraction*) lub ekstrakcja QuEChERS. Zastosowanie PLE wymaga drogiej aparatury i skomplikowanych procedur optymalizacyjnych, natomiast metody QuEChERS mają ograniczoną selektywność, co może skutkować koekstrakcją nadmiernej ilości interferujących składników matrycowych. Z tej przyczyny najczęściej do izolacji AMs z próbek stałych stosowane jest SLE z mechanicznym wytrząsaniem próbki oraz/lub wspomagane ultradźwiękami [148,149]. Skład rozpuszczalnika ekstrakcyjnego jest kluczowy do efektywnej desorpcji AMs z gleb oraz osadów. Rozpuszczalnik ten musi być dobrany zgodnie z właściwościami fizykochemicznymi AMs ( $pK_a$ ,  $\log P$ ), tak aby ich rozpuszczalność oraz stabilność była jak najwyższa [130]. Jako rozpuszczalniki w SLE najczęściej stosowane są roztwory buforów (fosforanowy, McIlvaine, cytrynianowy) oraz rozpuszczalniki organiczne (MeOH, ACN) [135]. Często stosowany jest dodatek  $Na_2EDTA$ , jako czynnika chelatującego, który wiążąc się z rozpuszczonymi jonami metali, zwiększa skuteczność ekstrakcji AMs.  $Na_2EDTA$  zastosowany w nadmiarze może również chelatować związki organiczne [130]. FQs w swojej strukturze posiadają ugrupowanie karboksylowe i jedną lub więcej grupę aminową, które w niskich pH ulegają protonowaniu i są naładowane dodatnio, natomiast w warunkach obojętnego pH występują w postaci obojnaczej. SAs w strukturze zawierają azot anilinowy, nadający związkowi charakter słabej zasady oraz wiązanie sulfonamidowe S-N, nadające charakter słabego kwasu. TCs mają trzy wartości  $pK_a$  (3,0 – 3,3; 7,3 – 7,9; 9,1 – 9,3), więc mają charakter amfoteryczny i rozpuszczają się dobrze zarówno w roztworach o niskim, jak i wysokim pH. Najczęściej na etapie SLE stosowane są rozpuszczalniki o niskim pH, ze względu na dobrą stabilność TCs, SAs oraz FQs w środowisku lekko kwaśnym ( $4 < pH < 7$ ) [150]. TYL oraz CLR z grupy MQs są związkami zasadowymi ( $pK_a$  odpowiednio 7,7 oraz 8,3), słabo rozpuszczalnymi w wodzie i niestabilnymi w środowisku kwasowym [151]. AMOX oraz AMP są niestabilne w środowisku wodnym i podatne na hydrolizę, a obecny w strukturze pierścień  $\beta$ -laktamowy ulega rozszczepieniu zarówno na skutek działania czynników abiotycznych, jak i biotycznych [152]. W drugim etapie ekstrakt po SLE jest oczyszczany, a anality są wzbogacane najczęściej z zastosowaniem SPE [127,130,135,141] lub rzadziej dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (dSPE) [142,143].

Pomimo dużej liczby procedur opisanych w literaturze, odtworzenie ich w praktyce laboratoryjnej jest trudne, a wielu przypadkach niemożliwe. Wynika to z faktu: (I) braku informacji dotyczących charakterystyki matrycy wykorzystanej do opracowania metody analitycznej, (II) braku istotnych szczegółów w opisie metodologicznym („know-how”) oraz (III) stosowania innego sprzętu laboratoryjnego lub odczynników, niż wymienione w metodzie. Należy zauważyć, że problem opracowania procedury jednoczesnej ekstrakcji wielu AMs z próbek środowiskowych nie wynika wyłącznie z ilości, czy właściwości fizykochemicznych

tych związków, ale również ze zmiennego składu próbek środowiskowych. Żadna z opisanych w tabelach 8 – 10 procedur nie jest uniwersalna, ponieważ nie uwzględnia wpływu zmiennych składowych matrycy (pH, zawartość OC, zawartość jonów metali) na odzysk AMs. W celu opracowania „szytej na miarę” procedury ekstrakcji i oznaczenia AMs w próbkach środowiskowych należy poszerzyć etap walidacji o korelację odzysku z głównymi składowymi matrycy, aby określić rzeczywisty zakres stosowalności metody analitycznej.

## **1.6. Analiza niecelowana jako narzędzie do poszukiwania produktów transformacji środków bakteriobójczych w środowisku**

Rutynowe monitorowanie pozostałości AMs w środowisku przeprowadzane w laboratoriach analitycznych na całym świecie wykonywane są w oparciu o wykaz zanieczyszczeń potencjalnie niebezpiecznych dla człowieka, środowiska lub uregulowanych prawnie. Metody oznaczania AMs opracowywane są z użyciem wzorców analitycznych, a następnie poddawane walidacji. Takie podejście nazywane analizą celowaną (TA; *ang. targeted analysis*) pozwala na oznaczenie z dużą precyzją i dokładnością wybranych AMs w złożonych matrycach środowiskowych. TA jest z definicji ograniczona, ponieważ związki chemiczne, które nie zostały ujęte w zakresie docelowej metody nie zostaną wykryte [153]. Pod pojęciem analizy niecelowanej (NTA; *ang. non-targeted analysis*) rozumiane jest podejście, w którym w ramach jednej analizy, zebrane zostają dane o wszystkich zanieczyszczeniach obecnych w próbce, bez konieczności posiadania informacji o jej składzie chemicznym oraz miejscu pochodzenia. Natomiast jeżeli istnieją przesłanki do poszukiwania konkretnych zanieczyszczeń w próbce, a metoda analityczna nie została opracowana w oparciu o ich wzorce analityczne, to taka odmiana NTA nazywana jest analizą przesiewową [154]. NTA ma głównie charakter jakościowy, rzadziej ilościowy, a analiza wyników polega na porównaniu uzyskanego widma masowego z widmami referencyjnymi dostępnymi w bazach chemicznych oraz literaturze naukowej.

Identyfikacja TPs jest wyzwaniem ze względu na brak informacji o ich strukturze i właściwościach fizykochemicznych, niskie stężenia, duże rozproszenie w środowisku oraz złożoności matryc próbek środowiskowych. Zastosowanie TA jest ograniczone, ponieważ wymaga czystych wzorców odniesienia do opracowania metody analitycznej, a ich zakup dla TPs jest ograniczony lub niemożliwy ze względu na brak informacji o strukturze tych związków. Do identyfikacji TPs w próbkach środowiskowych stosowane są zaawansowane techniki analityczne, łączące chromatografię ciekłą lub gazową z tandemowym lub wysokorozdzielczym spektrometrem mas (MS/MS, HRMS) o wysokiej czułości i rozdzielczości. Technologie te pozwalają na nieukierunkowane wykrywanie wielu TPs obecnych w próbce w ramach jednej analizy i ich identyfikację, bez konieczności stosowania wzorców analitycznych [155]. Zastosowanie LC-MS/MS lub LC-HRMS w nieukierunkowanych badaniach przesiewowych polega na separacji związków zawartych w próbce, a następnie wykorzystaniu różnych trybów pracy spektrometru mas w celu zebrania jak największej ilości danych o ich strukturze [153]. Otrzymane wyniki w postaci widm masowych związków są

filtrowane, a następnie analizowane retrospektywnie lub porównywane z danymi zebranymi w bibliotekach wzorów i struktur molekularnych. Końcowo przygotowywana jest lista potencjalnie zidentyfikowanych związków, których obecność jest potwierdzana z użyciem innych metod analitycznych (np. magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, *ang. nuclear magnetic resonance*), rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów (XPS, *ang. X-ray photoelectron spectroscopy*)) lub danych literaturowych. Hybrydowy spektrometr mas typu QTRAP® łączy zalety potrójnego kwadrupola (QqQ, *ang. triple quadrupole*) z liniową pułapką jonową (LIT, *ang. linear ion trap*), której funkcję może pełnić trzeci kwadrupol. Charakteryzuje się on wysoką czułością oraz prędkością skanowania, co jest użyteczne w badaniach przesiewowych próbek środowiskowych. Stosując tryb inteligentnej akwizycji danych (IDA, *ang. information-dependent acquisition*) możliwe jest połączenie dwóch trybów pracy, w których po skanowaniu QqQ lub LIT, następuje drugi skan LIT. Przeprowadzenie NTA z zastosowaniem LC-QTRAP, niezależnie od wybranego trybu pracy detektora, w końcowym etapie wymaga selekcji odpowiednich sygnałów z dużej ilości danych generowanych w ramach jednej analizy. Redukcja ilości otrzymanych danych może nastąpić na etapie ustawiania odpowiednich kryteriów IDA (takich jak: zakres rejestrowanych mas, wymagana intensywność sygnału do uruchomienia pułapki jonowej, zakres tolerancji masy) lub po rejestracji poprzez zastosowanie specjalnego oprogramowania i analizę retrospektywną [153].

Pomimo wszechstronności metod NTA mają one swoje ograniczenia. Teoretyczne założenie NTA, według którego możliwa jest identyfikacja wszystkich składników próbki w ramach jednej analizy, nie uwzględnia praktycznych ograniczeń związanych z różnymi właściwościami fizykochemicznymi związków występujących w próbkach środowiskowych [154]. Na ilość oraz rodzaj wykrywanych w ramach NTA związków ma wpływ 6 czynników: rodzaj matrycy próbki, warunki przygotowania próbki, pH próbki, warunki chromatograficzne, rodzaj detektora oraz tryb jonizacji [156]. Typ chromatografii (LC lub gazowa (GC)) ma wpływ na ilość oraz rodzaj wykrywanych związków [157]. Warunki poboru próbki, transportu oraz przechowywania, a także metoda jej przygotowania mogą spowodować degradację lub utratę części związków obecnych w próbce [154]. Z tej przyczyny, powszechnie spotykaną odmianą NTA jest analiza przesiewowa, w której obszar poszukiwań zawęża się do jednej klasy związków. Cel analizy przesiewowej definiowany jest na podstawie wstępnej informacji o miejscu pochodzenia próbki i jego potencjalnych zanieczyszczeniach. Pomimo założonego z góry celu, podejście to można traktować jako odmianę NTA, ponieważ skupia się na odkrywaniu nowych związków w ramach danej klasy związków [154]. Największym ograniczeniem NTA jest brak możliwości określenia dokładnej struktury molekularnej zidentyfikowanego związku (odmiany izomerycznej, położenia wiązania lub ugrupowania chemicznego). Analiza przesiewowa jest skutecznym narzędziem do poszukiwania TPów związków farmaceutycznych w różnych rodzajach próbek środowiskowych. TPów w próbkach środowiskowych mają niższe stężenia od macierzystych AMs. Z tej przyczyny, stosując metody LC-ESI-MS/MS, należy uwzględnić możliwy problem z niską intensywnością jonu prekursorowego lub jonów fragmentacyjnych TPów. Co więcej, widma fragmentacyjne otrzymane tą metodą mogą nie dostarczyć wystarczających informacji dotyczących subtelnych różnic izomerycznych związków, istotnych dla toksyczności [154].

## 2. Wyniki badań i ich znaczenie

### 2.1. Wydzielanie i oznaczanie wybranych środków bakteriobójczych oraz ich produktów transformacji w próbkach środowiskowych

#### 2.1.1. Wydzielanie środków bakteriobójczych z ciekłych próbek środowiskowych

Do wydzielenia AMs z próbek wód gruntowych, powierzchniowych oraz ścieków zastosowano SPE. Dobór parametrów ekstrakcji obejmował: rodzaj sorbentu oraz jego masy, pH próbki, rodzaj oraz objętość rozpuszczalników stosowanych do elucji i rozpuszczania pozostałości próbki po etapie odparowania oraz jeśli to było konieczne materiał oraz wymiar filtra strzykawkowego. W tabeli 11 przedstawiono opracowane procedury ekstrakcji wybranych AMs z próbek ciekłych wraz z odzyskiem AMs. Dobór odpowiedniego sorbentu był kluczowy spośród wymienionych parametrów. Wybrano dwa rodzaje sorbentów – OASIS HLB (500 mg, 6 ml) oraz C<sub>18</sub> (500 mg, 6 ml), których producenci deklarowali zdolność do retencji związków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych. Początkowe parametry kondycjonowania oraz elucji AMs z sorbentów były zgodne z zaleceniami producentów zawartymi w instrukcjach. Odzysk wszystkich 14 wybranych AMs z próbek wody o objętości 1 l oraz pH=7 z zastosowaniem sorbentu OASIS HLB był w zakresie 59 (CLR) – 119% (MET). Inaczej było w przypadku sorbentu C<sub>18</sub>, który zatrzymał wyłącznie 7 z 14 wybranych AMs, a ich odzysk był w zakresie 65 – 107%. Ostatecznie we wszystkich opisanych w tabeli 11 procedurach zastosowano sorbent OASIS HLB [P1,P2,P6,P8].

Istotnym parametrem wpływającym na retencję AMs na sorbencie było pH próbki, ponieważ wpływa ono na właściwości sorbentu (ładunek powierzchniowy, zdolność do adsorpcji) oraz właściwości chemiczne AMs, takie jak ich forma jonowa, stabilność oraz stopień dysocjacji. Dla wybranych AMs z grup TCs, FQs, SAs oraz MQs odpowiedni zakres pH wynosił od 3,0 do 4,0. Z tego powodu we wszystkich opracowanych procedurach ekstrakcji na etapie kondycjonowania zastosowano wodę zakwaszoną do pH odpowiadającemu pH próbki. Zminimalizowało to ryzyko zmiany formy jonowej AMs w procesie ekstrakcji oraz zmniejszyło potencjalne straty analitów. Rozpuszczalnik stosowany do elucji analitów powinien zapewnić skuteczną desorpcję wszystkich AMs z sorbentu, dlatego przy jego doborze konieczne jest uwzględnienie ich charakteru chemicznego. W ramach badań wstępnych opisanych w P1 oceniono wpływ rozpuszczalników o różnym odczynie – kwaśnym (0,1% FA w MeOH, ACN:MeOH:AcA (4:4:2; v/v/v)), zasadowym (1,0% NH<sub>3</sub> w MeOH) oraz obojętnym (MeOH) – na odzysk 8 SAs. Najwyższy odzysk wszystkich 8 SAs uzyskano stosując MeOH (75 – 100%), następnie 0,1% NH<sub>3</sub> w MeOH (70 – 102%), natomiast najniższy stosując 0,1% FA w MeOH (<80%) i ACN:MeOH:AcA (4:4:2;v/v/v) (<78%). Zauważono, że dodatek kwasu lub zasady do rozpuszczalnika organicznego ma znaczący wpływ na skuteczność elucji AMs. SAs w swojej strukturze mają dwie grupy funkcyjne – pK<sub>a1</sub>: 1,32 – 2,22 (-NH-) oraz pK<sub>a2</sub>: 5,00 – 8,58 (-NH<sub>2</sub>) – które mogą ulegać protonowaniu lub deprotonowaniu. Najwyższą skuteczność

Tabela 11. Procedury wydzielenia AMs z próbek ciekłych z użyciem SPE

AMs	Rodzaj próbki	Procedura przygotowania próbki	Odzysk [%]	Publikacja
8 SAs: SMX, SFD, SFP, SFM, SFT, SFR, SFH, SFX	woda powierzchniowa	Próbkę wody o objętości 1 l przesączono przez filtr z włókna szklanego i doprowadzono do pH=4 z użyciem kwasu siarkowego(VI). Sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowano 6 ml MeOH, 6 ml H <sub>2</sub> O i 6 ml 0,1 M HCl. Próbkę wody przepuszczono przez sorbent z prędkością przepływu 4 ml/min, a następnie suszono przez 30 min. Elucję przeprowadzono 20 ml MeOH, a ekstrakt odparowano do sucha. Pozostałości próbki rozpuszczono w 1 ml MeOH i przefiltrowano przez filtr strzykawkowy PES (0,45 µm, 13 mm) bezpośrednio przed analizą.	43 – 108	[P1]
14 AMs: TC, OTC, DOX, SMX, SFD, CIP, LVF, ENF, MET, TRI, VAN, TYL, CLR, CLD	woda powierzchniowa, woda gruntowa, ścieki	Próbkę wody o objętości 1 l przesączono przez filtr z włókna szklanego i doprowadzono do pH=3 z użyciem HCl. Sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowano 6 ml MeOH, 6 ml H <sub>2</sub> O i 6 ml 0,1 M HCl. Próbkę wody przepuszczono przez sorbent z prędkością przepływu 5 ml/min, który następnie suszono przez 20 min. Elucję przeprowadzono czterokrotnie, każdorazowo porcją MeOH o objętości 5 ml, ekstrakty połączono. Próbkę odparowano do sucha i rozpuszczono ponownie w 1 ml MeOH, a następnie przefiltrowano przez filtry strzykawkowe PES (0,45 µm, 13 mm) bezpośrednio przed analizą.	51 – 102	[P2]
CIP, ENF, LFV	woda pitna wzbogacona AMs	Próbkę wody o objętości 130 ml doprowadzono do pH=3 za pomocą 0,1 M HCl. Sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowano 6 ml MeOH, 6 ml 0,1 M HCl i 6 ml H <sub>2</sub> O. Próbkę wody przepuszczono przez sorbent z prędkością przepływu 3 ml/min, a następnie suszono przez 20 min. Elucję przeprowadzono 10 ml 0,1% AcA w MeOH, a eluat odparowano do sucha w strumieniu azotu. Pozostałości próbki rozpuszczono w 1 ml 0,1% FA w mieszaninie H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1 v/v) bezpośrednio przed analizą.	62 – 97	[P8]
SMX, TRI	woda pitna wzbogacona AMs	Próbkę wody o objętości 100 ml przefiltrowano przez filtr z włókna szklanego i doprowadzono do pH≈3,9 – 4,1 za pomocą stężonego H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowano 6 ml MeOH, 6 ml 0,1 M HCl i 6 ml H <sub>2</sub> O (pH=4; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ). Próbkę wody przepuszczono przez sorbent z prędkością przepływu 3 ml/min, a następnie suszono przez 30 min. Elucję przeprowadzono 6 ml MeOH, a ekstrakt odparowano do sucha. Pozostałości próbki rozpuszczono w 1 ml MeOH bezpośrednio przed analizą.	74 (SMX) 70 (TRI)	[P6]

CIP – ciprofloksacyna, CLD – klindamycyna, CLR – klarytromycyna, DOX – doksycyklina, ENF – enrofloksacyna, LVF – lewofloksacyna, MeOH – metanol, MET – metronidazol, OTC – oksytetracyklina, SFD – sulfadiazyna, SFH – sulfametizol, SFM – ulfametazyna, SFP – sulfapirydyna, SFR – sulfamerazyne, SFT – sulfatiazol, SFX – sulfizoksazol, SMX – sulfametoksazol, TC – tetracyklina, TRI – trimetoprim, TYL – tylozyna, VAN – wankomycyna.

desorpcji SAs z sorbentu uzyskano, gdy były one w formie obojętnej lub anionowej, natomiast najniższą skuteczność zaobserwowano przy użyciu zakwaszonych rozpuszczalników, w obecności których SAs występowały w formie kationowej. W rozpuszczalnikach o niskim pH FQs występują w formie kationowej, ponieważ grupa azotowa obecna w pierścieniu piperazynowym ulega protonowaniu. Skuteczność ich elucji z sorbentu była wyższa po zastosowaniu 0,1% AcA w MeOH (62 – 97%) [P8] w porównaniu do MeOH (53 – 71%) [P2]. Można zatem zauważyć, że skuteczność elucji AMs zależy przede wszystkim od chemicznej natury związku oraz interakcji jego grup funkcyjnych z sorbentem. Ostatecznie jednak w procedurze ekstrakcji 14 AMs z różnych grup leków, tak jak w procedurze ekstrakcji SAs,

zastosowano MeOH na etapie elucji [P2]. Dobór ten wynikał z konieczności otrzymania wysokiego odzysku wszystkich 14 AMs, a nie tylko FQs [P2].

Przed analizami LC-MS/MS ekstrakty z próbek wód oraz ścieków były filtrowane w celu usunięcia zawiesiny i uzyskania jednolitych, klarownych roztworów [P1,P2]. Na etapie doboru materiału do filtracji porównano odzysk wybranych mieszanin AMs rozpuszczonych w MeOH oraz H<sub>2</sub>O dla dwóch rodzajów filtrów strzykawkowych – nylonowego (NY; 0,45 µm, 13 mm) oraz polietersulfonu (PES; 0,45 µm, 13 mm). Odzysk AMs z użyciem filtra PES z roztworu wodnego był w zakresie 88 (SMX) – 109% (VAN), natomiast z MeOH 82 (TC) – 107% (SFD). Odzyski AMs z filtra NY z roztworów wodnego i MeOH były w zakresach odpowiednio: 72 (SFD) – 110% (VAN) oraz 74 (CLD) – 115% (MET). Ostatecznie do filtracji ekstraktów z próbek środowiskowych wybrano filtr PES.

### **2.1.2. Wydzielanie środków bakteriobójczych ze stałych próbek środowiskowych**

W ramach rozprawy doktorskiej opracowano 8 procedur ekstrakcji wybranych AMs ze stałych próbek środowiskowych, takich jak gleba, tkanki roślinne, stosując metody SLE oraz SLE-SPE (Tabele 12, 13). W pierwszej kolejności sprawdzono opisane w literaturze procedury ekstrakcji AMs z gleb oraz tkanek roślinnych, aby odtworzyć je w warunkach laboratoryjnych i dostosować do wybranego zestawu AMs. Ostatecznie jako punkt wyjścia do dalszych badań przyjęto procedurę ekstrakcji 12 AMs metodą SLE-SPE z próbek obornika oraz osadu, opracowaną przez zespół dr hab. inż. Sylwii Bajkacz, prof. PŚ, z Katedry Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej [158]. Pomimo, że odzysk AMs z obornika i osadu czynnego w pierwotnej procedurze ekstrakcji był na akceptowalnym poziomie 45 – 85%, to nie udało się jej zaadaptować do próbek gleb, gdzie odzysk 11 z 14 wybranych AMs wynosił poniżej 54%. Korzystając z dostępnych w literaturze informacji, zmodyfikowano następujące parametry metody w celu poprawy odzysku AMs: rodzaj i objętość rozpuszczalnika w SLE, czas ekstrakcji oraz krotność ekstrakcji SLE (Tabela 12). Warunki SPE były analogiczne do tych stosowanych dla próbek wód. Pomimo wprowadzenia 29 modyfikacji w procedurze SLE-SPE, odzysk AMs nadal pozostawał na niskim poziomie (Tabela 12).

Na podstawie badań wstępnych postawiono hipotezę, że problemy z odtwarzalnością metod ekstrakcji AMs opisanych w literaturze wynikają z różnic we właściwościach fizykochemicznych próbek gleb. Aby ustalić czynniki powodujące znaczne straty AMs po zastosowaniu procedury SLE-SPE do próbek gleb, sprawdzono odzysk AMs na pojedynczych etapach procedury przygotowania próbki: (1) SLE, (2) rozpuszczania pozostałości po SLE, (3) SPE, (4) odparowanie próbki. Zbadano także stabilność AMs w rozpuszczalnikach oraz ich stabilność pod wpływem działania ultradźwięków. Szczegółowe informacje dotyczące opracowania warunków wydzielania 14 AMs oraz 8 SAs z próbek gleb metodą SLE-SPE znajdują się w publikacjach P4 oraz P7.

Na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych (Tabela 12) określono, że roztwory buforowane w mieszaninie z rozpuszczalnikiem organicznym stosowane do SLE lepiej ekstrahują AMs z gleby w porównaniu do czystych rozpuszczalników organicznych. Stosując do SLE mieszaninę buforu cytrynianowego (pH=4) z MeOH w stosunku 1:1 (v/v) możliwe było wydzielenie z gleby 7 z 14 wybranych AMs (TYL, TRI, MET, CLR, CLD, SMX, SFD) z odzyskiem przekraczającym 88% [P4]. Natomiast mieszanina buforu McIlvaine (pH=4) z ACN w stosunku 1:1 (v/v) pozwoliła na skuteczną ekstrakcję 10 spośród 14 wybranych AMs (TC, OTC, DOX, TRI, VAN, MET, CLR, CLD, SMX, SFD), których odzysk na etapie SLE był powyżej 71% [P4]. Żaden z wymienionych rozpuszczalników zastosowanych na etapie SLE nie był odpowiedni do efektywnej ekstrakcji FQs z gleby. Jedynie świeżo przygotowana mieszanina 0,2 M NaOH z acetonem w stosunku 1:1 (v/v) umożliwiła ekstrakcję FQs i SAs z gleby, a otrzymany odzysk był w zakresie odpowiednio: 54 – 85% oraz 89 – 115% [P4]. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika maksymalny czas pojedynczej ekstrakcji wynosi 30 minut, a dalsze jej kontynuowanie prowadzi do strat AMs. Rozważano również wspomaganie ekstrakcji AMs na etapie SLE poprzez zastosowanie ultradźwięków przez czas od 5 do 30 minut. Zauważono, że wraz ze wzrostem czasu stosowania ultradźwięków zawartość AMs w ekstrakcie malała nawet o 41% [P4]. Ze względu na złożoność matrycy glebowej, charakteryzującej się m.in. obecnością kwasów humusowych oraz fluwowych, konieczne było zastosowanie etapu doczyszczania ekstraktu z zastosowaniem SPE [P4]. Skuteczność SPE została oceniona poprzez porównanie odzysków 14 AMs, którymi wzbogacono dwa roztwory – ekstrakt z gleby wolnej od AMs oraz ekstrakt z piasku kwarcowego. Zauważono, że obecność składników matrycowych gleby w ekstrakcie znacząco obniża odzysk AMs na etapie SPE, w porównaniu z ekstraktem z piasku kwarcowego. Zastosowany piasek kwarcowy nie zawierał w składzie materii organicznej, ponieważ została ona usunięta na etapie płukania. Sugerowało to, że składniki matrycy glebowej mogą dezaktywować sorbent OASIS HLB. Problem ten rozwiązano poprzez zastosowanie dodatkowego sorbentu o charakterze anionowym (OASIS WAX), umieszczonego nad sorbentem OASIS HLB. Humusowe składniki matrycy glebowej były zatrzymywane na pierwszym sorbencie, podczas gdy AMs były zatrzymywane na drugim. Na sorbencie OASIS WAX nie zostało zatrzymanych 9 z 14 wybranych AMs. Dalej sprawdzono, czy składniki humusowe mogą zostać wyeluowane z sorbentu OASIS WAX. Potwierdzono, że składniki humusowe nie są desorbowane na etapie elucji, a wymytych zostaje jedynie 5 AMs, które zatrzymały się na sorbencie OASIS WAX. W związku z tym, aby zmaksymalizować odzysk AMs, ostatecznie oba sorbenty zostały poddane elucji, a eluaty połączono [P4]. Tak jak w procedurze ekstrakcji AMs z próbek wód, dostosowano pH próbki oraz rodzaj i objętość rozpuszczalnika eluującego, aby osiągnąć najwyższy odzysk dla wszystkich AMs.

Zaobserwowana zależność pomiędzy składnikami matrycy gleby, a odzyskiem AMs w procedurze ich wydzielenia z użyciem SLE-SPE, była podstawą do sformułowania kolejnej tezy badawczej. **Stwierdzono, że problemy z odtwarzalnością procedur ekstrakcji AMs opisanych w literaturze wynikają głównie z błędnego założenia, że można je traktować jako uniwersalne dla próbek gleb, nie uwzględniając ich charakterystyki (zawartości**



Tabela 12. Parametry poddane modyfikacji etapu SLE w procedurze SLE-SPE dla 14 wybranych AMs, opisanej w Bajkacz et al., 2020 [158]

Lp.	Rozpuszczalnik SLE	Objętość [ml/g] <sub>próbki</sub>	Krotność	Czas pojedynczej ekstrakcji [min]	Odzysk [%]
1	MeOH:ACN:0,1 M EDTA (4:4:3; v/v/v)	10	1	30	0 – 52
2	6% AcA w ACN	10	1	30	0 – 42
3	MeOH:ACN (6:2; v/v)	10	1	30	0 – 54
4	AcA:ACN (6:97; v/v)	10	1	30	0 – 29
5	bufor cytrynianowy (pH=6):MeOH (1:1; v/v)	10	1	30	0 – 72
6	bufor cytrynianowy (pH=6):AcEt (1:6; v/v)	10	1	30	0 – 40
7	2% AcA w MeOH	10	1	30	0 – 91
8	bufor cytrynianowy (pH=4):ACN (1:1; v/v)	10	1	30	14 – 104
9	2% AcA w AcEt:MeOH (1:1 v/v)	10	1	30	0 – 52
10	AcA:MeOH (1:4; v/v)	10	3	20	0 – 50
11	bufor cytrynianowy (pH=3):ACN (1:1; v/v)	10	3	20	0 – 102
12	(1) ACN:H <sub>2</sub> O (8:4; v/v) (2) ACN:H <sub>2</sub> O (8:2; v/v) (3) ACN:H <sub>2</sub> O (9:1; v/v)	6	1	20	0 – 71
13	MeOH:bufor Mcllvaine (pH=4):ACN (30:45:25; v/v/v)	7	3	20	0 – 67
14	bufor Mcllvaine (pH=4): 0,1 M EDTA (6:1; v/v)	7	3	20	0 – 47
15	bufor Mcllvaine (pH=4):ACN (7:3; v/v)	7	3	20	0 – 55
16	bufor Mcllvaine (pH=7):ACN (7:3; v/v)	7	3	20	0 – 72
17	(1) 2% AcA w H <sub>2</sub> O (2) ACN:MeOH (3) 2% AcA w ACN:MeOH (1:1; v/v)	5 – 10	3	20 – 120	0 – 63
18	bufor cytrynianowy (pH=4):ACN (1:1; v/v)	10	3	20	5 – 105
19	bufor cytrynianowy (pH=4):MeOH (1:1; v/v)	10	3	20	5 – 105
20	(1) 2% AcA w ACN (2) ACN	4	3	20	0 – 74
21	(1) bufor Mcllvaine (pH=4):ACN (1:1; v/v) (2) 0,2 M NaOH	10	2	10 – 60	0 – 94
22	(1) bufor cytrynianowy (pH=4):AcEt (1:6; v/v) (2) AcEt	4 – 18	2	10 – 40	0 – 95
23	(1) bufor cytrynianowy (pH=4):ACN (1:6; v/v) (2) 0,2 M NaOH	10	2	10 – 60	0 – 88
24	ACN:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1; v/v)	10	1	60	0 – 41
25	(1) 0,5% FA: ACN (1:1; v/v) (2) ACN:H <sub>2</sub> O (9:1; v/v)	10	2	60	2 – 93
26	bufor cytrynianowy (pH=6):ACN (1:1; v/v)	10	1	60	3 – 102
27	bufor Mcllvaine (pH=7):ACN (1:1; v/v)	10	1	60	2 – 103
28	bufor cytrynianowy (pH=4):ACN (1:1; v/v)	10	1	60	1 – 106
29	(1) bufor cytrynianowy (pH=4):ACN (1:1; v/v) (2) 0,2 M NaOH	10	2	30 – 60	0 – 92

**materii organicznej, minerałów, tekstury).** Głównym celem badań opisanych w P7 było ustalenie, w jaki sposób węgiel organiczny oraz minerały zawarte w glebie, wpływają na odzysk AMs na etapie ich wydzielania i wzbogacania metodą SLE-SPE. W celu redukcji liczby zmiennych skoncentrowano się na jednej grupie leków – SAs – o zbliżonej strukturze

i właściwościach fizykochemicznych. Dobór parametrów ekstrakcji SAs z gleby o średniej zawartości OC przeprowadzono metodą „krok po kroku”, starając się otrzymać jak największy odzysk analitów oddzielnie na każdym etapie SPE i SPE [P7].

Najwyższy odzysk SAs z gleby na etapie SLE otrzymano po zastosowaniu mieszaniny MeOH:ACN:0,1 M EDTA:bufor McIlvaine (pH=4) (30:20:25:25; v/v/v/v), gdy czas mieszania wynosił 60 min. W glebach o dużej zawartości jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  adsorpcja SAs do gleby jest silniejsza, stąd konieczne było zastosowanie czynnika chelatującego w postaci roztworu EDTA. Analogicznie do procedury SPE stosowanej do wydzielenia SAs z próbek ciekłych, również w przypadku próbek gleb najlepszym okazał się sorbent OASIS HLB, z którego anality eluowano mieszaniną 0,1% AcA w MeOH (Tabela 13). Aby dokładnie określić wpływ składników matrycy gleby na potencjalną dezaktywację złoża OASIS HLB i spadek efektywności zatrzymywania SAs, zrezygnowano z tandemowego połączenia z sorbentem OASIS WAX. Niezwykle interesującym okazał się fakt, że jednym z kluczowych etapów wpływających na końcowy odzysk SAs był sposób odparowania eluatu po SPE. Odparowanie ekstraktów z gleby do sucha powodowało adsorpcję SAs na ściankach naczynia oraz ich znaczne straty podczas ponownego rozpuszczania i przenoszenia. Najwyższy odzysk SAs uzyskano odparowując roztwór do objętości 1 ml w strumieniu azotu. Odzysk SAs z gleby o średniej zawartości OC mieścił się w zakresie 31 – 69%.

W celu rozszerzenia zakresu stosowalności opracowanej metody ekstrakcji przeprowadzono analizę wpływu parametrów, takich jak zawartość węgla organicznego, pH oraz zawartość jonów nieorganicznych ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) w glebie na odzysk SAs [P7]. Zawartość  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oraz pH nie miały znaczącego wpływu na efektywność ekstrakcji SAs. Stwierdzono, że obecność jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  może utrudniać desorpcję SAs, ponieważ jony te zwiększają siłę wiązania SAs do gleby. W najwyższym stopniu na odzysk SAs wpływała zawartość OC w glebie. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem zawartości OC w glebie, odzysk SAs znacząco spadał. W celu zapewnienia uniwersalności opracowanej metody SLE-SPE dla gleb o różnej charakterystyce, zakres walidacji metody został rozszerzony. Odzysk analitów określono na 4 poziomach zawartości OC: bardzo niskim ( $<1\%$ ), niskim ( $1\leq\text{OC}\leq 2\%$ ), średnio-niskim ( $2\leq\text{OC}\leq 3\%$ ) i średnio-wysokim ( $3\%\leq\text{OC}$ ). Tak jak przypuszczano, najwyższy odzysk SAs otrzymano, gdy zawartość OC w próbce była  $<1\%$  (81 – 110%). Wraz ze wzrostem OC o 1%, odzysk SAs systematycznie spadał: 42 – 80% ( $1\leq\text{OC}\leq 2\%$ ), 31 – 69% ( $2\leq\text{OC}\leq 3\%$ ) oraz 20 – 50% ( $3\%\leq\text{OC}$ ) [P7]. To potwierdziło teorię, że problem z odtwarzalnością procedur analitycznych wynika głównie z braku informacji o składzie gleby, dla której zostały one opracowane.

Badania nad bioakumulacją i biotransformacją AMs pobranych przez rośliny z gleby oraz wody prowadzono z wykorzystaniem 4 gatunków roślin: pietruszki zwyczajnej (*Petroselinum crispum*) [P5], limnobium rozłogowego (*Limnobium laevigatum*) [P6], rzodkwi japońskiej (*Raphanus sativus var. longipinnatus*) oraz rzęsy wodnej (*Lemna minor L.*) [P8]. Po zebraniu roślin były one osuszane ręcznikiem papierowym z nadmiaru wody, ważone, a następnie poddawane liofilizacji, aby zatrzymać procesy biologiczne w roślinie oraz zapobiec działaniu bakterii gnilnych. W przypadku rzodkwi japońskiej oraz pietruszki zwyczajnej ze względu na

Tabela 13. Procedury przygotowania próbek stałych z użyciem ekstrakcji ciało stałe ciecz (SLE) oraz ekstrakcji do fazy stałej (SPE) przed analizą LC-MS/MS

AMs	Rodzaj próbki	Procedura przygotowania próbki	Odzysk [%]	Publikacja
14 AMs: TC, OTC, DOX, SMX, SFD, CIP, LVF, ENF, MET, TRI, VAN, TYL, CLR, CLD	gleba nawożona obornikiem	<b>SLE:</b> Do 2 g gleby dodano 10 ml mieszaniny buforu Mcllvaine (pH=4):MeOH (1:1; v/v) i wytrząsano przez 30 min z prędkością 900 rpm, a następnie odwirowano z prędkością 8000 rpm przez 10 min. Próbkę ponownie ekstrahowano 10 ml mieszaniny NaOH:aceton (1:1; v/v) przez 20 min lub 10 ml mieszaniny buforu Mcllvaine (pH=4):ACN (1:1; v/v) przez 30 min z prędkością 900 rpm i ponownie odwirowano. Supernatanty połączono, rozcieńczono wodą destylowaną do 500 ml i doprowadzono do pH=3 z użyciem stężonego FA. <b>SPE:</b> Próbkę naniesiono z prędkością 3 ml/min na tandemowo połączone sorbenty OASIS WAX (60 mg, 3 ml) i OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowane kolejno 6 ml MeOH, 6 ml 0,1 M HCl. Sorbenty suszono próżniowo przez 15 min i eluowano 20 ml MeOH. Eluat odparowano do sucha w strumieniu azotu. Bezpośrednio przed analizą próbkę rozpuszczono w mieszaninie 0,1% FA w H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1; v/v) i przefiltrowano przez filtr strzykawkowy NY (0,45 µm, 25 mm).	57 – 95	[P4]
8 SAs: SMX, SFD, SFP, SFM, SFT, SFR, SFH, SFX	gleby o różnej zawartości OC	<b>SLE:</b> Do 1 g gleby dodano 10 ml mieszaniny MeOH:ACN:0,1 M EDTA: bufor Mcllvaine (pH=4) (30:20:25:25; v/v/v/v) i wytrząsano przez 60 min z prędkością 750 rpm, a następnie odwirowano z prędkością 8000 rpm przez 10 min. Ekstrakcję przeprowadzono dwukrotnie, supernatanty połączono, rozcieńczono do 250 ml wodą destylowaną i doprowadzono do pH=4 z użyciem stężonego HCl. <b>SPE:</b> Próbkę naniesiono na sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowany kolejno 6 ml MeOH, 6 ml H <sub>2</sub> O i 6 ml buforu Mcllvaine (pH=4). Następnie, sorbent suszono próżniowo przez 30 min i eluowano 12 ml 0,1% AcA w MeOH. Próbkę odparowano do 1 ml w strumieniu azotu.	20 – 110	[P7]
8 AMs: TC, OTC, DOX, CIP, ENF, LVF, CLD, VAN	liść	<b>SLE:</b> Do 0,5 g liofilizowanego liścia dodano 15 ml mieszaniny buforu Mcllvaine (pH=4):ACN (1:1; v/v) i wytrząsano przez 30 min z prędkością 750 rpm, a następnie odwirowano z prędkością 8000 rpm przez 10 min. Ekstrakcję wykonano dwukrotnie, supernatanty połączono, rozcieńczono do 500 ml wodą destylowaną i doprowadzono do pH=3 z użyciem stężonego HCl. <b>SPE:</b> Próbkę naniesiono z prędkością 3 ml/min na sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowany kolejno 6 ml MeOH, 6 ml 0,1M HCl oraz 6 ml H <sub>2</sub> O. Sorbent suszono próżniowo przez 15 min, a następnie eluowano 10 ml 0,1% FA w MeOH:ACN (2:8; v/v) oraz 10 ml 0,1% NH <sub>3</sub> w MeOH. Eluaty połączono i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Bezpośrednio przed analizą pozostałości rozpuszczono w 1 ml mieszaniny 0,1% FA w H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1; v/v) i odwirowano z prędkością 8000 rpm przez 5 min, a następnie przeniesiono eluat do fiołki chromatograficznej.	46 – 97	[P5]
6 AMs: MET, SMX, SFD, TRI, TYL, CLR		<b>SLE:</b> Do 0,5 g liofilizowanego liścia dodano 10 ml MeOH i wytrząsano z prędkością 750 rpm przez 30 min, a następnie odwirowano z prędkością 8000 rpm przez 10 min. Ekstrakcję wykonano dwukrotnie, supernatanty połączono i odparowano w strumieniu azotu do sucha. Bezpośrednio przed analizą pozostałości rozpuszczono w 1 ml mieszaniny 0,1% FA w H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1; v/v) i odwirowano z prędkością 8000 rpm przez 5 min, a następnie przeniesiono eluat do fiołki chromatograficznej.	55 – 89	
2 AMs: SMX, TRI	roślina	<b>SLE:</b> Do 0,5 g liofilizowanej próbki roślinnej dodano 10 ml MeOH i wytrząsano z prędkością 750 rpm przez 30 min, a następnie odwirowano z prędkością 10000 rpm. Ekstrakcję przeprowadzono dwukrotnie, a supernatanty połączono i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Bezpośrednio przed analizą, pozostałości rozpuszczono w 1 ml mieszaniny 0,1% FA w H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1; v/v).	63 (SMX) 60 (TRI)	[P6]

AMs	Rodzaj próbki	Procedura przygotowania próbki	Odzysk [%]	Publikacja
14 AMs: TC, OTC, DOX, SMX, SFD, CIP, LVF, ENF, MET, TRI, VAN, TYL, CLR, CLD	korzeń	<b>SLE:</b> Do 0,5 g liofilizowanego korzenia dodano 10 ml buforu McIlvaine (pH=4):ACN:0,1M EDTA (2:2:1; v/v/v) i wytrząsano przez 30 min z prędkością 750 rpm. Następnie próbkę odwirowano z prędkością 8000 rpm przez 10 min, supernatant zebrano, rozcieńczono wodą destylowaną do 250 ml i doprowadzono do pH=3 z użyciem stężonego FA. <b>SPE:</b> Próbkę naniesiono z prędkością 3 ml/min na sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowany kolejno 6 ml MeOH, 6 ml 0,1M HCL oraz 6 ml H <sub>2</sub> O. Sorbent suszono próżniowo przez 15 min, a następnie eluowano 6 ml MeOH oraz 4 ml 0,1% AcA w MeOH, eluaty połączone i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Bezpośrednio przed analizą pozostałości rozpuszczono w 1 ml mieszaniny 0,1% FA w H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1; v/v) i odwirowano z prędkością 8000 rpm przez 5 min, a następnie przeniesiono eluat do fiołki chromatograficznej.	45 – 95	[P5]
3 AMS: LVF, ENF, CIP	korzeń	<b>ENF+LVF (SLE):</b> Do 0,2 – 0,5 g liofilizowanej tkanki roślinnej dodano 10 ml MeOH i wytrząsano z prędkością 750 rpm przez 30 min, a następnie odwirowano z prędkością 8000 rpm. Ekstrakcję powtórzono dwukrotnie, a ekstrakty połączone i odparowano do sucha w strumieniu azotu. Bezpośrednio przed analizą próbki rozpuszczono w 1,0 ml 0,1% FA w H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1; v/v) i odwirowano przez 10 min z prędkością 4000 rpm, a następnie supernatant przeniesiono do fiołki chromatograficznej. <b>CIP (SLE+SPE):</b> Do 0,2 – 0,5 g liofilizowanej tkanki roślinnej dodano 15 ml buforu McIlvaine (pH=4):ACN (1:1; v/v) i wytrząsano przez 30 min z prędkością 750 rpm, a następnie odwirowano z prędkością 8000 rpm przez 10 min. Ekstrakcję przeprowadzono dwukrotnie, a następnie supernatanty zebrano i rozcieńczono wodą destylowaną do objętości 500 ml i doprowadzono do pH=3 z użyciem stężonego HCl. Próbkę naniesiono z prędkością 5 ml/min na sorbent OASIS HLB (500 mg, 6 ml) kondycjonowany kolejno 6 ml MeOH, 6 ml H <sub>2</sub> O oraz 6 ml 0,1 M HCl. Następnie, sorbent suszono próżniowo przez 20 min i eluowano 10 ml 0,1% AcA w MeOH oraz 10 ml 0,1% NH <sub>3</sub> w MeOH. Ekstrakty połączone i odparowano w strumieniu azotu do sucha. Bezpośrednio przed analizą pozostałości rozpuszczono w 1,0 ml 0,1% FA w H <sub>2</sub> O:MeOH (1:1; v/v) i odwirowano przez 10 min z prędkością 4000 rpm, a następnie supernatant przeniesiono do fiołki chromatograficznej.	78 – 113	[P8]
	liść		52 – 99	

AcA – kwas octowy, ACN – acetonitryl, CIP – ciprofloksacyna, CLD – klindamycyna, CLR – klarytromycyna, DOX – doksycyklina, ENF – enrofloksacyna, FA – kwas mrówkowy, LVF – lewofloksacyna, MeOH – metanol, MET – metronidazol, NY – nylon, OTC – oksytetracyklina, rpm – obroty na minutę, SFD – sulfadiazyna, SFH – sulfametizol, SFM – ulfametazyna, SFP – sulfapirydyna, SFR – sulfamerazyna, SFT – sulfatiazol, SFX – sulfizoksazol, SMX – sulfametoksazol, TC – tetracyklina, TRI – trimetoprim, TYL – tylozyna, VAN – wankomycyna.

rozwinęty system korzeniowy, możliwe było oddzielenie części zielonej (liści i łodyg) od korzenia przed liofilizacją. Natomiast limnobium rozłogowe oraz rzęsa wodna miały wątle i cienkie układy korzeniowe, dlatego zdecydowano się na liofilizację całych roślin. Ostatecznie w tabeli 13 wyróżniono 3 rodzaje matryc roślinnych (liście, korzenie, roślina), dla których opracowano metody wydzielania wybranych AMs z użyciem SLE lub SLE-SPE.

Na skuteczność ekstrakcji AMs z części zielonych roślin (liście, łodygi) mogą wpływać jej składniki matrycy, takie jak lignina, celuloza, białka, flawonoidy, taniny oraz barwniki roślinne. Natomiast korzenie roślin zawierają znacznie mniej składników matrycowych, które mogą negatywnie wpływać na efektywność ekstrakcji AMs. Wydzielanie AMs z każdej z wymienionych matryc, analogicznie jak w przypadku próbek gleb, przeprowadzono metodami SLE oraz SLE-SPE w dobranych wcześniej optymalnych warunkach ekstrakcji [P5,P6,P8]. W pierwszej kolejności wyznaczono odzysk 14 wybranych AMs z liofilizowanych liści pietruszki metodą SLE z użyciem 11 mieszanin rozpuszczalników organicznych (MeOH,

ACN, aceton, EtOH, bufor McIlvaine (pH=4)) oraz nieorganicznych (0,2 M NaOH), co omówiono szerzej w publikacji **P5**. Do ekstrakcji 14 AMs z liści pietruszki techniką SLE wybrano dwa rozpuszczalniki – MeOH oraz mieszaninę buforu McIlvaine (pH=4) z ACN w stosunku 1:1 (v/v). Stosując dwukrotną SLE liścia pietruszki mieszaniną buforu McIlvaine (pH=4) z ACN, wydzielono wszystkie 14 AMs z odzyskiem w zakresie 66 (CIP) – 96% (OTC) **[P5]**. Ze względu na wysoką zawartość wody w ekstrakcie odparowywanie próbki było czasochłonne, a ponadto wraz ze zmniejszaniem się jej objętości, składniki matrycy powodowały żelowanie próbki. Z tego powodu konieczne było zastosowanie dodatkowego etapu oczyszczania i wzbogacania próbki przy użyciu techniki SPE. Sprawdzono różne sorbenty (OASIS HLB, OASIS MAX, C<sub>18</sub>, OASIS WCX) oraz rozpuszczalniki na etapie elucji (MeOH, 0,1% AcA w MeOH, 2% FA w ACN/MeOH (8:2 v/v) oraz 0,1% NH<sub>3</sub> w MeOH). Ostatecznie zaproponowana metoda wydzielania AMs z liści pietruszki z użyciem SLE-SPE była odpowiednia wyłącznie dla 8 z 14 AMs (TC, OTC, DOX, CIP, ENF, LVF, CLD, VAN), których odzysk był w zakresie 68 – 97% (HQL) **[P5]**. Z tego powodu wydzielenie pozostałych 6 AMs (SMX, SFD, TRI, MET, TYL, CLR) z próbek liści pietruszki przeprowadzono stosując jedynie dwukrotną SLE z użyciem MeOH, bez dodatkowego oczyszczenia przez SPE. Odzysk 6 wymienionych AMs był w zakresie 61 – 89% (HQL), a efekt matrycowy był zaniedbywalny (-4,84 – 6,50), więc nie było konieczności wprowadzania dodatkowego etapu oczyszczania ekstraktów **[P5]**. Omawiana procedura podwójnej SLE z użyciem MeOH okazała się również odpowiednia do wydzielenia SMX oraz TRI z próbek limnobium rozłogowego oraz dwóch FQs (ENF, LVF) z tkanek rzodkwi japońskiej oraz rzęsy wodnej, a ich odzysk wynosił odpowiednio: 63% (SMX), 60% (TRI), 74 – 104% (ENF) oraz 65 – 113% (LVF) **[P6,P8]**. Do ekstrakcji CIP z próbek liści oraz korzeni rzodkwi japońskiej, a także rzęsy wodnej zastosowano zmodyfikowaną procedurę opisaną w **P5**, w której na etapie elucji zastosowano 0,1% AcA w MeOH zamiast mieszaniny 0,1% FA w MeOH:ACN **[P8]**. Biorąc pod uwagę prostszy skład matrycy korzenia pietruszki możliwe było wyekstrahowanie wszystkich 14 AMs za pomocą jednej metody SLE-SPE **[P5]**. Procedura składała się z jednokrotnej SLE z użyciem mieszaniny buforu McIlvaine (pH=4):ACN:0,1M EDTA (2:2:1; v/v/v), a następnie etapu oczyszczania i zatężania ekstraktu na sorbencie OASIS HLB z końcową elucją MeOH oraz 0,1% AcA w MeOH **[P5]**. Szczegółowy opis opracowanych metod ekstrakcji AMs z próbek stałych wraz z ich odzyskiem zestawiono w tabeli 13.

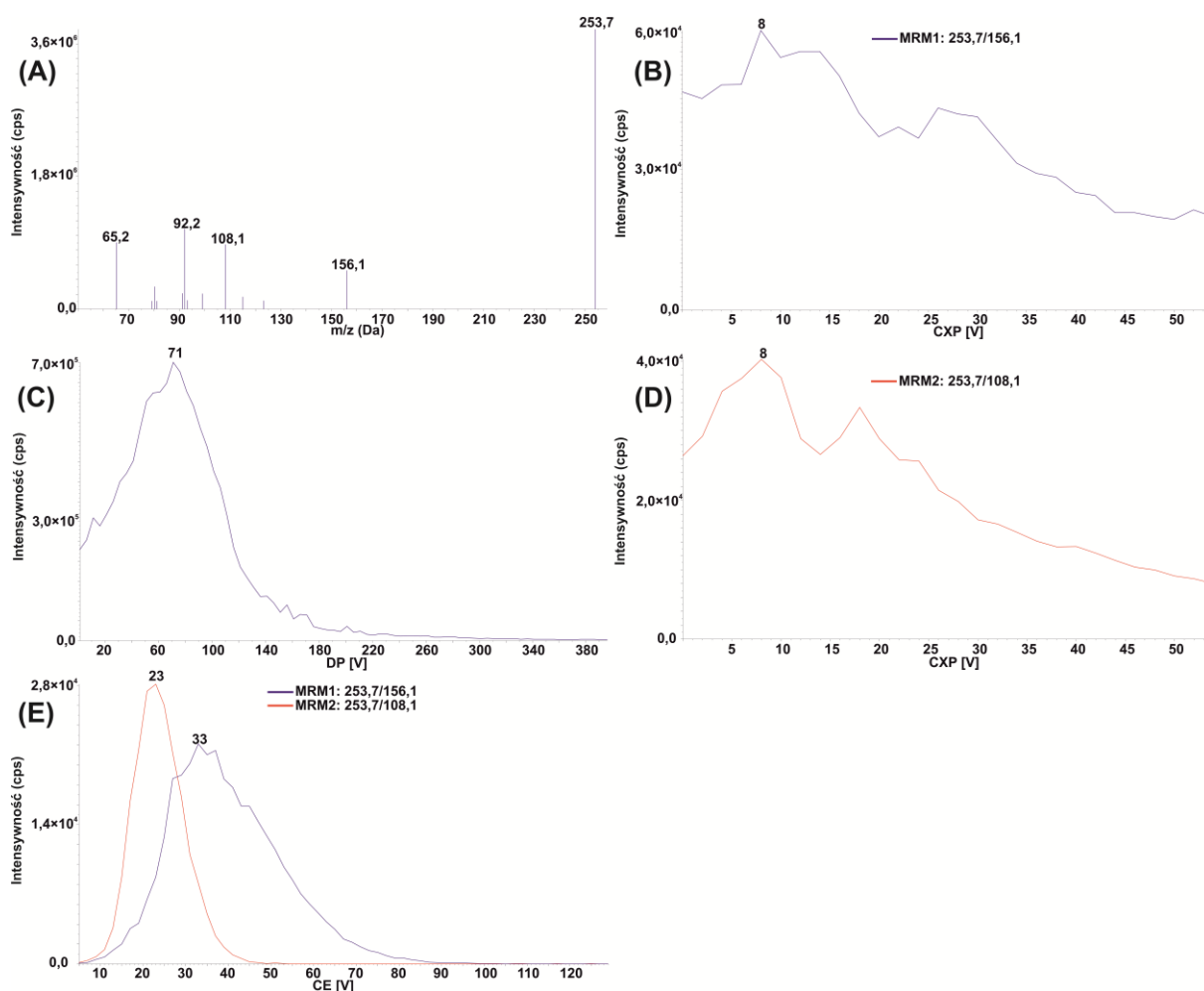
Podsumowując, niska odtwarzalność opisanych w literaturze metod wydzielania AMs ze stałych próbek środowiskowych wynika z założenia, że mogą one być uniwersalne dla danego typu próbki, pomijając jej charakterystykę i właściwości fizykochemiczne. Jak zauważono, składniki matrycowe gleby, takie jak węgiel organiczny oraz niektóre jony metali mogą znacząco wpływać na odzysk AMs. Aby metodę analityczną można było traktować jako uniwersalną, konieczne jest zbadanie, które ze składników matrycowych mogą wpływać na odzysk AMs, a następnie uwzględnienie tych parametrów na etapie walidacji. Najefektywniejsza strategia doboru parametrów metody SLE-SPE polegała na podzieleniu jej na pojedyncze etapy, a następnie zbadaniu oraz optymalizacji odzysków analitów na każdym z nich. Takie podejście umożliwiło identyfikację przyczyny niskiego odzysku AMs w procedurze wydzielania ich z gleb i skróciło czas potrzebny na opracowanie uniwersalnej metody.

### 2.1.3. Dobór parametrów pracy spektrometru mas

Oznaczenie pozostałości wybranych 22 AMs w próbkach środowiskowych przeprowadzono z użyciem LC-MS/MS w trybie pracy MRM [P1–P9]. W ramach rozprawy doktorskiej opracowano dwie metody do oznaczania AMs w próbkach wód, ścieków, gleb oraz tkanek roślinnych, których czas pojedynczej analizy wynosił maksymalnie 10 minut oraz dwie metody oznaczania pojedynczych zanieczyszczeń, których całkowity czas analizy nie przekraczał 2,5 minuty (Tabela 14). Dobór parametrów charakterystycznych dla związków przeprowadzono metodą strzykawkową, stosując roztwory pojedynczych AMs o stężeniu 1 µg/ml. Następnie z użyciem oprogramowania Analyst 1.4 określono optymalne parametry charakterystyczne dla każdego ze związków: dwa przejścia jon prekursorowy – jon produktu o najwyższej intensywności sygnałów oraz odpowiadający im potencjał rozgrupowania klastrów (DP), energię kolizji (CE) oraz potencjał wyjścia z komory zderzeń (CXP) (Rysunek 2). W kolejnym kroku dobrano parametry rozdzielania chromatograficznego, takie jak rodzaj kolumny chromatograficznej, skład fazy ruchomej, rodzaj elucji, temperatura kolumny, natężenie przepływu fazy ruchomej oraz objętość nstrzyku (Tabela 14).

Kolumna Zorbax SB-C3 (150 mm × 3,0 mm, 5 µm) z wypełnieniem triizopropylsilanowym ze względu na stabilność w szerokim zakresie pH (1,8 – 8,0), temperatur (max. 80°C) oraz ciśnień (max. 600 bar) była odpowiednia do rozdzielania chromatograficznego 14 AMs z różnych grup leków [P2–P5]. Natomiast do separacji 8 SAs użyto kolumny Kinetex F5 (100 × 2,1 mm, 1,7 µm) z wypełnieniem pentafluorofenylopropylowym, typu *core-shell* [P1, P7]. Zastosowanie kolumny *core-shell*, w której faza stacjonarna jest nałożona na podłoże w postaci rdzenia (*core*), otoczonego warstwą ochronną (*shell*), pozwoliło na zmniejszenie dyfuzji wewnętrznej oraz skrócenie drogi, jaką muszą pokonać anality. Dzięki temu możliwe było rozdzielanie analitów w krótkim czasie (10 min), przy jednocześnie dobrej rozdzielczości związków o zbliżonych właściwościach fizykochemicznych. W obu metodach w skład fazy ruchomej wchodziły dwa rozpuszczalniki – 0,1% FA w H<sub>2</sub>O oraz ACN. Elucję przeprowadzono gradientowo, stopniowo zwiększając udział procentowy ACN w mieszaninie. FA stosowany jako modyfikator fazy ruchomej umożliwił poprawę rozdzielczości sygnałów (zapobiegał deprotonowaniu analitów w układzie chromatograficznym) oraz wpływał na ich czas retencji, poprzez tworzenie wiązań wodorowych z polarnymi cząsteczkami. Przykładowe chromatogramy uzyskane z użyciem LC-MS/MS w trybie MRM dla 14 AMs oraz 8 SAs przedstawiono na rysunku 3. Rozdzielanie pojedynczych analitów (SMX, TRI, CIP, ENF, LVF) przeprowadzono w układach izokratycznych, również stosując jako rozpuszczalniki 0,1% FA w H<sub>2</sub>O oraz ACN. Zastosowano kolumny chromatograficzne o mniejszej długości (75 mm), co umożliwiło zmniejszenie zużycia rozpuszczalników oraz skrócenie czasu pojedynczej analizy do 2,4 min dla SMX i TRI oraz <1 min w przypadku FQs [P6, P8, P9]. Parametry, takie jak temperatura kolumny, objętość nstrzyku oraz prędkość przepływu fazy ruchomej, zostały dobrane zgodnie z zaleceniami producentów, tak aby uzyskać jak najlepszą intensywność oraz rozdzielczość sygnałów poszczególnych analitów. Optymalizację parametrów źródła jonów wykonano za pomocą analizy przepływowo-strzykawkowej (FIA; *ang. flow injection analysis*), w której przygotowany roztwór wzorców AMs w rozpuszczalniku o określonym składzie (MeOH, 0,1% AcA w MeOH, 0,1% FA w H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1; v/v)) wprowadzono bezpośrednio do

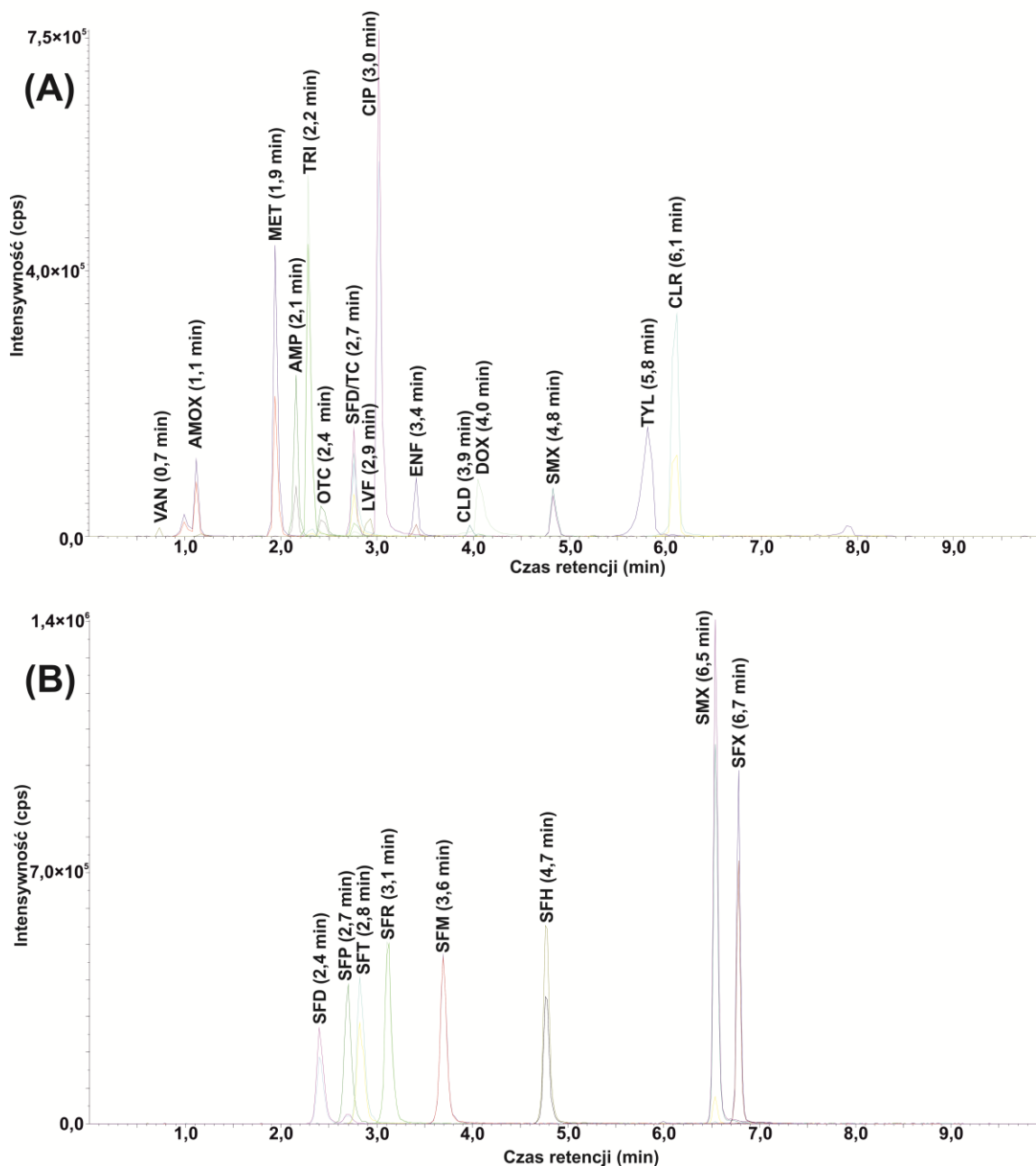
fazy ruchomej o początkowym składzie, pomijając kolumnę chromatograficzną. W ten sposób dobrano następujące parametry źródła jonów: ciśnienie gazu kurtynowego (CUR), temperatura (TEM), ciśnienie gazu rozpraszającego (GS1), ciśnienie gazu osuszającego (GS2), ciśnienie gazu w komorze kolizyjnej (CAD) i napięcie źródła jonów (IS). Ich wartości zostały dobrane w taki sposób, aby osiągnąć maksymalną intensywność sygnałów dla większości AMs obecnych w badanej mieszaninie. Aby poznać możliwości i ograniczenia opracowanych metod pomiarowych, przeprowadzono testy walidacyjne. Walidacja metody analitycznej obejmowała wyznaczenie parametrów takich jak: dokładność, precyzja, selektywność, liniowość, efekt matrycowy, granica wykrywalności (LOD), granica oznaczalności (LOQ) oraz odzysk.



Rysunek 2. Dobór parametrów charakterystycznych dla analitu metodą strzykawkową na przykładzie SMX; (A) widmo fragmentacyjne SMX, wykresy intensywności w funkcji (B, D) CXP, (C) DP oraz (E) CE dla dwóch przejść jon prekursora ( $m/z$  253,7) – jon produktu ( $m/z$  156,1 oraz  $m/z$  108,1).

W tabeli 14 zestawiono parametry walidacyjne opracowanych metod analitycznych, natomiast szczegółowe informacje znajdują w publikacjach **P1 – P9**. Krzywa wzorcowa opracowana jako zależność pola powierzchni pod pikiem analitu od jego stężenia posłużyła do wyznaczenia liniowości oraz LOD i LOQ metody. Stosując metodę regresji liniowej wyznaczono współczynniki determinacji ( $R^2$ ) i określono dopasowanie modelu. Otrzymane wartości  $R^2$  były  $>0,9$ , stąd metody uznano za liniowe w badanym zakresie pomiarowym. Jako

LOQ przyjęto najniższy punkt na krzywej wzorcowej, natomiast LOD obliczono zgodnie z równaniem  $LOQ = 3LOD$ . Dokładność, precyzja oraz odzysk zostały wyznaczone na trzech poziomach stężeń z zastosowaniem ekstraktów matrycy wzbogaconej roztworem wzorca na niskim (LQC), średnim (MQC) oraz wysokim (HQC) poziomie stężeń. Analizy próbek były



Rysunek 3. Chromatogram roztworu wzorcowego (A) 14 AMs (CIP, ENF, LVF, SMX, SFD, TRI, CLD, CLR, MET, TYL, TC, OTC, DOX, VAN) oraz (B) 8 SAs (SMX, SFD, SFP, SFM, SFT, SFR, SFH, SFX) uzyskanych z użyciem LC-MS/MS w trybie jonizacji dodatniej (ESI+).



Tabela 14. Opracowane oraz zwalidowane procedury do oznaczania AMs w próbkach ciekłych oraz stałych z użyciem LC-MS/MS

AMs	Matryca	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	LOD/LOQ	Liniiowość (R <sup>2</sup> )	CV [%]	RE [%]	ME [%]	Publikacja
8 SAs: SMX, SFD, SFP, SFM, SFT, SFR, SFH, SFX	woda powierzchniowa	Kinetex F5 (100 × 2,1 mm, 1,7 μm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O B: ACN <b>Natężenie przepływu:</b> 0,3 ml/min	LOD: 0,03 – 0,27 ng/l LOQ: 0,1– 0,8 ng/l	0,9953 – 0,9984	1,4 – 7,3	-9,1 – 5,8	0,5 – 12,4	[P1]
	gleba			LOD: 0,3 ng/g LOQ: 1,0 ng/g	0,9890 – 0,9959	0,3 – 15,0	-31,0 – 30,0	-6,4 – 36,0	[P7]
16 AMs: AMOX, AMP, TC, OTC, DOX, SMX, SFD, CIP, LVF, ENF, MET, TRI, VAN, TYL, CLR, CLD	ścieki, woda powierzchniowa, woda gruntowa	Zorbax SB-C3 (150 × 3,0 mm, 5 μm)	<b>Elucja gradientowa:</b> A: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O B: ACN <b>Natężenie przepływu:</b> 1,0 ml/min	LOD: 0,1 – 0,3 ng/l LOQ: 0,2 – 1,0 ng/l	0,9946 – 0,9998	1,5 – 7,5	-7,8 – 7,3	1,5 – 11,2	[P2,P3]
	gleba			LOD: 0,2 ng/g LOQ: 0,5 ng/g	0,9946 – 0,9997	1,1 – 7,8	-6,3 – 6,3	2,9 – 10,3	[P4]
	tkanki roślinne			LOD: 0,3 – 1,6 ng/g LOQ: 0,3 – 1,6 ng/g	0,9858 – 0,9988	1,2 – 9,6	0,4 – 11,4	-11,3 – 11,3	[P5]
SMX, TRI	woda	Kinetex Core-Shell C18 (75 × 2,1 mm, 2,6 μm)	<b>Elucja izokratyczna:</b> A: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O B: ACN A:B (80:20; v/v) <b>Natężenie przepływu:</b> 0,6 ml/min	LOD: 0,4 – 7,0 ng/l LOQ: 1,3 – 10 ng/l	0,9992 – 0,9998	3,5 – 7,4	-6,5 – 6,4	1,5 – 7,8	[P6]
	tkanki roślinne			LOD: 0,3 ng/g LOQ: 1,0 ng/g	0,9953 – 0,9970	4,30 – 7,04	1,1 – 3,6	-4,0 – 5,3	
CIP, ENF, LVF	woda	Kinetex F5 (75 × 2,1 mm, 2,6 μm)	<b>Elucja izokratyczna:</b> A: 0,1% FA w H <sub>2</sub> O B: ACN A:B (85:15; v/v) <b>Natężenie przepływu:</b> 0,6 ml/min	LOD: 0,3 ng/l LOQ: 1,0 ng/l	0,9993 – 0,9998	1,2 – 8,0	1,3 – 6,5	-4,3 – 1,6	[P8,P9]
	tkanki roślinne			LOD <sub>liść</sub> : 0,6 ng/g LOD <sub>korzeń</sub> : 1,6 ng/g LOQ <sub>liść</sub> : 2,0 ng/g LOQ <sub>korzeń</sub> : 5,0 ng/g	0,9985 – 0,9998	0,1 – 6,2	1,1 – 10,1	-11,7 – 10,5	

ACN – acetonitryl, AMOX – amoksycylina, AMP – ampicylina, CIP – ciprofloksacyna, CLD – klindamycyna, CLR – klarytromycyna, CV – współczynnik zmienności, DOX – doksycyklina, ENF – enrofloksacyna, LOD – granica wykrywalności, LOQ – granica oznaczalności, LVF – lewofloksacyna, ME – efekt matrycowy, MeOH – metanol, MET – metronidazol, OTC – oksytetracyklina, RE – błąd względny, SFD – sulfadiazyna, SFH – sulfametizol, SFM – sulfametazyna, SFP – sulfapyrydyna, SFR – sulfamerazyna, SFT – sulfatiazol, SFX – sulfizoksazol, SMX – sulfametoksazol, TC – tetracyklina, TRI – trimetoprim, TYL – tylozyna, VAN – wankomycyna.

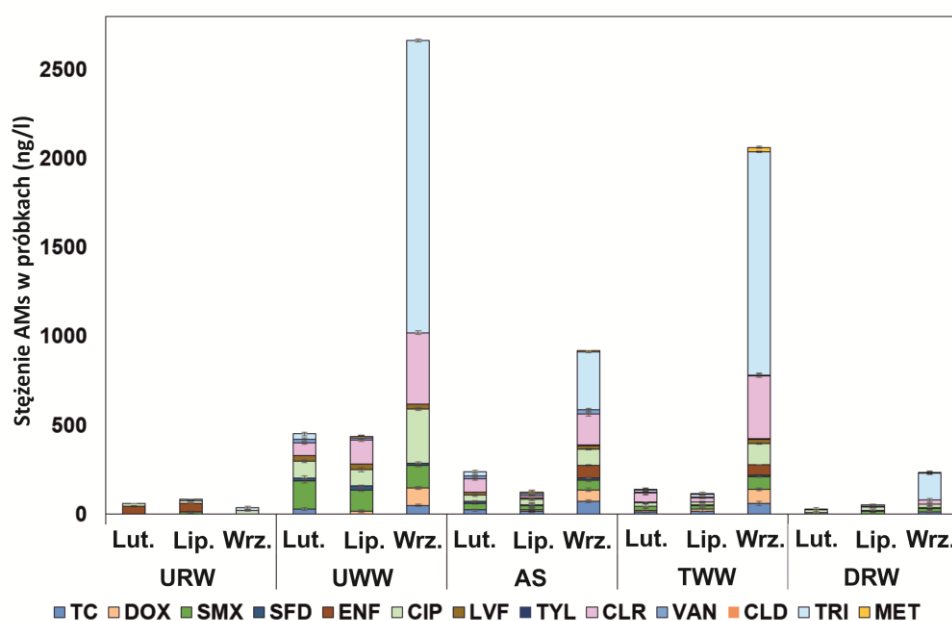
przeprowadzone w trzech równoległych powtórzeniach oraz w trzech nastrzykach (9 niezależnych pomiarów). Dokładność metody została wyrażona poprzez błąd względny (RE), a precyzja jako współczynnik zmienności (CV). Efekt matrycowy obliczono jako stosunek pola powierzchni sygnału analitu w ekstrakcie z matrycy do sygnału tego analitu w czystym rozpuszczalniku. Selektywność metody została osiągnięta poprzez zastosowanie trybu MRM, który umożliwiał monitorowanie konkretnych przejść jon prekursora – jon produktu, co zminimalizowało wpływ interferentów. Porównano również chromatogramy ekstraktów z matrycy próbek środowiskowych przed i po wzbogaceniu analitami, aby wykluczyć obecność sygnałów tła, niezwiązanych bezpośrednio z sygnałem analitu. W celu wyznaczenia odzysku wzbogacono modelowe próbki wód, ścieków, gleb oraz tkanek roślinnych mieszaniną AMs o określonym stężeniu, a następnie ekstrahowano zgodnie z procedurami omówionymi w tabelach 12 oraz 13. Odzysk określono jako stosunek pola powierzchni wybranego analitu w próbce po ekstrakcji do jego pola powierzchni w roztworze wzorca. Ostatecznie stwierdzono, że metody analityczne opracowane w ramach rozprawy doktorskiej są odpowiednie do analizy próbek środowiskowych. Otrzymane parametry walidacyjne były porównywalne z wartościami podawanymi w literaturze (1.5 Metody analityczne wykorzystywane w oznaczaniu środków bakteriobójczych w próbkach środowiskowych; Tabele 8 – 10).

## **2.2. Środki bakteriobójcze w środowisku wodnym: metody analityczne w identyfikacji źródeł ich wprowadzania oraz rozpowszechnienia**

Głównymi źródłami wprowadzania AMs do środowiska wodnego są WWTPs, których technologie bazujące na mikrobiologicznym usuwaniu zanieczyszczeń organicznych nie są skuteczne wobec mikrozanieczyszczeń farmaceutycznych. Skuteczność usuwania AMs ze ścieków nie zależy wyłącznie od metody ich oczyszczania, ale również od składu doprowadzanych ścieków, który jest zmienny w zależności od umiejscowienia WWTPs, pory roku oraz regionalnych potrzeb zdrowotnych [22,159]. **Celem pierwszego z badań była ocena efektywności usuwania 14 wybranych AMs w procesie oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego oraz identyfikacja ich TP.** Próbki ścieków oraz wody rzecznej pobierano w okresie od lutego do września 2019 roku [P2]. Do analizy AMs oraz ich TPz zastosowano LC-MS/MS w różnych trybach pracy spektrometru mas, co omówiono szczegółowo w rozdziale 2.1. Skuteczność usuwania AMs oraz tworzenia TPz monitorowano na trzech etapach oczyszczania ścieków (UWW, ścieki z bioreaktora (AS), TWW) oraz w wodzie rzecznej w próbkach pobranych przed oraz za miejscem odprowadzania TWW. Próbki ścieków pochodziły z oczyszczalni ścieków „Łyna” położonej w województwie warmińsko-mazurskim. Odbiera ona głównie ścieki bytowe oraz te pochodzące z przemysłu spożywczego, meblarskiego i chemicznego, a około 2% stanowiły ścieki pochodzące ze szpitali.

Na rysunku 4 przedstawiono zmiany stężenia wybranych AMs w próbkach ścieków na różnych etapach oczyszczania pobranych w okresie wczesnowiosennym (luty), letnim (lipiec)

oraz jesiennym (wrzesień). Spośród 16 wybranych AMs w UWW oraz wodzie rzecznej wykryto jedynie 13 z nich. Najwyższe stężenia AMs wykryto w próbkach UWW pobranych we wrześniu (11,4 – 1643,7 ng/l), natomiast niższe w próbkach pobranych w lipcu (2,4 – 163,1 ng/l) oraz lutym (1,4 – 160,2 ng/l). Na zwiększoną zawartość AMs w UWW w okresie jesiennym mogły mieć wpływ dwa czynniki – zwiększona zapadalność na choroby o podłożu bakteryjnym oraz mała ilość opadów atmosferycznych wpływająca na rozcieńczenie doprowadzanych do WWTP nieczystości. Obserwowana tendencja wzrostowa zawartości AMs w ściekach pokrywa się z danymi dotyczącymi sezonowej zmienności spożycia AMs w Polsce, gdzie w pierwszym i czwartym kwartale roku kalendarzowego zapotrzebowanie na farmaceutyki znacząco wzrasta. Należy jednak zauważyć, że wahania sezonowe stężenia AMs w UWW dotyczyły takich klas leków jak TCs, FQs i MQs. Natomiast, stężenie SAs (SMX i SFD) w UWW było na podobnym poziomie, co może sugerować, że jest na nie stałe zapotrzebowanie [P2].



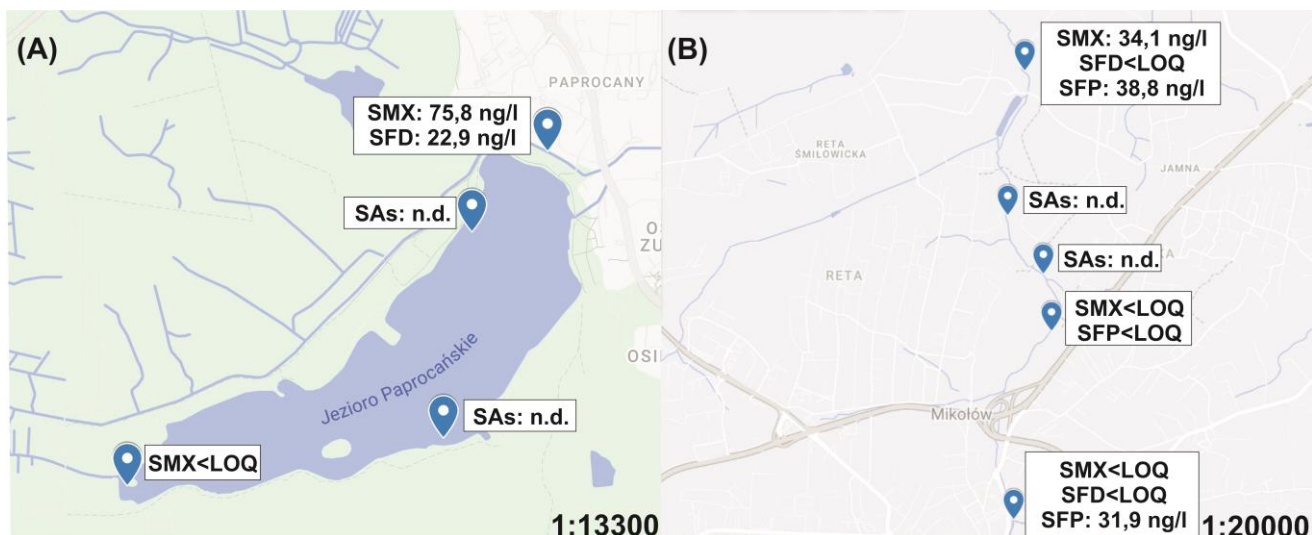
Rysunek 4. Stężenie wybranych AMs w próbkach ścieków zebranych na różnych etapach oczyszczania oraz wody rzecznej (URW – woda rzeczna przed punktem zrzutu ścieków, UWW – ścieki nieoczyszczone, AS – ścieki z bioreaktora, TWW – ścieki oczyszczone, DRW – woda rzeczna za punktem zrzutu ścieków) [P2]. © 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

Na skuteczność oczyszczania ścieków z użyciem osadu czynnego wpływa tempo metabolizmu mikroorganizmów, proces adsorpcji/desorpcji wybranego zanieczyszczenia oraz początkowy skład doprowadzonych UWW. Zauważono, że niezależnie od rodzaju AMs im wyższe było ich początkowe stężenie w UWW, tym wyższe stężenie pozostawało w TWW. Można to zaobserwować na przykładzie CIP, dla której skuteczność usuwania w zależności od pory roku wahała się od 60 (wrzesień) – 82% (lipiec), a jej stężenie w TWW było odpowiednio w zakresie 16,1 – 120,1 ng/l. Metoda oczyszczania ścieków za pomocą osadu czynnego była nieskuteczna w usuwaniu pozostałości MQs. Stężenie TYL w procesie oczyszczania ścieków nie zmieniało się znacząco, natomiast skuteczność usuwania CLR w lutym, lipcu i wrześniu wynosiła odpowiednio 25%, 82% i 11%. Udowodniono, że WWTP jest głównym źródłem wprowadzania do środowiska wodnego MET oraz TRI, ponieważ w próbkach wody rzecznej przed zrzutem ścieków nie zostały one wykryte, natomiast po zrzucie TWW ich stężenie

w wodzie rzecznej było w zakresie 2,2 – 149,5 ng/l [P2]. Niezależnie od pory roku w próbkach wody rzecznej pobranej za punktem zrzutu TWW wykryto SMX i SFD w zakresach stężeń odpowiednio: 8,1 – 19,2 ng/l oraz 2,5 – 3,7 ng/l. Sugeruje to, że SAs są stabilne w środowisku wodnym oraz mają potencjał do akumulacji, pomimo rozcieńczenia, jakie następuje po wprowadzeniu TWW do rzeki. TPs wybranych AMs były obecne we wszystkich rodzajach próbek ścieków. Były one zarówno doprowadzane z UWW, jak i powstawały bezpośrednio w procesie oczyszczania ścieków. Szczegółowe informacje dotyczące TPs oraz ich ścieżek transformacji zawarto w rozdziale 2.5. **Ze względu na zdolność SAs do bioakumulacji i migracji po wprowadzeniu do środowiska wodnego, przeprowadzono badania przesiewowe mające na celu określenie stopnia ich rozpowszechnienia w zbiornikach wodnych oraz rzekach [P1].**

Głównym celem badań była ocena rozproszenia 8 wybranych SAs (SMX, SFD, SFP, SFM, SFT, SFR, SFH, SFX) w wodach powierzchniowych na terenie silnie zurbanizowanego województwa śląskiego [P1]. Tak jak w przypadku próbek ścieków, wykonano badania przesiewowe w celu identyfikacji TPs wybranych SAs obecnych w próbkach wód powierzchniowych. Decyzja o wyborze lokalizacji oraz miejsca poboru próbek została podjęta na podstawie następujących parametrów: przeznaczenie zbiornika (rekreacja, ekoturystyka, kontrola powodzi), długość czasu retencji wody oraz umiejscowienie punktowych źródeł zanieczyszczeń, które wpływają na zwiększone prawdopodobieństwo akumulacji SAs. Do badań wybrano sztuczne zbiorniki wodne na terenie Sosnowca (Jezioro Stawiki), Katowic (Jezioro Borki) oraz Tychów (Jezioro Paprocany), potok Jamna przepływający przez centrum oraz tereny wiejskie Mikołowa oraz ujście wody pitnej w miejscowości Psary. Wszystkie próbki wód powierzchniowych pobierano wczesną wiosną (marzec 2020), kiedy średnia temperatura powietrza wynosiła 4,5°C. W zależności od wielkości zbiornika ustalono od 1 do 6 punktów poboru, z których pobrano 3 równoległe próbki wody. Probki przygotowano z zastosowaniem SPE, a oznaczenie wykonano z zastosowaniem metody LC-MS/MS opisanej szczegółowo w rozdziale 2.1.

Pozostałości SMX, SFD oraz SFP wykryto w próbkach pobranych z dwóch miejscowości – Tychów oraz Mikołowa. W zależności od umiejscowienia punktu poboru próbki stężenia SAs były od <LOQ (<0,1 ng/l) do maksymalnie 75,8 ng/l (Rysunek 5A). Najczęściej wykrywano SMX, który był obecny w 2 z 4 punktów poboru z Jeziora Paprocany oraz w 3 z 6 punktów poboru na obszarze potoku Jamna. Na rozproszenie SAs w zbiorniku wodnym mają wpływ zarówno czynniki hydrologiczne (czas retencji hydraulicznej, wymiary jeziora), jak również pora roku, właściwości fizykochemiczne związku (zdolność do adsorpcji, stabilność) i szybkość ich degradacji w warunkach środowiskowych. Najwyższe stężenia SMX (75,8 ng/l) oraz SFP (22,9 ng/l) oznaczono w próbkach wody pobranych z dopływu rzeki Gostynia do Jeziora



Rysunek 5. Mapa jeziora Paprocany (A) oraz potoku Jamna (B) z naniesionymi punktami poboru próbek.

Paprocany, gdzie głębokość oraz szerokość zbiornika była najmniejsza. Punkty poboru wody rozmieszczone na terenie potoku Jamna odzwierciedlały różny profil działalności człowieka i gospodarowania odpadami ciekłymi. Najwyższe stężenia SMX (34,1 ng/l), SFP (38,8 ng/l) oraz SFD (<0,1 ng/l) oznaczono w punkcie poboru umiejscowionym na terenie wiejskim. Wszystkie 3 SAs oznaczono również w próbce wody pobranej na terenie miejskim, jednakże ich stężenie było niższe niż w próbce z terenu wiejskiego (Rysunek 5B). Różnice te można tłumaczyć częściowym brakiem dostępu do kanalizacji miejskiej na terenach wiejskich oraz spływami z pól rolnych nawożonych nawozami odzwierzęcymi. Pomimo podobnego profilu aktywności człowieka oraz turystycznego przeznaczenia jezior Borki oraz Stawiki zlokalizowanych na terenie miast Sosnowiec oraz Katowic, nie wykryto w nich pozostałości SAs. Woda pitna pobrana z miejscowości Psary również nie była zanieczyszczona SAs. Brak zanieczyszczeń wód powierzchniowych przez SAs może być efektem dwóch czynników: działań rekultywacyjnych oraz ich degradacji po wprowadzeniu do środowiska na skutek czynników biotycznych i abiotycznych. Pomimo braku SAs w próbkach wody z obu jezior oraz w wodzie pitnej, wykryto w nich TPs SMX oraz SFD. Można przypuszczać, że długi czas retencji hydraulicznej sprzyja biodegradacji oraz akumulacji TPs leków z grupy SAs w środowisku.

Podsumowując, w ramach przeprowadzonych badań wykazano, że obecnie stosowane metody oczyszczania ścieków oparte na przemianach mikrobiologicznych są niewystarczające do kompletnego usunięcia AMs doprowadzonych do WWTP. Efektywność usuwania AMs ze ścieków zależy od składu doprowadzanych UWW (rodzaj i stężenie zanieczyszczeń, pH, stężenie składników biogennych (azot, fosfor), pory roku (temperatury, ilości opadów) oraz zastosowanych parametrów procesu (hydrauliczny czas zatrzymania, stężenie osadu czynnego, stężenie rozpuszczonego tlenu). Potwierdzono, że TWW są głównym źródłem wprowadzania pozostałości AMs do środowiska wodnego. W procesie oczyszczania ścieków z użyciem osadu czynnego nie dochodzi do pełnej mineralizacji AMs. W wyniku przekształceń mikrobiologicznych powstają ich różnorodne TPs, które są stabilne w stosowanych warunkach procesowych, a przez to obecne również w TWW. Zauważono, że w trakcie roku SAs (SMX, SFD) są systematycznie wprowadzane do środowiska wodnego

wraz z TWW, co sugeruje, że popyt na leki zawierające te substancje aktywne jest stały. Dodatkowo przeprowadzono badania przesiewowe wód powierzchniowych na terenie województwa śląskiego pod kątem ich obecności i rozproszenia. Pozostałości SMX, SFD oraz SFP zostały wykryte w 2 spośród 5 badanych zbiorników wodnych. TPAs SAAs były obecne w próbkach wody pobranej ze wszystkich zbiorników, co potwierdza, że SAAs są powszechnym zanieczyszczeniem wód, a w środowisku ulegają one transformacjom, przez co mogą nie być wykrywane w tradycyjnych metodach analitycznych, opartych na analizie celowanej.

### **2.3. Losy środków bakteriobójczych w glebie – metody analityczne w ocenie ich mobilności oraz dostępności dla roślin**

Pomimo dobrej znajomości źródeł wprowadzania AMs do gleby (rozdział 1.1.), ich losy po wprowadzeniu, mobilność, zdolność do akumulacji oraz biodostępność stanowią zagadnienie, które pozostaje w dużej mierze niewyjaśnione. **Kolejnym celem badań była ocena mobilności, stabilności oraz biodostępności 4 AMs weterynaryjnych (DOX, ENF, SMX, TYL) po wprowadzeniu ich do rolniczego ekosystemu hydrogeologicznego, w którego skład wchodziły wody gruntowe, gleby oraz rośliny uprawne [P4,P5].** Doświadczenie przeprowadzono w warunkach środowiskowych, na polach rolniczych o powierzchni 4 m<sup>2</sup>, które nawożono jednym z dwóch rodzajów obornika zwierzęcego (drobiowy lub bydłowy), a następnie wysiano nasiona pietruszki zwyczajnej. Obornik zwierzęcy stosowany w badaniach nie zawierał żadnego z **4 wybranych AMs (DOX, ENF, SMX, TYL)**, stąd został on wzbogacony nimi bezpośrednio przed nawożeniem (50 mg AMs na 1 kg obornika). Badania terenowe były prowadzone od maja do września 2019 roku, czyli w okresie aktywnej wegetacji roślin w Polsce. Do oznaczenia AMs w próbkach wód, gleb oraz w tkankach roślinnych zastosowano metodę LC-MS/MS **[P4,P5]**. W próbkach oprócz 4 AMs, którymi wzbogacono obornik oznaczano dodatkowo 10 AMs (TC, OTC, CIP, LVF, MET, CLR, TRI, CLD, VAN, SFD), co umożliwiło pozyskanie informacji o rozpowszechnieniu i zdolności do akumulacji szerszej grupy związków w środowisku.

W wodzie gruntowej pobranej **przed nawożeniem obornikiem wzbogaconym mieszaniną 4 AMs (DOX, ENF, SMX, TYL)** wykryto śladowe ilości SMX (13,2 – 90,8 ng/l) oraz CIP (18,7 – 99,6 ng/l) będącej metabolitem ENF, pomimo, że pola uprawne wykorzystane w badaniach terenowych nie były nigdy nawożone nawozami organicznymi (obornik, gnojowica). W oborniku drobiowym również wykryto pozostałości CIP (30,03 ng/g), natomiast obornik bydłowy nie był zanieczyszczony żadnymi AMs **[P4]**. W próbkach gleby pobranych przed nawożeniem obornikiem nie wykryto żadnego z 4 wybranych AMs, natomiast była w niej obecna CIP, której stężenie utrzymywało się na stałym poziomie przez cały czas trwania eksperymentu. Glebę nawożono zgodnie z wytycznymi producentów nawozów, odpowiednio 4 kg/m<sup>2</sup> obornika bydłowego oraz 1,5 kg/m<sup>2</sup> obornika drobiowego. Stąd też początkowe stężenie AMs w glebach nawożonych obornikiem bydłowym było wyższe (10,0 – 73,4 ng/g<sub>DW</sub>) w porównaniu do gleb nawożonych obornikiem drobiowym (17,5 – 109,1 ng/g<sub>DW</sub>) **[P4]**. Stosowanie nawozów na bazie obornika zwiększa zawartość węgla organicznego w glebie, co powoduje zmianę jej właściwości sorpcyjnych. Ubytek DOX, TYL oraz SMX w miarę upływu

czasu był znacznie wyższy w glebach nawożonych obornikiem bydlęcym (60 – 93%), w porównaniu do gleb nawożonych obornikiem drobiowym (21 – 81%). Niezależnie od zastosowanego nawozu stężenie ENF w glebie utrzymywało się na stałym poziomie. W trakcie badań w wodach gruntowych zebranych po 133 dniach eksperymentu nie wykryto DOX, TYL i ENF. Na tej podstawie stwierdzono, że ich ubytek w glebie nie był związany z wymywaniem przez deszcze, a najprawdopodobniej z pobieraniem przez rośliny oraz procesami degradacji. Wyłącznie zmiany stężenia SMX w glebie można powiązać z wymywaniem go przez opady, ponieważ pod koniec eksperymentu nie wykryto SMX w wodzie gruntowej zebranej na głębokości 30 cm, natomiast był obecny na głębokościach od 60 do 120 cm [P4].

Zarówno w próbkach wód gruntowych, jak i gleb wykryto AMs, których **nie wprowadzono do gleby wraz z obornikiem**. W wodzie gruntowej pobranej przed nawożeniem obornikiem wykryto 6 AMs (OTC, TRI, SFD, CLR, CLD, MET), a ich rozmieszczenie w profilu gleby na głębokości w zakresie 30 – 120 cm było losowe. Można to tłumaczyć naturalną migracją AMs w glebie, spowodowaną sptywami z sąsiadujących pól rolnych nawożonych zanieczyszczonym obornikiem, bądź gnojowicą. Spośród 6 wymienionych AMs najpowszechniej wykrywanym zanieczyszczeniem był MET (25 z 40 próbek), którego stężenie w wodzie gruntowej przed rozpoczęciem eksperymentu mieściło się w zakresie od 0,4 do 11,5 ng/l, natomiast po jego zakończeniu w 133 dniu wynosiło od 0,2 do 31,6 ng/l [P4]. Ponadto był on obecny w próbkach wód pobranych na wszystkich głębokościach profilu glebowego, co świadczy o jego dobrej rozpuszczalności, mobilności oraz stabilności po wprowadzeniu do środowiska. W próbkach gleb pobranych przed wprowadzeniem obornika zwierzęcego wykryto śladowe ilości (2,4 – 12,1 ng/g<sub>DW</sub>) OTC, CLR oraz SFD i tak jak w przypadku próbek wód gruntowych ich rozmieszczenie było losowe [P4]. Pomimo wykrycia dodatkowych AMs w próbkach gleby oraz wód gruntowych, ich stężenia są zbyt niskie, aby umożliwić dokładne śledzenie ich losów w środowisku.

Po 133 dniach wegetacji zebrano dojrzałą pietruszkę, a następnie oddzielono korzeń rośliny od liści w celu określenia dystrybucji AMs w poszczególnych tkankach rośliny [P5]. W tkankach roślin wykryto wyłącznie te, które zostały wprowadzone ze wzbogaconym obornikiem, pomimo iż w glebie oraz wodzie gruntowej było obecnych łącznie 11 AMs. Obecność DOX, TYL, SMX oraz ENF w tkankach roślinnych wynika z ich wyższego stężenia w glebie w porównaniu do pozostałych AMs oraz równomiernego rozproszenia. W liofilizowanych tkankach roślinnych na najwyższym poziomie stężeń oznaczono ENF (13,4 – 29,3 ng/g<sub>DW</sub>), następnie DOX (2,1 – 14,0 ng/g<sub>DW</sub>) oraz SMX (2,3 – 6,8 ng/g<sub>DW</sub>), natomiast stężenie TYL było niższe niż 1,0 ng/g<sub>DW</sub> [P5]. Zdolność pietruszki do pobierania AMs z gleby oraz ich akumulowania zależała od ich rodzaju oraz formy jonowej. ENF w przeważającym stopniu akumulowała się w liściach pietruszki, w przeciwieństwie do DOX, która była obecna głównie w korzeniach. W przypadku SMX oraz TYL nie stwierdzono specyficznej tendencji do gromadzenia się w określonym organie rośliny. Wykazano, że rośliny mają zdolność do pobierania AMs z gleby oraz ich akumulowania, co ma zarówno pozytywne, jak i negatywne konsekwencje. Zdolność do pobierania AMs przez rośliny może być wykorzystana jako jedna z alternatywnych metod oczyszczania środowiska. Natomiast jeśli zostaną one pochłonięte przez roślinę jadalną, to istnieje ryzyko przeniesienia ich do łańcucha pokarmowego człowieka.

Kluczowe wnioski z badań **P4** oraz **P5** tj. (I) skład matrycy gleby (a zwłaszcza zawartość OC) ma istotny wpływ na mobilność AMs w środowisku, (II) pozostałości AMs są systematycznie wprowadzane do środowiska i mogą się w nim utrzymywać przez długi czas oraz (III) rośliny mają potencjał do oczyszczania środowiska z pozostałości AMs, jednakże istotne jest odpowiednie dobranie gatunku rośliny, który wykaże największą bioprzyswajalność wobec AMs, stanowiły podstawę do sformułowania koncepcji kolejnych badań [**P6,P7,P8**].

**Przeprowadzono monitoring środowiska glebowego na terenie województwa Śląskiego, którego celem było zbadanie zanieczyszczenia pozostałościami 8 wybranych SAs (SMX, SFD, SFM, SFP, SFT, SFR, SFH, SFX) [P7].** Wybrano łącznie 27 miejsc poboru próbek zlokalizowanych na terenach miejskich oraz wiejskich w 6 miejscowościach: Tychach, Katowicach, Sosnowcu, Dąbrowie Górniczej, Mikołowie oraz Przylęku. Głównym kryterium wyboru miejsca poboru próbki była zwiększona aktywność zwierząt domowych wychodzących lub stosowanie nawozów odzwierzęcych we wskazanym obszarze. Wcześniejsze prace dotyczące badań przesiewowych próbek gleb pod kątem występowania AMs były dotychczas skupione na obszarach wiejskich (pola rolne, pastwiska), natomiast pomijały tereny miejskie. Miejsca o specjalnym przeznaczeniu, takie jak wybiegi dla psów, wybiegi dla koni oraz parki miejskie są szczególnie podatne na zanieczyszczenie pozostałościami AMs obecnymi w odchodach zwierząt domowych wychodzących. SAs są składnikami aktywnymi leków, które stosuje się zarówno w leczeniu zwierząt hodowlanych, jak i domowych, a różnice pomiędzy poszczególnymi preparatami leczniczymi wynikają z gatunku zwierzęcia, dla którego są one przeznaczone (*Tabela 7, str. 29 – 34*). Warto również zaznaczyć, że część preparatów zawierających wymienione SAs jest dostępnych bez recepty, co może sprzyjać nadużyciom zarówno w leczeniu ludzi, jak i zwierząt. W poprzednim badaniu wykazano, że SMX i SFD były obecne w glebie, zarówno przed, jak i po zakończeniu eksperymentu polowego, a ponadto są one podatne na wypłukiwanie z gleby, co skutkuje ich migracją w środowisku [**P4**]. Do ekstrakcji SAs z próbek gleb i ich oznaczenia zastosowano metodę SLE-SPE-LC-MS/MS, której szczegóły omówiono w rozdziale 2.1. Uwzględnienie zawartości OC oraz minerałów jako czynników wpływających na odzysk SAs z gleby w ramach etapu walidacji, zapewniło uniwersalność opracowanej metody ekstrakcji. Udowodniono, że wraz ze wzrostem zawartości OC w glebie odzysk SAs maleje [**P7**]. Dzięki uniwersalności stosowanej metody, możliwe było porównanie wyników zawartości SAs oraz ich tendencji do akumulacji, ponieważ uwzględniała ona różnice we właściwościach sorpcyjnych gleb.

W glebach pobranych z zamkniętych oraz otwartych wybiegów dla psów oznaczono każdy z 8 wybranych SAs. Ich stężenie było w zakresie 1,7 – 10,5 ng/g<sub>DW</sub>, a najpowszechniej wykrywanymi związkami były SFD (10 próbek) oraz SMX (9 próbek) [**P7**]. Wybiegi dla psów są miejscami publicznymi, szczególnie narażonymi na akumulację różnego rodzaju zanieczyszczeń (w tym SAs). Głównie ze względu na ograniczoną przestrzeń użytkową (300 – 2000 m<sup>2</sup>) oraz dużą rotację psów w ciągu dnia. Z uwagi na specyfikę posiadania zwierząt domowych, a w szczególności praktykę ich wyprowadzania, nawet w trakcie leczenia farmakologicznego, ich duża rotacja na ograniczonym terenie wybiegu, może przyczyniać się do powstawania rezerwuarów bakterii lekoopornych. Badaniami objęto również pola rolne z terenów podmiejskich, nawożone w ciągu ostatnich dwóch lat nawozami pochodzenia odzwierzęcego. W tych próbkach oznaczono wszystkie 8 SAs, jednak ich stężenia były niższe



(1,9 – 3,7 ng/g<sub>DW</sub>) niż w próbkach gleb pobranych z wybiegów dla psów. Badano również gleby z trzech ośrodków wypoczynkowych – Borków, Paprocan oraz Pogorii – które stanowią atrakcję turystyczną. Obecność sztucznych zbiorników retencyjnych sprzyja migracji SAs w środowisku poprzez wymywanie ich z piaszczystych terenów przybrzeżnych. Najwięcej SAs oznaczono w próbkach gleb z ośrodka Borki (8), następnie Paprocanach (7) oraz Pogorii (6), a ich stężenie w zależności od zawartości OC w glebie było w zakresie od 1,5 do 7,1 ng/g<sub>DW</sub>. Wyłącznie 2 SAs (SMX oraz SFD) oznaczono w parkach miejskich umiejscowionych na terenie Tychów oraz Dąbrowy Górniczej, a ich stężenie było poniżej 2,5 ng/g. Należy zauważyć, że pomimo podobnej rotacji zwierząt wolno wychodzących w parkach miejskich oraz wybiegach dla psów, powierzchnia parków jest zdecydowanie większa, co może tłumaczyć niższą zawartość SAs w glebach.

Wyniki zawarte w pracach **P4**, **P5** oraz **P7** potwierdziły, że AMs są powszechnymi zanieczyszczeniami gleb, obecnymi zarówno na terenach wiejskich, jak i miejskich. W obu przypadkach źródłem wprowadzania AMs do gleby są odchody zwierzęce, pochodzące od zwierząt gospodarskich oraz wychodzących zwierząt domowych (psów, kotów). Akumulacja AMs oraz ich mobilność w glebie zależy od właściwości fizykochemicznych związku (masy, ilości i rodzaju grup funkcyjnych, stężenia oraz formy jonowej), charakterystyki gleby (zawartości OC oraz minerałów), jak również od czynników środowiskowych, takich jak ilość opadów, wilgotność, nasłonecznienie i pora roku. Udowodniono, że ENF, DOX oraz TYL po wprowadzeniu do gleby akumulują się w niej, nie są łatwo wymywane przez opady deszczowe i są w różnym stopniu pobierane przez rośliny [**P4,P5**]. Ponadto, związki te nie uległy całkowitej degradacji przez okres 4 miesięcy po wprowadzeniu do środowiska. Zauważono, że śladowe ilości AMs z różnych klas leków były obecne w glebie już przed planowanym eksperymentem polowym, co stanowiło podstawę wyznaczenia kolejnego zagadnienia badawczego związanego z ich rozpowszechnieniem w glebach. Szczególną uwagę poświęcono SAs (SMX oraz SFD), które były obecne w glebie przed rozpoczęciem eksperymentu i wraz z upływem czasu były wymywane w głąb profilu gleby [**P4**]. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że najpowszechniej wykrywanymi związkami na terenach miejskich oraz pól rolnych położonych na obrzeżach miast były również SMX (23 na 27 próbek) oraz SFD (19 na 27 próbek) [**P7**]. Równie interesującym spostrzeżeniem było to, że zwiększona aktywność zwierząt domowych wychodzących przyczynia się do zwiększonej akumulacji AMs w glebach z miejsc dla nich wyznaczonych [**P7**]. Oznacza to, że na terenach miast również znajdują się rejonby będące rezerwuarami, w których mogą rozwijać się bakterie odporne na leki, co może być potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia ludzkiego.

## **2.4. Fitoremediacja oraz fotokataliza jako alternatywne metody oczyszczania wody z mikrozanieczyszczeń środkami bakteriobójczymi**

Ze względu na niską skuteczność tradycyjnych mikrobiologicznych metod oczyszczania ścieków z mikrozanieczyszczeń AMs, w dalszej części badań zaproponowano dwie alternatywne metody ich usuwania – fitoremediację [**P6,P8**] oraz fotokatalizę heterogeniczną

**[P3,P9]**. Ocenę ich skuteczności przeprowadzono dla wybranych AMs (MET, CIP, ENF, LVF, SMX, SFD, CLD, TYL) w warunkach laboratoryjnych. Usunięcie AMs z wody z użyciem fotokatalizy heterogenicznej wymagało doboru odpowiedniego rodzaju fotokatalizatora, jego masy oraz intensywności promieniowania elektromagnetycznego. **Celem tego badania była ocena skuteczności usuwania MET z próbek wodnych z zastosowaniem różnych parametrów fotokatalizy heterogenicznej [P3]**. Do badań wybrano MET ze względu na jego wysoką stabilność w środowisku i odporność na biodegradację. Wpływ poszczególnych parametrów na efektywność usuwania MET z wody został określony poprzez badanie zmian stężenia leku w czasie procesu oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji. W badaniach wykorzystano 6 fotokatalizatorów półprzewodnikowych –  $\text{TiO}_2$ -anataz,  $\text{TiO}_2$ -P25, ZnO,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{WO}_3$ , PbS – w postaci czystych substancji oraz ich mieszanin w stosunku masowym 1:1. Spośród pojedynczych fotokatalizatorów najwyższą wydajność usunięcia MET (90% po 60 minutach procesu) osiągnięto stosując  $\text{TiO}_2$ -P25. Dobre właściwości fotokatalityczne wykazywały również  $\text{ZrO}_2$ , ZnO oraz PbS, których skuteczność usuwania MET była w zakresie 80 – 90% po 90 minutach procesu. Zastosowanie mieszanin fotokatalizatorów miało na celu rozszerzenie zakresu absorpcji światła przez fotokatalizator z zakresu UV do VIS, ponieważ każdy ze składników mieszaniny miał różną szerokość przerwy wzbronionej. Takie podejście metodyczne nie przyniosło oczekiwanego rezultatu, ponieważ wyłącznie dla 2 z 9 mieszanin (ZnO+PbS,  $\text{TiO}_2$ -P25+PbS) zaobserwowano nieznaczną (5 – 10%) poprawę efektywności fotokatalitycznej **[P3]**. Zmiana masy fotokatalizatora w zakresie 50 – 200 mg/l nie wpływała znacząco na skuteczność usuwania MET. Istotny wpływ na skuteczność fotokatalizy heterogenicznej miała intensywność natężenia promieniowania elektromagnetycznego. Irradiancję zmieniano w zakresie od  $250 \text{ W/m}^2$  (średnia roczna wartość irradiancji słonecznej w Polsce) do  $1000 \text{ W/m}^2$  (średnia wartość irradiancji słonecznej w okresie letnim w Polsce). Zastosowanie irradiacji na poziomie  $250 \text{ W/m}^2$  w 90 minutowym procesie nie zapewniało całkowitego usunięcia MET z wody (86%). Najniższa wartość irradiacji, przy której skuteczność usuwania MET po 90 minutach była bliska 100% wynosiła  $500 \text{ W/m}^2$ . Zwiększanie tej wartości do  $750 \text{ W/m}^2$  oraz  $1000 \text{ W/m}^2$  skracало czas do odpowiednio 45 i 30 minut. Pomimo wysokiej skuteczności usuwania MET przy użyciu irradiancji o wartości  $1000 \text{ W/m}^2$ , należy zauważyć, że uzyskanie tej wartości w warunkach naturalnego oświetlenia jest trudne i wymaga zastosowania dodatkowych źródeł światła.

Na podstawie wyników badań opisanych w **P3** stwierdzono, że zastosowanie mieszanin  $\text{TiO}_2$ -P25 oraz ZnO z PbS jako fotokatalizatorów poprawia tylko nieznacznie skuteczność usuwania MET w procesie fotokatalizy heterogenicznej w porównaniu do pojedynczych składników, jednakże wdrożenie tego rozwiązania jest problematyczne z perspektywy środowiskowej. Ołów jest znany z toksycznych właściwości, co może prowadzić do poważnych konsekwencji dla zdrowia człowieka oraz ekosystemów w przypadku jego uwolnienia do środowiska. W kontekście ekonomicznym zastosowanie najwyższych wartości irradiacji może nie być korzystne, ze względu na konieczność doprowadzenia dodatkowych źródeł światła, co zwiększa koszty procesu. Jako optymalną wartości irradiancji, która zapewnia pełne usunięcie MET z wody, przy jednoczesnym minimalizowaniu kosztów operacyjnych uznano  $500 \text{ W/m}^2$ , która jest możliwa do osiągnięcia w warunkach środowiskowych.

W następnej kolejności, określono skuteczność usuwania z wody oraz ścieków 5 kolejnych AMs z grup FQs (CIP, LVF, ENF) oraz MQs (TYL, CLR) z użyciem  $\text{TiO}_2$ -P25,  $\text{TiO}_2$ -anataz,  $\text{WO}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$  oraz  $\text{ZnO}$  w 120 minutowym procesie fotokatalizy heterogenicznej [P9]. Stężenie fotokatalizatorów w roztworze wynosiło 100 mg/l, a irradancja 500 W/m<sup>2</sup>. **Głównym celem badań było porównanie efektywności usuwania AMs w takich samych warunkach fotokatalitycznych.** W literaturze naukowej zostały opisane metody usuwania wybranych AMs z użyciem fotokatalizy heterogenicznej, jednak ze względu na różne parametry procesu (moc i rodzaj lampy, irradancja, rodzaj i masa fotokatalizatora) ich porównanie jest utrudnione. **Dodatkowo, fotokatalizator o najlepszych właściwościach zastosowano do usunięcia wybranych AMs z TWW.** Ocena skuteczności usuwania AMs rozpuszczonych w wodzie destylowanej (pH=7) nie jest miarodajna w odniesieniu do TWW, ponieważ w ich składzie mogą znajdować się naturalne zmiatacze rodników lub związki, które będą konkurować z zanieczyszczeniami o miejsce aktywne fotokatalizatora.

CIP, ENF i LVF łatwo ulegają fotodegradacji, ponieważ w pierwszych 15 minutach procesu stopień ich usunięcia z wody bez zastosowania fotokatalizatora wynosił od 40% (LVF) do 90% (ENF). Zastosowane  $\text{TiO}_2$ -P25 jako fotokatalizatora pozwoliło na osiągnięcie wyższej skuteczności usuwania wszystkich trzech FQs (>90%), skracając czas procesu z 30 min do 3 min dla ENF i 5 min dla LVF i CIP. TYL oraz CLR gorzej ulegały fotodegradacji w porównaniu do FQs. Wyłącznie 3 półprzewodniki –  $\text{TiO}_2$ -P25,  $\text{TiO}_2$ -anataz oraz  $\text{ZnO}$  – wykazały aktywność fotokatalityczną i pozwoliły na usunięcie 25 – 53% CLR oraz 93 – 100% TYL z wody w ciągu 120 minut procesu fotokatalitycznego [P9]. Można zatem zauważyć, że warunki fotokatalizy heterogenicznej (czas, masa fotokatalizatora, irradancja), które były odpowiednie dla MET, CIP, ENF, LVF oraz TYL nie są wystarczające, aby w pełni usunąć CLR z wody. Na podstawie określonej zawartości OC w próbkach wody po procesie fotokatalizy stwierdzono, że 120 min nie jest wystarczającym czasem by osiągnąć pełną mineralizację zarówno FQs, jak i MQs [P9]. Po zastosowaniu opracowanej metody fotokatalitycznej do oczyszczania TWW wzbogaconych wybranymi FQs oraz MQs zaobserwowano znaczący spadek skuteczności ich usuwania w porównaniu do próbek wody, co sugeruje utratę właściwości fotokatalitycznych przez fotokatalizator w obecności związków matrycowych. Na podstawie badań wstępnych [P3] oraz rozszerzonych [P9] stwierdzono, że:

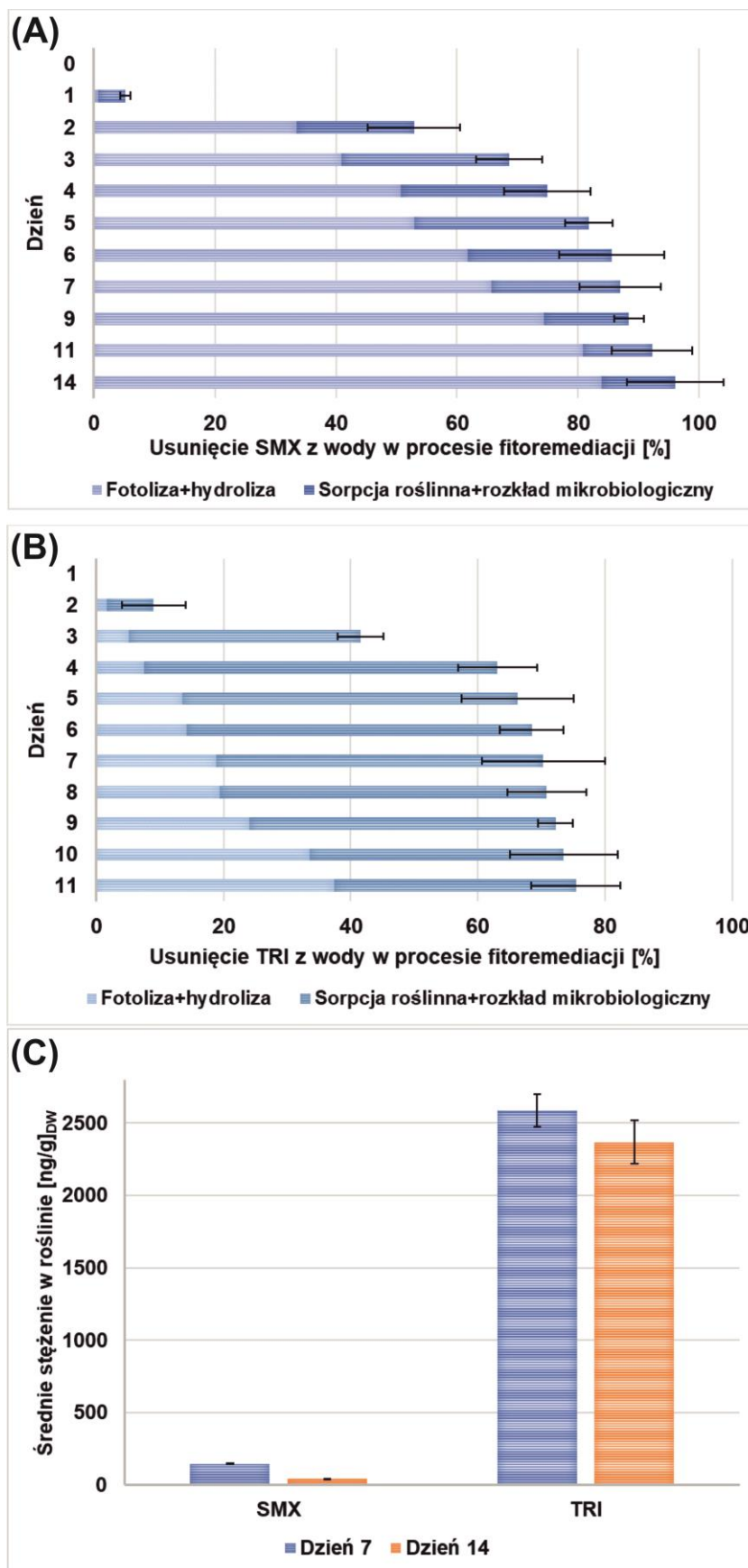
(I) Jednym z kluczowych czynników ograniczających skuteczność fotokatalizy heterogenicznej w usuwaniu AMs jest ich zróżnicowana natura chemiczna oraz strukturalna. FQs mają w swojej strukturze grupy funkcyjne (karboksylowa, piperazynowa), które mogą ulegać przekształceniom pod wpływem promieniowania UV. MET ma w strukturze grupę nitroimidazolową wrażliwą na działanie promieniowania UV. MQs (TYL, CLR) mają złożoną strukturę chemiczną, w której skład wchodzi stabilne pierścienie laktonowe, co utrudnia i wydłuża czas ich usuwania.

(II) Skuteczność usuwania pozostałości AMs jest ograniczona przez obecność składników matrycowych w TWW, które mogą konkurować z AMs o adsorpcję na powierzchni fotokatalizatora lub hamować reakcje fotokatalityczne poprzez konkurencyjne pochłanianie światła. Ocena efektywności działania fotokatalizatora wyłącznie w oparciu o wyniki otrzymane dla próbek modelowych (woda wzbogacona AMs) powinna być tylko poglądowa, natomiast

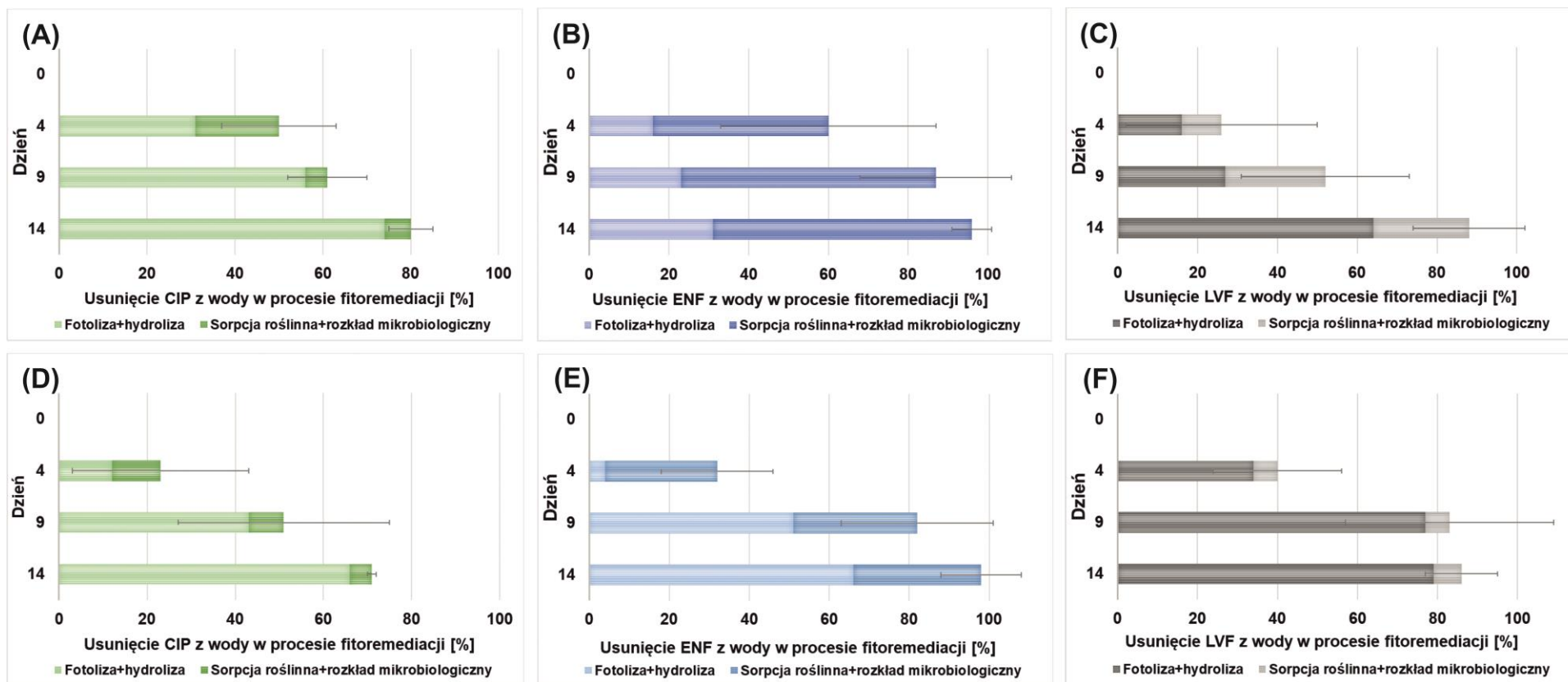
w celu otrzymania wyników, które można zaimplementować do próbek rzeczywistych, degradacja powinna być wykonana w obecności składników matrycy.

(III) Zastosowanie łagodnych warunków fotokatalitycznych, w których wartość irradancji jest zbliżona do słonecznej, a pH próbki jest zbliżone do pH próbek środowiskowych, nie pozwala na pełną mineralizację pozostałości AMs w 120 minutowym procesie z użyciem komercyjnych fotokatalizatorów półprzewodnikowych. Otrzymane wyniki potwierdzają, że zmiana warunków pH środowiska wodnego, wydłużenie procesu lub zastosowanie wyższych wartości irradancji zwiększa skuteczność usuwania AMs z wody. Kierując się ideą zrównoważonego podejścia do optymalizacji procesu fotodegradacji, zmiany pH oraz stosowanie dodatkowych źródeł światła nie jest to wskazane z punktu widzenia ekonomicznego i ekologicznego. Najlepszym podejściem byłoby opracowanie nowego rodzaju fotokatalizatora o wysokiej aktywności, który umożliwiłby efektywne usuwanie AMs z wody oraz ścieków w łagodnych warunkach fotokatalitycznych.

Badania wstępne nad skutecznością usuwania AMs z wody w procesie fitoremediacji, przeprowadzono z użyciem limnobium rozłogowego (*łac. Limnobium laevigatum*) dla dwóch związków – SMX oraz TRI [P6]. SMX był najczęściej wykrywanym zanieczyszczeniem wód powierzchniowych oraz gleb na terenie województwa śląskiego [P1,P8]. Był on również obecny w próbkach ścieków zebranych na wszystkich etapach oczyszczania ścieków z użyciem osadu czynnego [P2]. W preparatach leczniczych SMX jest stosowany równocześnie z TRI, ze względu na ich działanie synergistyczne, przez co do środowiska są wprowadzane razem. Najistotniejszym aspektem fitoremediacji był wybór rośliny, która powinna charakteryzować się szybkim tempem wzrostu i rozwoju, odpornością na zmienne warunki środowiskowe, dużą biodostępnością AMs, wysokim potencjałem biomasy oraz łatwością zbioru. Kryteria te spełniło limnobium rozłogowe, wolno pływający, wieloletni makrofit wodny, łatwy w uprawie hydroponicznej, który miał potencjał do fitoremediacji wody z zanieczyszczeń metalami ciężkimi. Ponadto, roślina ta nie znajduje się na unijnej liście inwazyjnych gatunków obcych, więc można bezpiecznie stosować ją w warunkach środowiskowych. Skuteczność usuwania SMX oraz TRI z wody o początkowym stężeniu 1,0 µg/l w procesie fitoremediacji zależała od 4 zjawisk – hydrolizy, fotolizy, sorpcji zanieczyszczeń przez roślinę oraz aktywności mikroorganizmów obecnych w strefie korzeniowej rośliny. W trakcie 14-dniowego eksperymentu skuteczność usuwania AMs z wody wyniosła 96% dla SMX oraz 75% dla TRI. Czynniki, które spowodowały usunięcie 83% SMX z wody po 14 dniach fitoremediacji były hydroliza oraz fotoliza. Sorpcja przez roślinę w zależności od dnia eksperymentu wpływa na usunięcie jedynie od 4% do 31% SMX z wody (Rysunek 6A) [P6]. W przypadku TRI główną drogą usuwania było pobieranie przez roślinę oraz rozkład mikrobiologiczny w strefie korzeniowej, a ich łączny udział w zależności od dnia eksperymentu wynosił 51 – 58% (Rysunek 6B). W zależności od dnia eksperymentu pH próbek wody po fitoremediacji było w zakresie 6,0 – 7,0. We wspomnianym przedziale pH, SMX występował w formie anionowej, natomiast TRI w formie obojętnej, co miało kluczowy wpływ na biodostępność tych związków. Kondycja limnobium rozłogowego podczas eksperymentu była zadowalająca, nie zaobserwowano obumierania rośliny lub karłowacenia korzeni. Zastosowana do badań partia roślin nie zawierała żadnego z wybranych AMs. Zgodnie



Rysunek 6. Skuteczność usuwania SMX (A) oraz TRI (B) z wody w procesie fitoremediacji z użyciem *limnobium* rozłogowego oraz zmiany ich zawartości w roślinie (C) [P6].

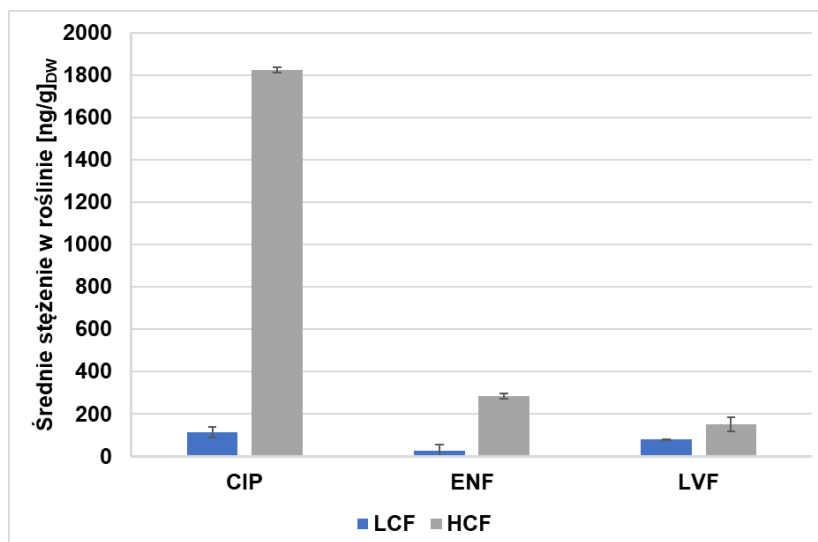


Rysunek 7. Skuteczność usuwania FQs o stężeniu 1 µg/l (A, B, C) oraz 10 µg/l (D, E, F) z wody w procesie fitoremediacji z użyciem rzęsy wodnej [P8].

z przewidywaniami stężenie SMX (1,3 – 4,4 ng/g<sub>FW</sub>) w tkankach roślinnych zebranych w 7 i 14 dniu eksperymentu było niższe niż TRI (72,0 – 78,4 ng/g<sub>FW</sub>). Różnice w stężeniu AMs w tkankach rośliny pomiędzy 7, a 14 dniem mogą sugerować przekształcanie związków podstawowych w TPs w reakcjach metabolicznych (Rysunek 6C). Na podstawie porównania wartości BAF dla SMX oraz dla TRI wyznaczonych dla limnobium rozłogowego z innymi gatunkami roślin stwierdzono, że roślina ta nie przejawia zdolności do hiperakumulacji AMs.

Otrzymane rezultaty fitoremediacji wody z pozostałości AMs uznano za obiecujące, ponieważ SMX oraz TRI nie miały negatywnego wpływu na wzrost, rozwój rośliny oraz jej zdolność do pobierania, akumulowania oraz przekształcania ich w procesach metabolicznych. Badania nad fitoremediacją wody zanieczyszczonej AMs były kontynuowane, przy czym skoncentrowano się na dwóch istotnych aspektach: poszukiwaniu nowego gatunku rośliny zdolnego do hiperakumulacji wybranych farmaceutyków oraz ocenie wpływu stężenia tych związków na kondycję rośliny oraz jej zdolności do bioakumulacji. W kolejnych badaniach zastosowano rzęsę wodną (łac. *Lemma minor*), która wykazywała zdolność do hiperakumulacji metali ciężkich [160,161], a ponadto jest odporna na czynniki środowiskowe, charakteryzuje się szybkim wzrostem, a jej mały rozmiar pozwala na pokrycie całej tafli wody. Skuteczność fitoremediacji zbadano na dwóch poziomach stężeń, które odpowiadały średnim wartościom stężeń AMs w wodach powierzchniowych (1,0 µg/l; LCF) i TWW (10,0 µg/l; HCF) [P8]. Eksperyment fitoremediacji również prowadzono przez 14 dni, podczas których mierzono zmiany stężenia trzech FQs (CIP, ENF, LVF) w wodzie oraz w roślinie.

Skuteczność usuwania FQs z wody po 14 dniach fitoremediacji była najwyższa dla ENF (96 (LCF) – 98% (HCF)), następnie LVF (86 (HCF) – 88% (LCF)), a najniższa dla CIP (72 (HCF) – 80% (LCF)) [P8] (Rysunek 7). Stan rośliny podczas trwania eksperymentu był dobry, nie zaobserwowano karłowacenia liści lub utraty barwnika, jednakże w zależności od stężenia FQs w wodzie zaobserwowano nieznaczne obumieranie i opadanie roślin na dno akwarium. Im wyższe było stężenie FQs w wodzie, tym mniej roślin opadało na dno, co sugeruje, że mogą one działać hamująco na aktywność mikroorganizmów gnilnych. Wraz ze wzrostem stężenia FQs obserwowano również zmniejszenie się zdolności do ich bioakumulacji. Sugeruje to istnienie maksymalnego stężenia, które może zostać pobrane przez roślinę. Rośliny zastosowane w badaniach nie miały wcześniej styczności z wybranymi FQs. Po 14 dniach fitoremediacji w liofilizowanych tkankach rośliny oznaczono najwięcej CIP (87 – 2140 ng/g), następnie ENF (19 – 324 ng/g), a najmniej LVF (75 – 198 ng/g) (Rysunek 8) [P8]. Im wyższe było początkowe stężenie FQ w wodzie, tym wyższe stężenia tych substancji oznaczono w roślinie. Obliczone BAF<sub>DW</sub> dla rzęsy wodnej, w porównaniu do danych uzyskanych dla innych gatunków roślin, okazały się obiecujące. Zaobserwowano hiperakumulację CIP w roślinie, której BAF<sub>DW</sub> był w zakresie 11,5 – 18,2. W przypadku ENF wraz ze wzrostem stężenia zaobserwowano wzrost BAF<sub>DW</sub> z 2,4 do 2,8, natomiast dla LVF zaobserwowano znaczący spadek z 7,8 do 1,4 [P8]. Należy jednak podkreślić, że stosowany powszechnie w ocenie skuteczności fitoremediacji współczynnik BAF nie może być traktowany



Rysunek 8. Zawartość FQs w rzędzie wodnej po 14 dniach fitoremediacji (LCF – początkowe stężenie FQs w wodzie 1 µg/l; HCF – początkowe stężenie FQs w wodzie 10 µg/l).

Tabela 15. Porównanie metod oczyszczania ścieków oraz wody z pozostałości FQs

Metoda oczyszczania	Metoda osadu czynnego	Fotokataliza heterogeniczna	Fitoremediacja
<b>Warunki</b>	Przepływ: 60 000 m <sup>3</sup> /doła BZT: 267 mg/l (UWW), 17 mg/l (TWW) CHZT: 382 mg/l (UWW), 173 mg/l (TWW) C <sub>FQs</sub> : 9,5 – 306,7 ng/l	Katalizator: TiO <sub>2</sub> -P25 (100 mg/l) Irradiancja: 500 W/m <sup>2</sup> Czas: 120 min C <sub>FQs</sub> : 1 mg/l	Roślina: <i>Lemma minor</i> Czas trwania: 14 dni C <sub>FQs</sub> : 1 – 10 µg/l
<b>E<sub>CIP</sub> [%]</b>	Ścieki: 60 – 82	Woda: 99 (15 min) Ścieki: 96(120 min)	Woda: 72 – 80
<b>E<sub>ENF</sub> [%]</b>	Ścieki: 15	Woda: 99 (15 min) Ścieki: 99 (120 min)	Woda: 96 – 98
<b>E<sub>LVF</sub> [%]</b>	Ścieki: 8 – 100	Woda: 99 (15 min) Ścieki: 99 (120 min)	Woda: 86 – 88
<b>TPs</b>	+	+	+
<b>Źródło</b>	<b>[P2]</b>	<b>[P9]</b>	<b>[P8]</b>

E – efektywność; TPs – produkty transformacji; BZT – biochemiczne zapotrzebowanie tlenu ; CHZT – chemiczne zapotrzebowanie na tlen; C – początkowe stężenie AMs.

jako jedyny wyznacznik. Wskaźniki fitoremediacji takie jak BAF oraz I<sub>T</sub> nie zostały znormalizowane, a metodyka ich wyznaczania ujednolicona. Najczęściej stosowany w literaturze BAF jest wyznaczany niekonsekwentnie, dla suchej (DW) lub mokrej masy (WW) rośliny. Roślina w procesie liofilizacji traci od 70 – 95% masy, którą stanowi woda, więc współczynniki BAF podawane dla suchej masy będą znacznie wyższe niż dla mokrej masy [34]. Brak standaryzacji metod obliczania BAF oraz jednoznacznych kryteriów jego interpretacji prowadzi do trudności w porównywaniu wyników dla różnych gatunków roślin. Dlatego BAF może służyć wyłącznie do celów porównawczych, pomiędzy różnymi gatunkami roślin, o ile sposób przygotowania próbki roślinnej przed ekstrakcją był taki sam. Ponadto wartość BAF może być zmienna w zależności od dnia poboru próbki. Stężenie FQs w roślinie zmienia się wskutek ich przemian metabolicznych i tworzenia się TPs. Ocena skuteczności



fitoremediacji AMs najczęściej określana jest wyłącznie parametrem efektywności, natomiast  $I_T$  oraz BAF nie zawsze są wyznaczone (*Rozdział 1.3, Tabela 5*). Efektywność fitoremediacji również nie może być traktowana jako parametr wystarczający, aby ocenić skuteczność oczyszczania wody z AMs, ponieważ nie uwzględnia możliwości transformacji AMs w wodzie. Aby w pełni zrozumieć i wykorzystać potencjał fitoremediacji do usuwania AMs ze środowiska należy dokładnie zrozumieć mechanizm ich pobierania przez roślinę oraz ustandaryzować metodykę badań.

W tabeli 15 porównano skuteczność tradycyjnej metody oczyszczania ścieków z zastosowaniem osadu czynnego, fotokatalizy heterogenicznej oraz fitoremediacji w usuwaniu FQs ze ścieków oraz wody. Skuteczność mikrobiologicznego oczyszczania ścieków zależała od rodzaju FQs oraz pory roku. Im mniejsze było początkowe stężenie FQs w UWW, tym wyższa była skuteczność ich usuwania. Wyraźny wpływ pory roku na skuteczność mikrobiologicznego oczyszczania ścieków widać na przykładzie LVF, gdzie w okresie wiosennym oraz letnim skuteczność usuwania była bliska 100%, natomiast w okresie jesienno-zimowym spadła do 8% [P2]. Fotokataliza heterogeniczna, w której wykorzystano  $TiO_2$ -P25 jako fotokatalizator oraz intensywności promieniowania  $500\text{ W/m}^2$  spowodowała prawie całkowite ( $\sim 99\%$ ) usunięcie wszystkich FQs z wody oraz próbek ścieków, jednakże w zależności od składu matrycy zaobserwowano wydłużenie się czasu procesu z 15 min do 120 min [P6]. Ponadto podczas fotokatalizy heterogenicznej możliwe było usunięcie FQs o wyższych stężeniach ( $1\text{ mg/l}$ ) od wykrytych w UWW (max.  $306,7\text{ ng/l}$ ). Należy jednak podkreślić, że wraz z wydłużaniem się czasu fotokatalizy wzrastają koszty energetyczne procesu, co może nie być korzystne w zastosowaniu na większą skalę. Fitoremediacja wody z wykorzystaniem rzęsy wodnej również okazała się obiecującą metodą usuwania pozostałości FQs z wody. W zależności od rodzaju FQs oraz ich początkowego stężenia, skuteczność usuwania w 14-dniowym eksperymencie była w zakresie 72 – 98% [P8]. Fitoremediacja ma jednak dwa znaczące ograniczenia w porównaniu do fotokatalizy. Po pierwsze, rzęsa wodna może być stosowana tylko przy sprzyjających warunkach pogodowych od marca do października, a po tym czasie należy ją usunąć ze zbiornika, ponieważ podczas obumierania może uwolnić pochłonięte zanieczyszczenia. Po drugie, pomimo dużej odporności na zmienne czynniki środowiskowe jej stosowanie jest ograniczone do TWW, których skład jest zbliżony do wód powierzchniowych. Zastosowanie rośliny w UWW może wpływać negatywnie na jej wzrost, rozwój oraz rozmnażanie, co obniży znacząco zdolność do pobierania zanieczyszczeń. Warto jednak zauważyć, że w żadnej z omawianych metod oczyszczania ścieków nie udało się doprowadzić do pełnej mineralizacji FQs, ponieważ zarówno w wodzie, jak i ściekach obecne były ich TPs.

## 2.5. Ścieżki transformacji środków bakteriobójczych w środowisku

Do identyfikacji TPs wybranych AMs zastosowano LC-ESI-MS/MS w różnych trybach pracy detektora mas (monitorowania reakcji następczych (MRM, *ang. multiple reactions monitoring*), wzmocnionego skanowania jonów potomnych (EPI, *ang. enhanced product ion*), wzmocnionego skanowania MS (EMS, *ang. enhanced MS scan*)) oraz oprogramowanie

umożliwiająca inteligentną akwizycję danych (IDA). Dzięki zastosowaniu IDA możliwe było uzyskanie większej ilości informacji o TP's obecnych w próbce w ramach jednej analizy, takich jak: pary jon prekursora – jon produktu, czas retencji, względne intensywności sygnałów odpowiadające jonom fragmentacyjnym oraz pełne widma masowe. Identyfikację TP's przeprowadzono w 4 krokach:

- 1) **Badania przesiewowe próbek w trybie pracy p-MRM:** Na podstawie opracowanej na bazie literatury listy TP's wraz z przypisanymi im parami jon prekursora – jon produktu dla wybranych 22 AMs oraz listy potencjalnych przejść MRM dla TP's wygenerowanych przez program LightSight, opracowano metodę ich identyfikacji z zastosowaniem trybu MRM. Listę przejść MRM przygotowano dla ponad 300 TP's, które powstały w reakcjach biotycznej lub abiotycznej transformacji macierzystych AMs. Etap ten umożliwił wstępną identyfikację TP's w próbkach modelowych oraz środowiskowych.
- 2) **Analiza niecelowana próbek w trybie pracy EMS-IDA-EPI:** W tym etapie zebrano dane o TP's oraz składnikach matrycy próbki. Zastosowanie odpowiednich kryteriów IDA umożliwiło wyodrębnienie i wzmocnienie sygnałów TP's, których zawartość w próbce była najwyższa. Kryteria IDA, takie jak zakres skanowania  $m/z$  oraz minimalna intensywność sygnału były dobierane w każdym z badań opisanych w **P1 – P9** w zależności od rodzaju próbki oraz ilości i rodzaju AMs wykrytych w ramach analizy celowanej.
- 3) **Potwierdzenie obecności TP's zidentyfikowanych w pierwszym kroku.** Zastosowanie EPI pozwoliło na skupienie jonów o określonych czasach retencji oraz ich fragmentację, a wynikiem były otrzymane widma masowe. Jeżeli na widmach masowych zidentyfikowano jon prekursora oraz jony produktów TP, który wykryto również metodą p-MRM, a pozostałe sygnały na widmie były zgodne z danymi literaturowymi, to potwierdzało to obecność tego związku w próbce.
- 4) **Identyfikacja „nowych” TP's:** Wykonano selekcję widm masowych na podstawie intensywności sygnałów na chromatogramach zarejestrowanych w trybie EPI. Następnie wykonano analizę retrospektywną widm, przypisując każdemu z sygnałów o określonym  $m/z$  jon o określonej strukturze. Struktury TP's zidentyfikowane tą metodą potwierdzono poprzez porównanie danych z widm masowych z danymi literaturowymi lub bazami danych.

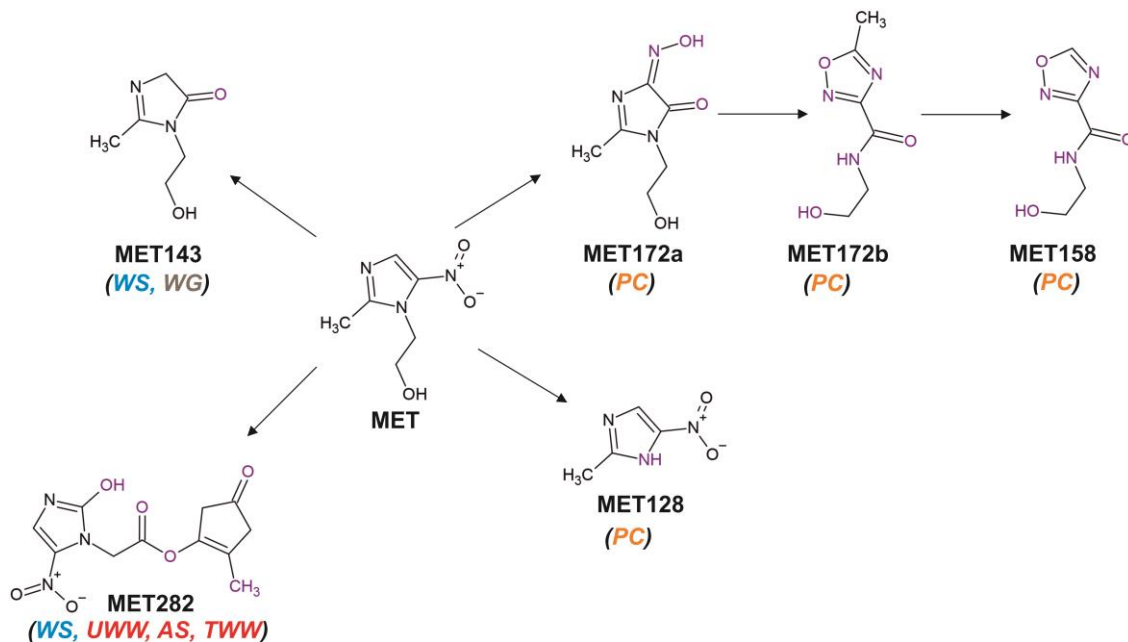
Zastosowanie tego schematu postępowania do identyfikacji TP's miało jednak pewne ograniczenia. Po pierwsze, możliwa była identyfikacja tylko tych związków, które ekstrahują się w takich samych warunkach jak związek macierzysty. Zarówno analizę celowaną, jak i niecelowaną wykonano korzystając z tych samych ekstraktów. O ile odzysk AMs w metodzie celowanej był znany, tak nie było możliwości wyznaczenia go dla TP's. Jeżeli po przekształceniu macierzystego związku zmienia się charakter związku (lotność, polarność, rozpuszczalność, stabilność) to wydajność jego ekstrakcji może być niższa, a przez to nie zostanie on wykryty w próbce. Ponadto, stężenie TP's w próbce może być zbyt niskie, by wykryć go w złożonej matrycy środowiskowej. Po drugie, TP's mogą nie być prawidłowo rozdzielane w układzie chromatograficznym i koeluować, przez co widma masowe tych związków nakładają się. Wynika to ze stosowania w NTA takich samych warunków chromatograficznego rozdzielania TP's, jak w analizie celowanej. Po trzecie, zastosowanie

wyłącznie LC-MS/MS w różnych trybach pracy detektora mas typu QTRAP może nie być wystarczające do określenia dokładnej struktury molekularnej TP's np. odmiany izomerycznej, położenia ugrupowania chemicznego, czy wiązania. Do tego celu należałoby zastosować inne techniki analityczne jak np. HRMS, NMR lub XPS. Świadomość ograniczeń opracowanego czteroetapowego schematu identyfikacji TP's była kluczowym elementem zapewnienia poprawności zastosowania zaproponowanej metody NTA oraz uniknięcia nadinterpretacji wyników.

Wyznaczenie ścieżek transformacji AMs wyłącznie na podstawie informacji o zidentyfikowanych w próbkach TP's jest również utrudnione, ponieważ nieznane są ich źródła wprowadzenia do środowiska. Transformacja AMs może zachodzić nie tylko po wprowadzeniu do środowiska, ale również na etapie oczyszczania ścieków, uzdatniania wody, wydalania ich metabolitów wraz z odchodami oraz migracji w środowisku. W ramach kompleksowych badań oczyszczania ścieków metodą osadu czynnego opisanych w **P2** wykazano, że TP's wybranych AMs były obecne już w UWW, a w trakcie procesu mogły ulegać dalszym transformacjom, tak samo jak macierzysty związek. TP's odporne na działanie osadu czynnego, były obecne również w TWW i rzece, do której je odprowadzono [**P2**]. Wyniki badań przesiewowych wód powierzchniowych na terenie aglomeracji Śląskiej opisane w **P1** sugerują, że TP's SMX oraz SFD są obecne nawet w próbkach wody, w których nie wykryto macierzystych SAs. Można zatem wnioskować, że TP's mogą być bardziej stabilne i trwałe w środowisku od macierzystych AMs. W przypadku leków należących do SAs oraz FQs ich podobieństwo strukturalne utrudnia wskazanie, który z leków był prekursorem TP's, stąd też w **P1** ścieżki transformacji ENF i CIP omówiono łącznie, natomiast w **P7** oddzielono jako osobną grupę TP's powstałe w wyniku przekształceń kwasu 4-aminobenzenosulfonowego, będącego rdzeniem struktury SAs. Na etapie identyfikacji TP's CIP oraz ENF powstałych podczas fitoremediacji w warunkach laboratoryjnych zauważono, że AMs z tej samej grupy leków mogą tworzyć takie same TP's [**P8**]. Na podstawie tych obserwacji stwierdzono, że nie da się jednoznacznie wskazać czynnika, który spowodował transformację AMs oraz wskazać miejsca i czasu, w którym do tej transformacji doszło wyłącznie na podstawie informacji o obecności lub braku TP's w próbce środowiskowej. Identyfikacja TP's wybranych AMs w próbkach środowiskowych (gleby, wody, ścieki, tkanki roślinne) oraz modelowych była kluczowym aspektem każdego z badań **P1 – P9**. Na rysunkach 9 – 19 przedstawiono ścieżki transformacji wybranych AMs, uwzględniając rodzaj próbki w jakim poszczególne TP's zostały wykryte. Takie przedstawienie danych pozwala na określenie warunków oraz czynników, które mogą sprzyjać powstawaniu TP's. Zidentyfikowano łącznie 119 TP's we wszystkich próbkach środowiskowych.

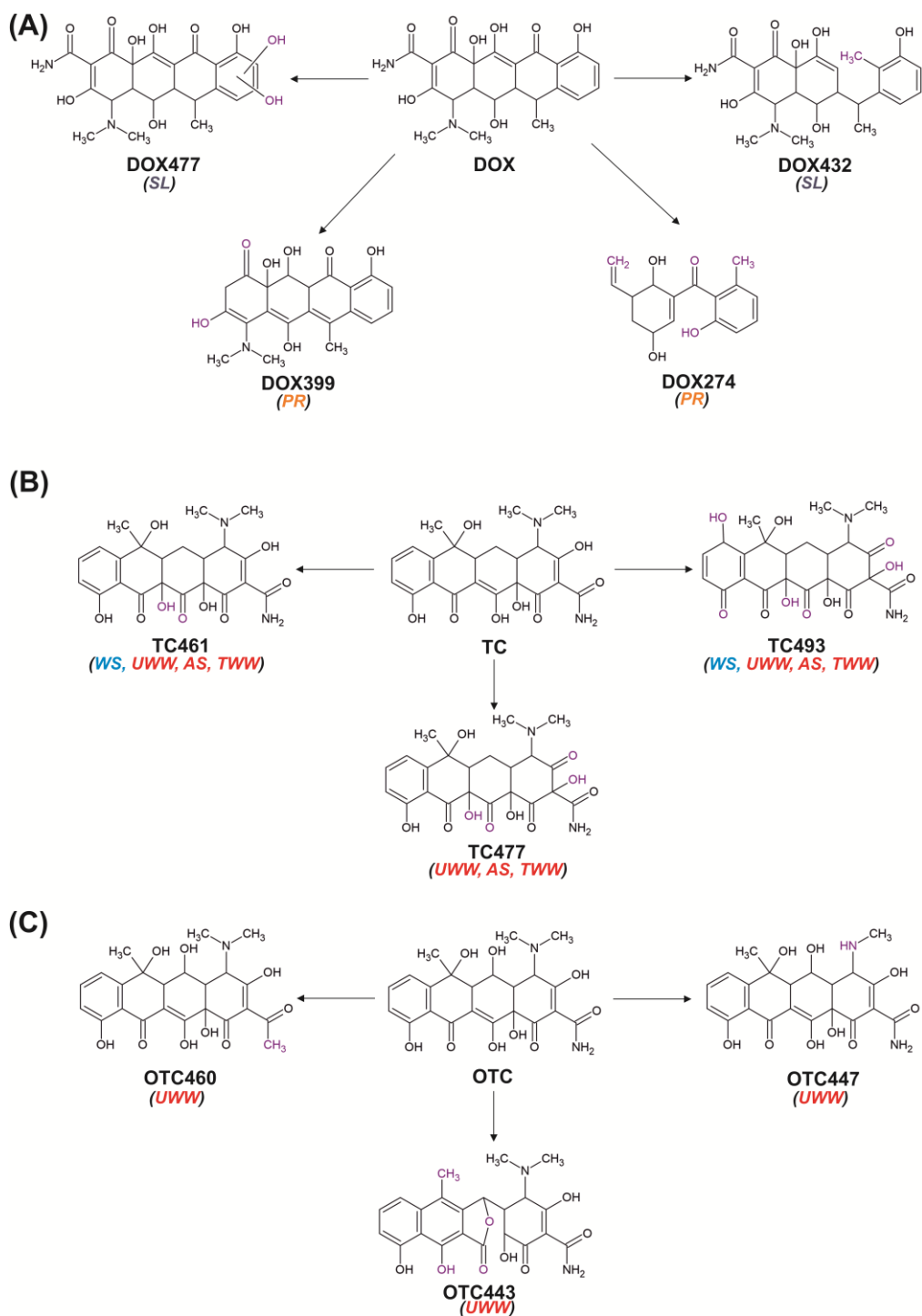
Produkty transformacji MET zostały wykryte zarówno w próbkach środowiskowych (wody gruntowe oraz powierzchniowe) [**P2,P4**], jak i próbkach wody po procesie fotodegradacji [**P3**] (Rysunek 9). W wodzie poddanej procesowi fotokatalizy heterogenicznej (PC) zaobserwowano powstanie 5 TP's. MET172a, MET172b oraz MET158 powstały w wyniku przegrupowania pierścienia imidazolu do oksoimidazolu, a następnie do oksadiazolu. MET128 powstał w reakcji odszczepienia grupy hydroksyetylowej od pierścienia nitroimidazolowego i jest to typowy dla procesów AOPs produkt transformacji MET [162,163]. Dwa TP's (MET282, MET143) były charakterystyczne dla próbek środowiskowych. MET282 zidentyfikowano w ściekach na wszystkich etapach ich oczyszczania oraz w rzece przylegającej do

oczyszczalni **[P2]**. Tworzy się on poprzez utlenienie grupy hydroksylowej w łańcuchu bocznym MET oraz przyłączenie 5-hydroksymetylofurfuralu [164]. Natomiast MET143 powstał w reakcji odłączenia grupy nitrowej oraz przyłączenia tlenu do MET i został wykryty zarówno w wodzie rzecznej, jak i w wodach gruntowych. Nie stwierdzono jednak powstawania MET143 w procesie oczyszczania ścieków.



Rysunek 9. Ścieżka transformacji MET w środowisku oraz w procesie fotodegradacji (WS – wody powierzchniowe, WG – wody gruntowe, UWW – ścieki nieoczyszczone, AS – ścieki z bioreaktora, TWW – ścieki oczyszczone, PC – fotokataliza).

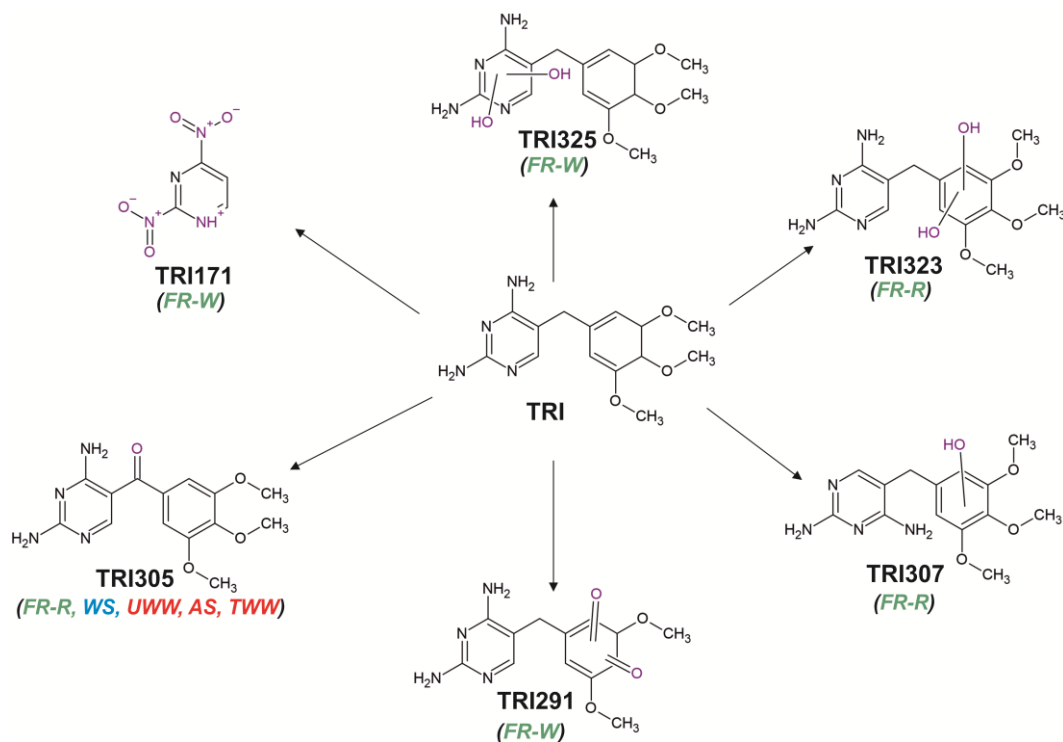
DOX jako jeden z najpowszechniej stosowanych u bydła i drobiu przedstawicieli TCs, po wprowadzeniu do gleby wraz z obornikiem drobiowym lub bydłym ulegał częściowej degradacji z utworzeniem TPów **[P4,P5]** (Rysunek 10A). W wodach gruntowych nie wykryto TPów DOX, natomiast w glebie, niezależnie od zastosowanego rodzaju obornika, zidentyfikowano dwa z nich – DOX432 oraz DOX477. DOX432 powstał w reakcji dehydratacji DOX, natomiast DOX477 został utworzony na skutek podwójnej hydroksylacji jej poczwórnego pierścienia **[P4]**. W korzeniu pietruszki, której wzrost i rozwój przebiegał w zanieczyszczonej DOX glebie, również zidentyfikowano dwa TPów (DOX399 oraz DOX274). Warto zauważyć, że żaden z wymienionych TPów nie został wykryty w glebie oraz w wodzie gruntowej. Sugeruje to, że powstały one w wyniku reakcji metabolicznych rośliny lub na skutek działania mikroorganizmów zasiedlających korzeń rośliny **[P5]**. DOX339 powstał w reakcji rozerwania wiązania C-C, a następnie odłączenia się grupy amidowej od DOX, natomiast do utworzenia DOX274 prowadzą reakcje rozerwania wiązania C-C, C-N oraz dehydratacji macierzystego związku. Produkty transformacji TC powstałe w reakcjach pojedynczego (TC461), podwójnego (TC477) oraz potrójnego (TC493) hydroksylowania były odporne na działanie osadu czynnego w procesie oczyszczania ścieków, a ich obecność potwierdzono zarówno w UWW, TWW, jak i w wodzie rzecznej pobranej przed i po zrzucie ścieków **[P2]** (Rysunek 10B). Inaczej było w przypadku TPów OTC, które wykryto wyłącznie w UWW, a po procesie oczyszczania uległy dalszym przemianom **[P2]** (Rysunek 10C).



Rysunek 10. Ścieżka transformacji wybranych TCs w środowisku oraz w procesie oczyszczania ścieków z użyciem osadu czynnego: (A) DOX – doksycyklina, (B) TC – tetracyklina, (C) OTC – oksytetracyklina. (WS – wody powierzchniowe, UWW – ścieki nieoczyszczone, AS – ścieki z bioreaktora, TWW – ścieki oczyszczone, PR – roślina korzeń, SL – gleby).

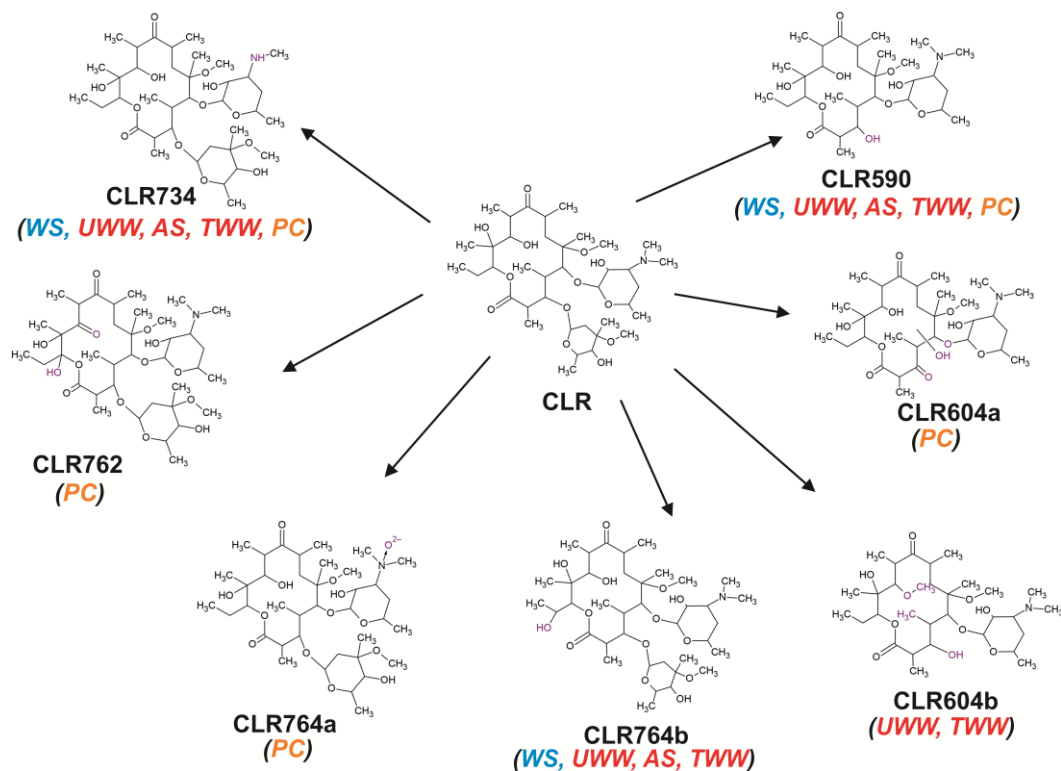
Wysokie stężenia TRI oznaczone zarówno w UWW (2,4 – 1643,7 ng/l), jak i TWW (12,1 – 1255,1 ng/l) na przestrzeni roku wskazują na trwałość tego AMs i jego odporność na usuwanie metodą osadu czynnego [P2]. We wszystkich próbkach ścieków oraz wody rzecznej wykryto wyłącznie jeden TP – TRI305 – który został utworzony w wyniku przyłączenia tlenu do łańcucha łączącego aromatyczne pierścienie TRI (Rysunek 11). W próbkach wody oczyszczonej metodą fitoremediacji zidentyfikowano łącznie 6 TP TRI. W tkankach roślinnych

wykryto 3 TP's – TRI323, TRI307 oraz TRI305 – powstałe w reakcjach utleniania TRI, typowych dla metabolizmu I fazy leków. Ponadto zauważono, że TRI rozpuszczony w wodzie, którą wystawiono na działanie promieniowania w zakresie długości fal światła 400 – 840 nm przekształca się po 7 – 9 dniach w TRI325 i TRI291. Natomiast w kontakcie z roślinami wodnymi już po 2 dniach obserwowane było tworzenie się TRI171.



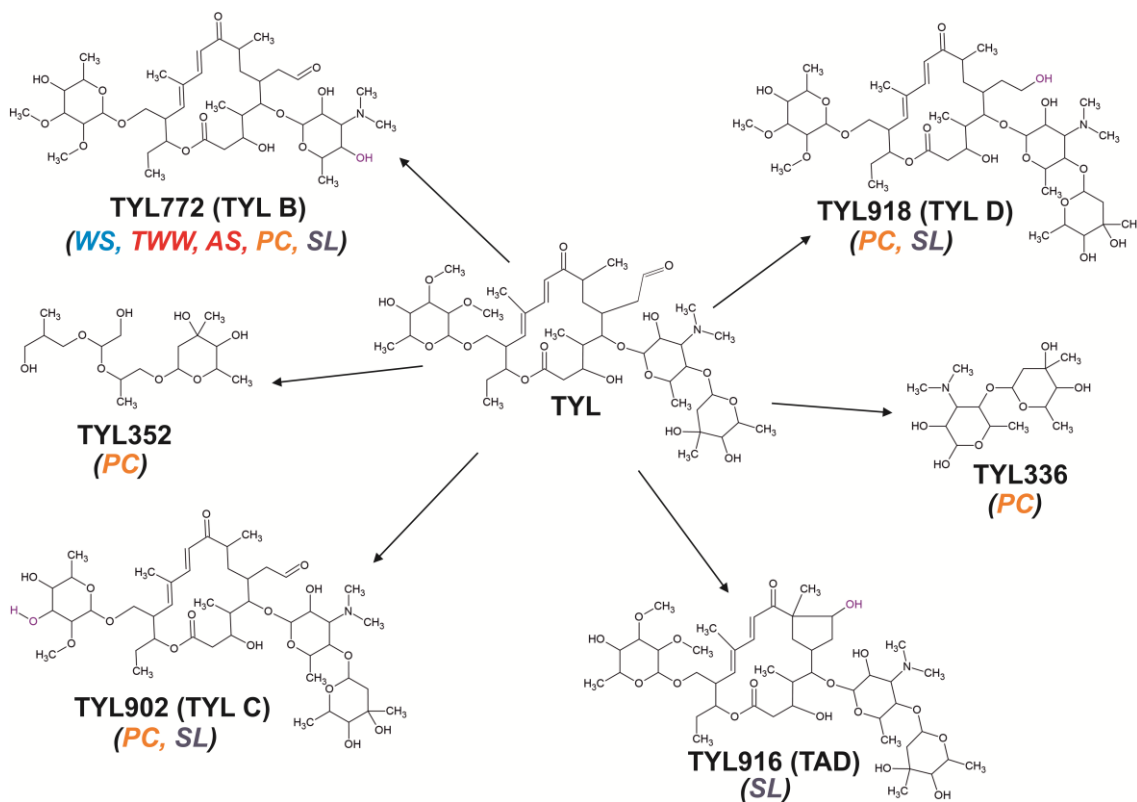
Rysunek 11. Ścieżka transformacji TRI w procesie fitoremediacji oraz oczyszczania ścieków z użyciem osadu czynnego (WS – wody powierzchniowe, UWW – ścieki nieoczyszczone, AS – ścieki z bioreaktora, TWW – ścieki oczyszczone, FR-R – fitoremediacja tkanki roślinne, FT-W – fitoremediacja próbki wody).

CLR również była odporna na procesy biologicznego oczyszczania ścieków. W próbkach ścieków pobranych na każdym z etapów oczyszczania zidentyfikowano jej 4 TP's – CLR734, CLR590, CLR764b oraz CLR764a – powstałe w reakcjach hydroksylowania oraz metylowania/demetylowania (Rysunek 12). Stopień usunięcia CLR z wody w procesie fotokatalizy heterogenicznej mieścił się w zakresie 16 – 53%, a w mieszaninie po reakcji wykryto łącznie 5 TP's [P9]. Zidentyfikowano dwa różne TP's o takiej samej wartości  $m/z$ : CLR604a utworzone w reakcji hydroksylowania oraz CLR604b powstałe w reakcji metylowania CLR. CLR604a miała jony fragmentacyjne o  $m/z$  odpowiednio 586 oraz 558, natomiast CLR604b o  $m/z$  522 oraz 572, co potwierdza, że były to dwie różne struktury. CLR764a i CLR764b powstają w reakcji utleniania CLR, a w literaturze przypisywane są im te same jony fragmentacyjne o  $m/z$  606 oraz  $m/z$  158 [147,165]. Dodatkowo, na widmie masowym CLR764a zaobserwowano jon fragmentacyjny ( $m/z$  365), który opisał w swojej pracy R. Tian i inni, co pozwoliło na rozróżnienie tych związków [147].



Rysunek 12. Ścieżki transformacji CLR w procesie oczyszczania ścieków oraz wody z użyciem osadu czynnego oraz fotokatalizy heterogenicznej (WS – wody powierzchniowe, UWW – ścieki nieoczyszczone, AS – ścieki z bioreaktora, TWW – ścieki oczyszczone, PC – fotokataliza).

Stężenie TYL w UWW niezależnie od pory roku było niskie (<2,0 ng/l) i praktycznie nie ulegało zmianom w procesie biologicznego oczyszczania ścieków [P2]. W TWW oraz wodzie rzecznej po zrzucie ścieków zidentyfikowano jeden TP TYL (TYL772), powstały w wyniku hydrolizy wiązania C-O i odłączenia pierścienia mykarozy [P2]. W procesie fotokatalizy heterogenicznej skuteczność usuwania TYL z wody była w zakresie od 69% do 93% [P9]. Niezależnie od zastosowanych warunków fotokatalitycznych, w żadnym przypadku nie osiągnięto pełnej mineralizacji próbki, a w mieszaninach poreakcyjnych wykryto jej 5 TP (TYL772, TYL902, TYL918, TYL352, TYL336). TYL902 oraz TYL918 powstały w reakcjach odpowiednio demetylacji oraz redukcji grupy aldehydowej (Rysunek 13). TYL336 został utworzony w wyniku odłączenia się pierścieni cukrowych mykarozy i mykaminozy od pierścienia laktonowego, natomiast TYL356 w reakcji rozszczepienia pierścienia laktonowego i mykaminozy. TYL336 oraz TYL356 wykryto wyłącznie w próbkach po procesach fotokatalitycznych, natomiast nie były obecne w próbkach środowiskowych. W ekstraktach z próbek gleb nawożonych obornikiem wzbogaconym TYL zidentyfikowano jej 4 TP: TYL772, TYL902, TYL918 oraz TYL916. Ponadto TYL772, TYL918 oraz TYL916 były obecne w próbkach gleb niezależnie od zastosowanego typu nawozu, natomiast TYL902 wykryto wyłącznie w glebach nawożonych obornikiem bydlęcym [P4]. Analizę przesiewową przeprowadzono również w próbkach tkanek pietruszki zwyczajnej, uprawianej w zanieczyszczonej glebie. W tkankach nie wykryto żadnego TP [P5], co potwierdza niską biodostępność TYL [166].

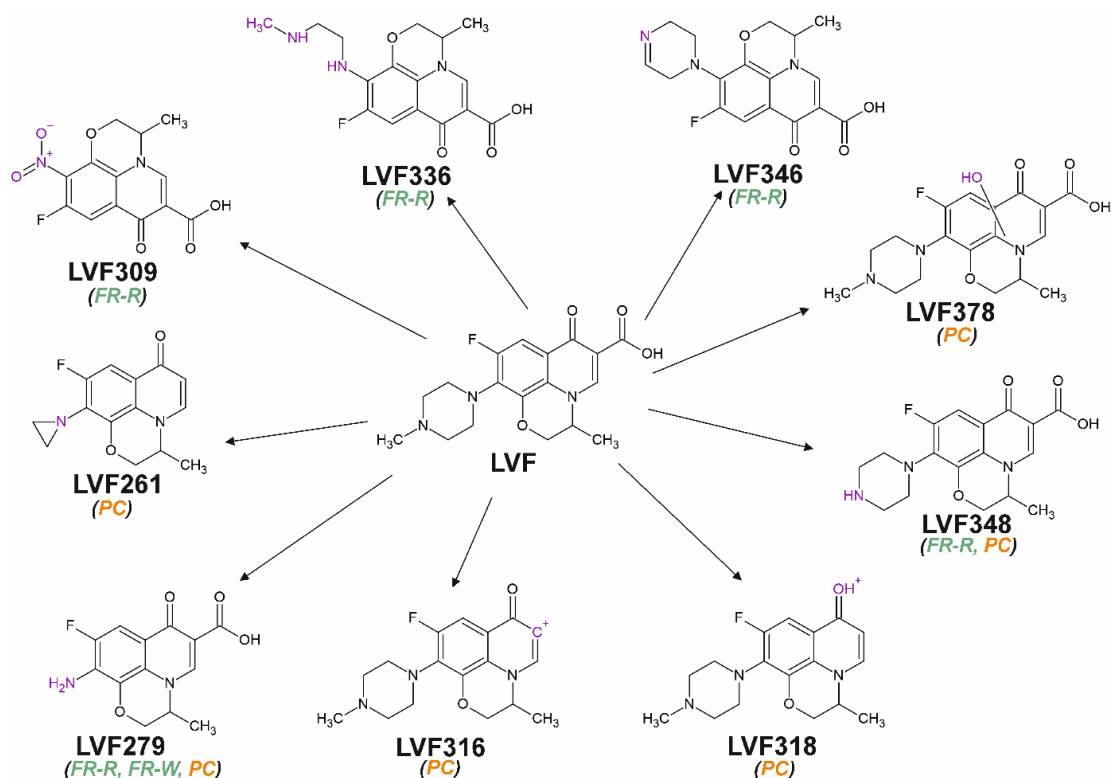


Rysunek 13. Ścieżka transformacji TYL w procesie oczyszczania ścieków oraz w środowisku glebowym (WS – wody powierzchniowe, TWW – ścieki oczyszczone, AS – ścieki z bioreaktora, PC – fotokataliza, SL – gleby).

Identyfikację TPów w grupie FQs w próbkach środowiskowych [P2,P4,P5] i modelowych [P8,P9] przeprowadzono dla trzech związków: ENF, CIP i LVF. ENF i CIP wybrano ze względu na ich powszechną obecność w środowisku wodnym oraz glebie, natomiast LVF ze względu na brak doniesień literaturowych na temat tego leku. Zarówno fitoremediacja, jak i fotokataliza heterogeniczna powodowały skuteczne usunięcie LVF z wody z dużą skutecznością: odpowiednio 86 – 88% w 14 dni i >90% w 120 min. Niezależnie od wybranej metody oczyszczania w wodzie obecne były TP-y LVF (Rysunek 14). W próbkach wody po procesie fotokatalitycznym wykryto 3 TP-y LVF powstałe w reakcjach utlenienia (LVF378), demetylacji (LVF348) oraz redukcji pierścienia piperazynowego (LVF261) [P8]. W tkankach roślinnych oraz w wodzie po procesie fitoremediacji zidentyfikowano 5 TP-y. Powstały one w wyniku zmian w obrębie pierścienia piperazynowego LVF, takich jak rozerwanie wiązania C-N, otwarcie pierścienia oraz utlenienie [P9]. Warto zauważyć, że dwa TP-y LVF powstały niezależnie od wybranej metody oczyszczania – LVF279 oraz LVF348 – co może sugerować, że są one szczególnie trwałe lub trudne do usunięcia.

Struktury chemiczne ENF oraz CIP różnią się między sobą jedną grupą etylową przyłączoną do atomu azotu w pierścieniu piperazyny, dlatego mogą się przekształcać w siebie wzajemnie (Rysunek 15). TP-y ENF oraz CIP zostały oznaczone we wszystkich rodzajach próbek środowiskowych: ściekach [P2], wodach powierzchniowych [P2] i gruntowych [P4] oraz tkankach roślinnych [P5]. Ich tworzenie zaobserwowano także w procesie fotokatalitycznym [P9] oraz fitoremediacji [P8]. Łącznie zidentyfikowano 30 TP-y obu związków, powstałych w reakcjach otwarcia lub odłączenia pierścienia piperazynowego,





Rysunek 14. Ścieżka transformacji LVF w procesie fotokatalizy oraz fitoremediacji (PC – fotokataliza, FR-R – fitoremediacja tkanki roślinne, FT-W – fitoremediacja próbki wody).

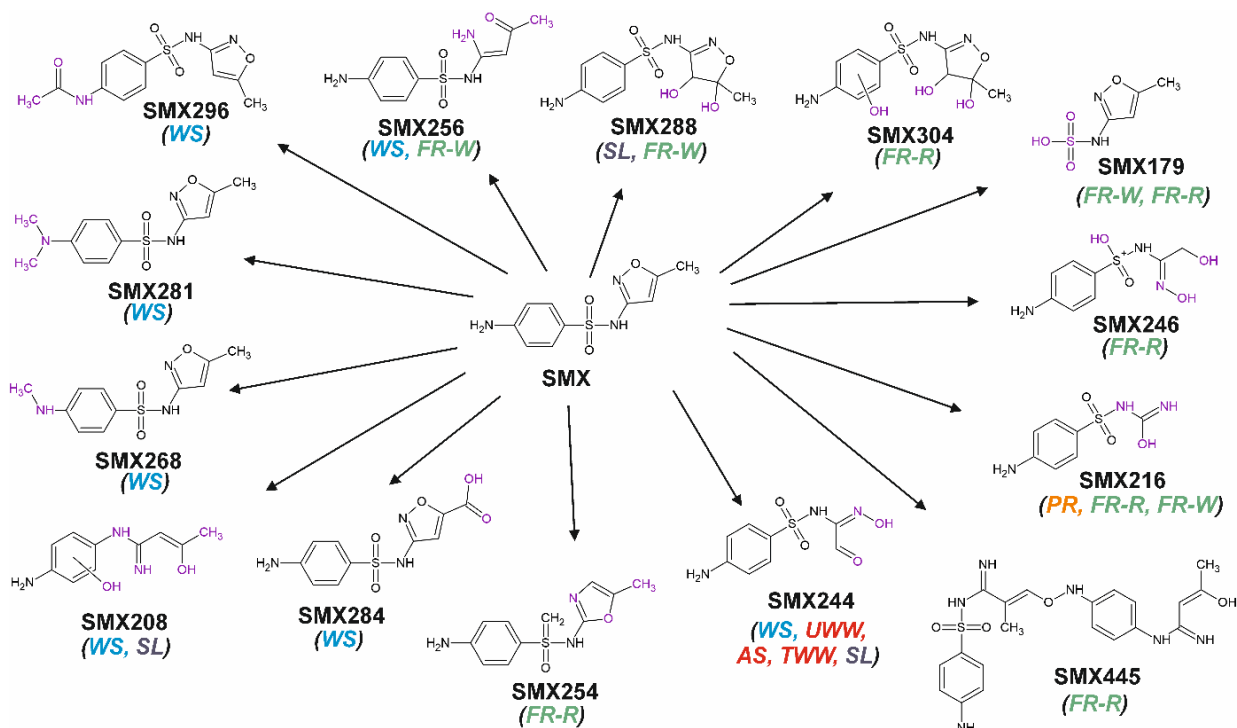
odłączenia pierścienia cyklopropylowego, rozerwania wiązania C-C lub C-N, hydroksylacji, przyłączenia tlenu oraz defluoryzacji. Warto zauważyć, że niezależnie od czynnika środowiskowego będącego przyczyną transformacji, we wszystkich zidentyfikowanych TP's pierścień chinolonowy pozostał nienaruszony, co świadczy o jego szczególnej stabilności. Najczęściej wykrywanymi TP's były: FQ263 – powstały w reakcji odłączenia pierścienia piperazynowego oraz FQ190 – powstały w reakcji odłączenia pierścienia piperazynowego, cyklopropylowego oraz defluoryzacji. Tworzenie FQ263 zaobserwowano zarówno w procesach fotokatalitycznej degradacji, jak i fitoremediacji wody zanieczyszczonej omawianymi FQ's. Był on także obecny w UWW, wodach powierzchniowych, glebie oraz tkankach roślinnych. Powszechna obecność FQ263 w próbkach środowiskowych wskazuje na wysoką stabilność tego związku, jego tendencję do akumulacji oraz łatwą biodostępność dla roślin. FQ190 był odporny na usuwanie przez biologiczne metody oczyszczania ścieków, dlatego wykryto go we wszystkich rodzajach próbek ścieków, a także w wodach powierzchniowych. Tworzył się również w procesie fitoremediacji CIP oraz ENF, a jego obecność potwierdzono zarówno w wodzie, jak i tkankach roślinnych. Można więc wywnioskować, że FQ190 może być wprowadzany wraz z TWW do środowiska, a także w nim powstawać na skutek działania czynników środowiskowych z macierzystych FQ's. Tradycyjne, biologiczne oczyszczanie ścieków było niewystarczające do usunięcia pozostałości FQ's, co więcej, były źródłem nowych TP's [P2]. Na przykładzie FQ190, FQ288, FQ318, FQ342b oraz FQ348 można wywnioskować, że jeżeli TP's był obecny w ściekach z bioreaktora (AS), to wykryto go również w TWW, a to skutkowało wprowadzaniem go do środowiska wodnego [P2].



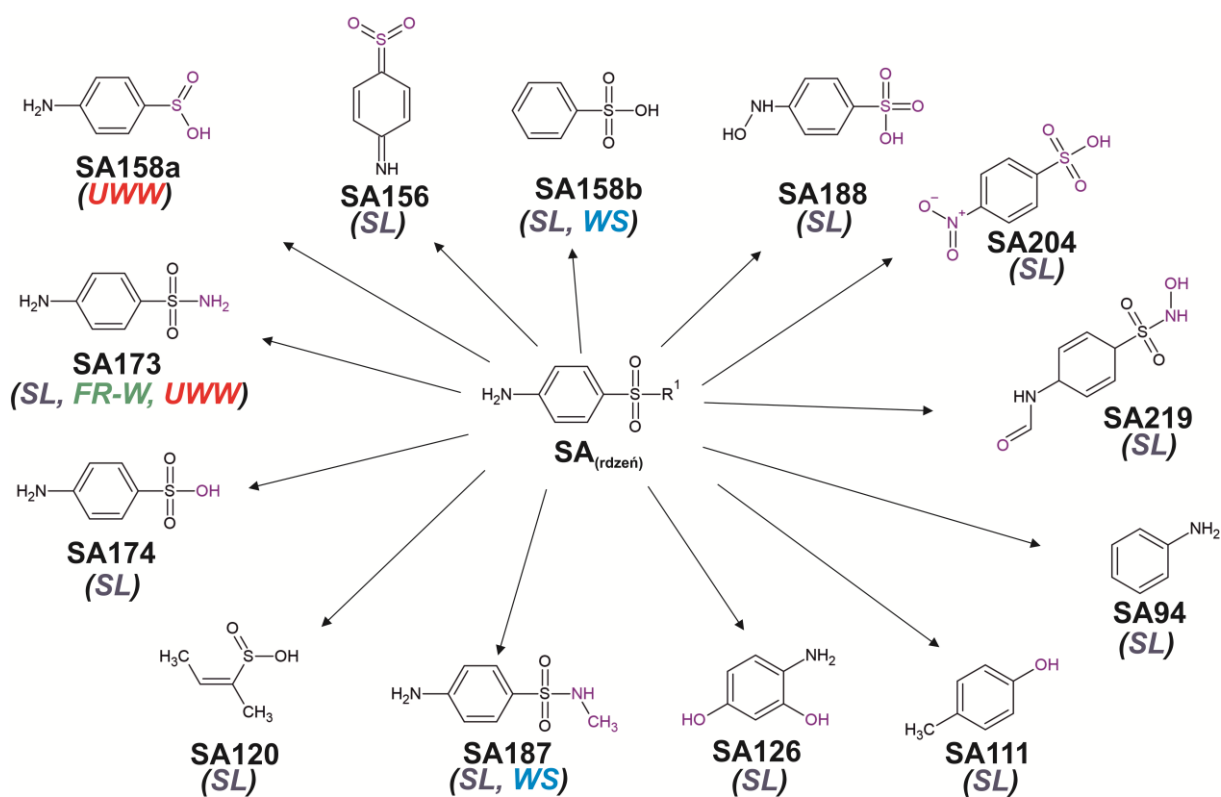
Analizując ścieżki transformacji ENF oraz CIP w procesie fotokatalizy oraz fitoremediacji można zauważyć, że niektóre TPs powstałe w reakcjach utlenienia (FQ376a, FQ360, FQ328) oraz otwarcia i/lub odłączenia jednego z pierścieni (FQ362, FQ350, FQ348, FQ346, FQ334, FQ330a, FQ306, FQ292, FQ291, FQ288, FQ263, FQ223) były tożsame. FQ316a oraz FQ334 powstałe w wyniku otwarcia i utlenienia pierścienia piperazynowego zostały wykryte wyłącznie w wodzie po procesie fotokatalitycznym **[P9]**. Również w wodzie (FQ330b, FQ264) i tkankach roślinnych (FQ374, FQ358, FQ342a, FQ316b) po fitoremediacji zidentyfikowano charakterystyczne dla procesu TPs, powstałe w reakcjach defluoryzacji, hydroksylacji, oksydacji oraz otwarcia pierścienia **[P8]**. Ich tworzenie można tłumaczyć specyficznymi przemianami metabolicznymi rośliny, która po pobraniu macierzystego FQs przekształca go w potencjalnie mniej toksyczne TPs lub aktywnością mikroorganizmów ze strefy korzeniowej.

Pomimo, iż SAs są najczęściej wykrywaną w środowisku grupą leków, to ich ścieżki transformacji w środowisku nie zostały dokładnie opisane. O ile dla najczęściej stosowanego w medycynie i weterynarii SMX można znaleźć informacje o jego TPs, to dla mniej powszechnie stosowanych SAs konieczne jest uzupełnienie tych informacji. Badania przesiewowe przeprowadzono dla próbek wód powierzchniowych i gruntowych **[P1,P4]**, gleb **[P4,P7]**, a w przypadku SMX również tkanek roślinnych **[P5,P6]**. W wodach powierzchniowych wykryto 7 TPs SMX powstałych w reakcjach metylowania (SMX268, SMX281), utleniania (SMX296, SMX208, SMX284) oraz otwarcia pierścienia izoksazolowego (SMX256, SMX244) **[P1,P2]** (Rysunek 16). Nie można jednak jednoznacznie określić źródła pochodzenia oraz charakteru czynników (biotyczne/abiotyczne) wpływających na powstanie wszystkich wymienionych TPs. Jedynie w przypadku SMX244 można zauważyć, że był on również obecny w UWW i nie został usunięty w procesie oczyszczania ścieków, co może sugerować, że to WWTPs mogą być jednym ze źródeł jego wprowadzania do środowiska **[P2]**. SMX244 został również wykryty w próbkach gleb nawożonych obornikiem wzbogaconym SMX, więc może on również powstawać w warunkach środowiskowych **[P4]**. W glebach zanieczyszczonych SMX zidentyfikowano dwa TPs – SMX288 i SMX208 – powstałe w reakcji jego utleniania **[P4,P7]**. SMX256 był obecny w wodzie pobranej po procesie fitoremediacji, co sugeruje, udział czynników biotycznych oraz abiotycznych w jego tworzeniu **[P6]**. Jak wspomniano w rozdziale 2.4, skuteczność usuwania SMX przez roślinę była w zakresie 4 – 28% w zależności od dnia poboru próbki **[P6]**. W tkankach limnobium rozłogowego zidentyfikowano 4 TPs SMX (SMX304, SMX246, SMX445, SMX254), których nie wykryto w innych próbkach środowiskowych. Można zatem przypuszczać, że powstały one w skutek reakcji metabolicznych rośliny po pobraniu SMX. SMX216 został utworzony w reakcji otwarcia pierścienia izoksazolowego i przekształcenia go w grupę karbamidową. Wykryto go zarówno w hodowli hydroponicznej limnobium rozłogowego, jak i w korzeniach pietruszki hodowanej w zanieczyszczonej SMX glebie **[P5,P6]**.

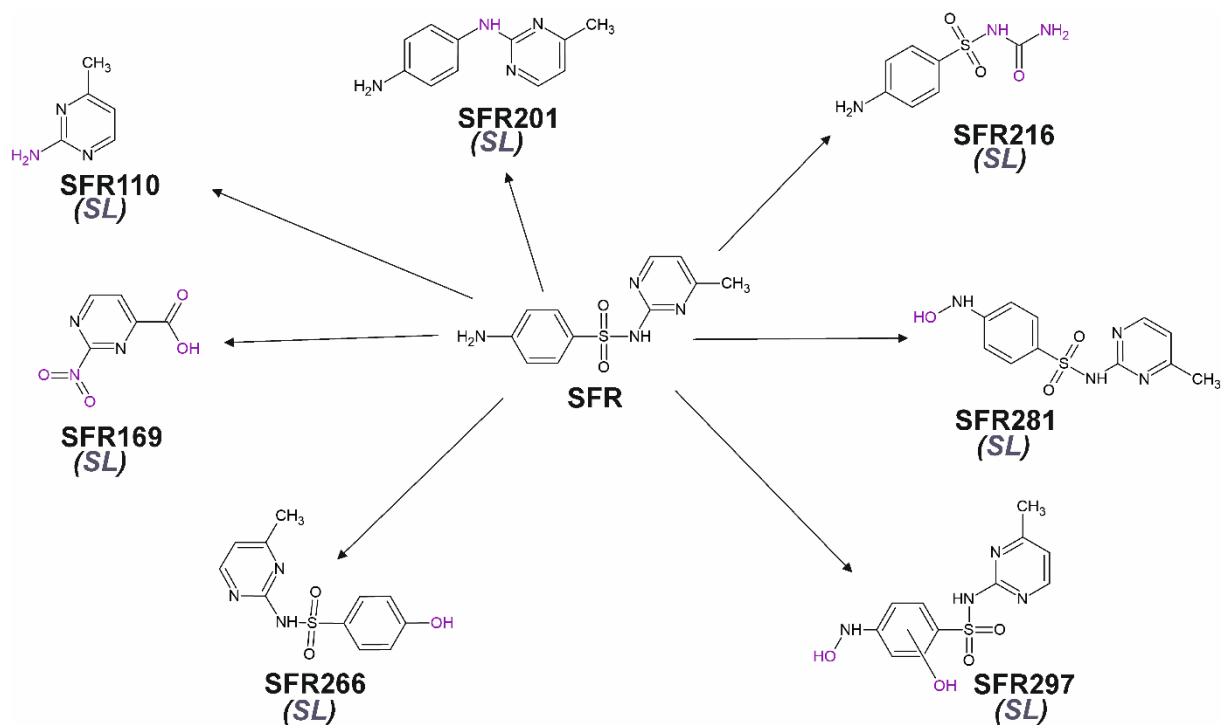
Wszystkie SAs są analogami kwasu *p*-aminobenzenosulfonowego, określanego w literaturze jako rdzeń sulfonamidowy, natomiast różnią się aminą aromatyczną przyłączoną do tego rdzenia [167]. Na podstawie informacji o strukturze aminy aromatycznej możliwe jest przypisanie TPs do konkretnego sulfonamidu, natomiast jeśli zmiany struktury dotyczą rdzenia SA po rozerwaniu wiązania S-N lub N-C, to jest to utrudnione lub niemożliwe. Na rysunku 17



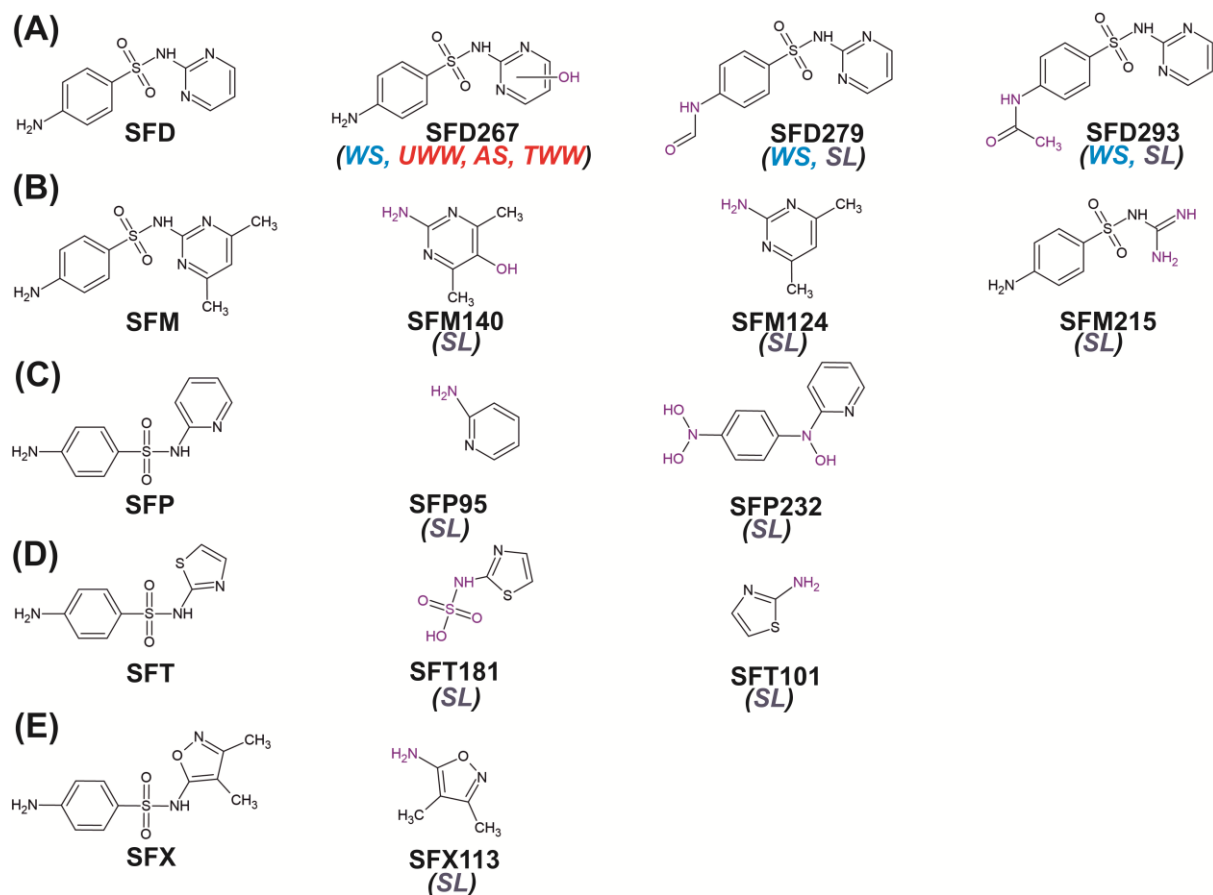
Rysunek 16. Ścieżki transformacji SMX w warunkach środowiskowych oraz w procesach oczyszczania wody i ścieków (WS – wody powierzchniowe, UWW – ścieki nieoczyszczone, TWW – ścieki oczyszczone, AS – ścieki z bioreaktora, PR – roślina korzeń, FR-R – fitoremediacja tkanki roślinne, FT-W – fitoremediacja próbki wody, SL – gleby).



Rysunek 17. Ścieżki transformacji kwasu p-aminobenzenosulfonowego (rdzeń SAs) w próbkach środowiskowych (UWW – ścieki nieoczyszczone, WS – wody powierzchniowe, SL – gleby, FT-W – fitoremediacja próbki wody).



Rysunek 18. Ścieżki transformacji SFR w glebie (SL).



Rysunek 19. Produkty transformacji SFD (A), SFM (B), SFP (C), SFT (D), SFX (E) obecne w próbkach środowiskowych (UWW – ścieki nieoczyszczone, TWW – ścieki oczyszczone, AS – ścieki z bioreaktora, WS – wody powierzchniowe, SL – gleby).

przedstawiono TPs powstałe w wyniku przekształceń kwasu *p*-aminobenzenosulfonowego zidentyfikowane w próbkach gleb, wód oraz ścieków [P2,P4,P7]. W większości przypadków TPs tworzyły się w reakcjach przyłączenia grupy hydroksylowej oraz rozerwania wiązania C-N w obrębie rdzenia SAs.

Strukturalnie SFM oraz SFR różnią się od siebie jedną grupą metylową przyłączoną do pierścienia pirymidynowego, dlatego ścieżki ich degradacji mogą się pokrywać. Na rysunkach 18 oraz 19B przedstawiono TPs obu tych związków, wykryte w próbkach gleb zebranych na terenie województwa śląskiego [P7]. TPs przypisano do SFR oraz SFM na podstawie informacji literaturowych [168–170], jednak nie można wykluczyć, że mogą one powstawać w wyniku transformacji obu tych związków. Siedem TPs SFR oraz trzy TPs SFM powstało w reakcjach: utraty grupy SO<sub>2</sub> (SFR201), otwarcia pierścienia pirymidynowego (SFR216, SFM215), zerwania wiązania S-N (SFR110, SFR169, SFM124) oraz utleniania (SFR266, SFR281, SFR297, SFM140) [P7]. Nie można jednak jednoznacznie określić, czy do transformacji wskazanych SAs doszło bezpośrednio w środowisku, czy zostały one wprowadzone wraz z TPs ze źródła zewnętrznego. Trzy TPs SFD zostały wykryte w wodach powierzchniowych [P1], glebach [P6] oraz ściekach [P2] (Rysunek 19A). SFD267 powstał w wyniku hydroksylacji pierścienia pirymidynowego (najczęściej w pozycji C4 lub C5) i jest on metabolitem powszechnie wykrywanym w odchodach zwierząt oraz ludzi leczonych preparatami zawierającymi SFD [171]. Obecność SFD267 w TWW wskazuje na jego wysoką stabilność i odporność na biologiczne metody oczyszczania ścieków [P2]. SFD279 oraz SFD293 powstały w wyniku przyłączenia odpowiednio grupy karbonylowej lub acetylowej do grupy aminowej w pierścieniu *p*-aminobenzenosulfonowym. Zarówno SFD279, jak i SFD293 zostały wykryte w próbkach wód powierzchniowych [P1] oraz glebach [P6] pobranych na terenie zurbanizowanych miast województwa śląskiego. Warto zauważyć, że badania przesiewowe wód powierzchniowych były przeprowadzone na przełomie lat 2019/2020, natomiast gleb 2022/2023, co może sugerować, że oba TPs są stabilne w środowisku, stale do niego wprowadzane lub zdolne do migracji. Pozostałości SFT, SFP oraz SFX zostały oznaczone w nielicznych próbkach gleb, natomiast nie wykryto ich w próbkach wód powierzchniowych. Ich TPs powstały w reakcjach zerwania wiązania S-N (SFP95, SFT101, SFX113), S-C (SFT181) oraz hydroksylowania (SFP232) [P6] (Rysunek 19C – E).

Podsumowując, TPs AMs z grup SAs, TCs, FQs oraz MQs mogą być wprowadzane do środowiska tymi samymi drogami co macierzyste leki lub w nim powstawać w wyniku działania czynników środowiskowych. TPs AMs można podzielić na uniwersalne, które są obecne we wszystkich rodzajach próbek środowiskowych oraz specyficzne, charakterystyczne dla rodzaju próbki lub procesu. To zróżnicowanie może mieć istotne znaczenie dla skutecznej identyfikacji i monitorowania ich losów w środowisku. Tradycyjne metody oczyszczania ścieków oparte na osadzie czynnym nie tylko nie są skuteczne w usuwaniu zanieczyszczeń AMs, ale również prowadzą do powstawania ich TPs. Udowodniono, że TPs które nie zostaną usunięte ze ścieków w procesie ich oczyszczania, są wprowadzane do środowiska wraz z TWW [P2]. Zastosowanie alternatywnych metod oczyszczania wody (fotokataliza, fitoremediacja) z wybranych AMs również prowadzi do tworzenia się ich TPs. W żadnych z zastosowanych warunków procesu fotokatalizy heterogenicznej (rodzaj fotokatalizatora, irradancja) nie zaobserwowano pełnej mineralizacji próbki [P3,P9]. W zależności od rodzaju

zastosowanego fotokatalizatora obserwowano tworzenie się różnych TPs **[P9]**. W próbkach wody oraz tkanek roślinnych po fitoremediacji również wykryto TPs wybranych AMs **[P6,P8]**. Zdolność do bioakumulacji TPs w roślinie jest obiecująca, ponieważ mogą one być stosunkowo łatwo zbierane i poddane procesom przetwarzania (kompostowanie, obróbka termiczna, biodegradacja), co pozwoli uniknąć ponownego wprowadzenia tych zanieczyszczeń do środowiska.

## Podsumowanie i wnioski

Rozwój przemysłu farmaceutycznego na przestrzeni ostatnich 80 lat spowodował, że AMs stały się powszechnymi zanieczyszczeniami środowiska naturalnego. Jako ich główne drogi wprowadzania do środowiska najczęściej wymienia się oczyszczalnie ścieków oraz spływy z pól rolnych nawożonych odchodami zwierzęcymi. **W ramach rozprawy doktorskiej oceniono, w jakim stopniu oba wymienione źródła punktowe przyczyniają się do wprowadzania i rozpowszechniania pozostałości AMs w środowisku wodnym i lądowym.** W pierwszej kolejności na podstawie dostępnych raportów oraz analiz spożycia leków na terenie Polski wybrano 22 AMs (AMOX, AMP, TC, OTC, DOX, CIP, ENF, LVF, TYL, CLR, MET, TRI, SMX, SFD, VAN, CLD, SFP, SFM, SFT, SFR, SFH, SFX), które były najczęściej stosowane w medycynie oraz weterynarii na przestrzeni ostatnich 15 lat. Następnie opracowano metody ich wydzielenia oraz oznaczania w próbkach środowiskowych (woda, ścieki, gleby, tkanki roślinne) z użyciem LC-MS/MS. Metody zwalidowano i zastosowano do badań przesiewowych próbek środowiskowych. Do analizy celowanej z powodzeniem zastosowano LC-MS/MS w trybie akwizycji MRM. Wydzielenie AMs z próbek wód gruntowych, powierzchniowych oraz ścieków przeprowadzono z zastosowaniem SPE. Natomiast do przygotowania matrycy stałej (gleba, rośliny) zastosowano SLE lub łączoną SLE-SPE. Ostatecznie z powodzeniem opracowano metody ekstrakcji dla 20 spośród 22 wybranych AMs. Ze względu na dużą niestabilność  $\beta$ -laktamów (AMOX, AMP), ich podatność na hydrolizę i szybką degradację w warunkach laboratoryjnych, zrezygnowano z poszukiwania ich w próbkach środowiskowych. Parametry walidacyjne opracowanych metod wydzielenia i oznaczania AMs były porównywalne lub lepsze od parametrów metod opisanych w literaturze naukowej.

Ocenę wpływu oczyszczalni ścieków jako źródła wprowadzającego AMs do środowiska, przeprowadzono poprzez monitorowanie składu ścieków doprowadzanych oraz odprowadzanych z niej do sąsiadującej rzeki na przestrzeni od lutego do września 2019 roku. Zauważono, że skuteczność oczyszczania ścieków z pozostałości AMs zależy od ich stężenia i składu ścieków doprowadzanych do oczyszczalni oraz pory roku. Po procesie oczyszczania obserwowano spadek stężenia wybranych AMs w ściekach, jednakże nie zostały one całkowicie usunięte. Ponadto, im wyższe było stężenie AMs w próbkach ścieków nieoczyszczonych, tym wyższe oznaczono w ściekach oczyszczonych. **Obecność AMs w wodzie rzecznej pobranej za punktem zrzutu ścieków oczyszczonych potwierdziła, że oczyszczalnie ścieków są jednym z głównych źródeł wprowadzania AMs do środowiska. Zaobserwowano także, że wprowadzane do rzeki AMs, a w szczególności SAs są stabilne i mogą akumulować się w środowisku wodnym. Obserwacje te potwierdziły wyniki badań przesiewowych wód powierzchniowych, przeprowadzonych na terenach wybranych miejscowości województwa śląskiego. SMX, SFD oraz SFP zostały wykryte w ilościach śladowych w wodach powierzchniowych na terenie miasta Tychy oraz Mikołowa.**

Zanieczyszczenie środowiska AMs poprzez spływy z pól rolnych związane jest ze stosowaniem obornika pochodzącego od zwierząt po leczeniu farmakologicznym. **Po wprowadzeniu do gleby pozostałości AMs wraz z obornikiem zwierzęcym, ich los zależy głównie od ich właściwości fizykochemicznych, takich jak: właściwości sorpcyjne,**



**rozpuszczalność w wodzie, stabilność na czynniki środowiskowe oraz biodostępność dla roślin.** Na podstawie przeprowadzonego badania terenowego oceniono mobilność, stabilność oraz biodostępność 4 najczęściej stosowanych leków weterynaryjnych – DOX, ENF, SMX oraz TYL. **Potwierdzono, że losy AMs w glebie są determinowane przez ich właściwości fizykochemiczne.** DOX, ENF oraz TYL wykazywały tendencję do akumulacji w glebie i ulegały powolnej degradacji przez 4 miesiące, podczas gdy SMX został wymyty przez opady atmosferyczne. Dodatkowo ENF i DOX charakteryzowały się dobrą biodostępnością dla rosnącej na glebie pietruszki zwyczajnej, ponieważ zostały wykryte zarówno w korzeniu, jak i w części nadziemnej rośliny. **Potwierdzona mobilność SMX w rolniczym ekosystemie hydrogeologicznym była podstawą do przeprowadzenia badań monitoringowych gleb na terenie województwa śląskiego, w celu określenia rozpowszechnienia SAs.** Kryterium wyboru miejsca poboru próbek była zwiększona aktywność zwierząt gospodarskich lub domowych wolno wychodzących na wskazanym obszarze. **W próbkach gleb zebranych na terenach miejskich i podmiejskich zidentyfikowano wszystkie z 8 wybranych SAs, a największe ich ilości oznaczono na terenach wybiegów dla psów oraz polach uprawnych.** Stężenia SAs w próbkach zebranych na terenach wybiegów dla psów były znacznie wyższe niż oznaczone w próbkach zebranych z pól uprawnych. Oznacza to, że duża rotacja oraz zwiększona aktywność psów na terenach o ograniczonej powierzchni sprzyja akumulacji SAs. **Na podstawie obu badań potwierdzono, że odchody zwierząt gospodarskich oraz domowych, które były leczone farmakologicznie, stanowią istotne źródło wprowadzania AMs do środowiska.**

Niska skuteczność tradycyjnych, biologicznych metod oczyszczania ścieków z pozostałości AMs, była przyczyną poszukiwania alternatywnych metod ich usuwania, zarówno ze ścieków, jak i z wód powierzchniowych. **W ramach rozprawy doktorskiej oceniono skuteczność usuwania wybranych AMs z wody z użyciem dwóch alternatywnych metod – fitoremediacji oraz fotokatalizy heterogenicznej.** Fotokataliza heterogeniczna była najskuteczniejszą metodą usuwania AMs z wody oraz ścieków nieoczyszczonych. Stosując jako fotokatalizator  $\text{TiO}_2\text{-P25}$  oraz irradancję  $500 \text{ W/m}^2$ , możliwe było całkowite usunięcie pozostałości CIP, ENF, LVF, MET oraz częściowo CLR o początkowym stężeniu  $1 \text{ mg/l}$  w trakcie 120-minutowego procesu. **Poważnym ograniczeniem fotokatalizy jest możliwość dezaktywacji katalizatora przez składniki matrycy ścieków, które mogą adsorbować się na jego powierzchni oraz hamować reakcje fotokatalityczne poprzez pochłanianie promieniowania świetlnego.** Ponadto, zastosowanie łagodnych warunków fotokatalitycznych, symulujących średnią irradancję słoneczną w Polsce nie prowadzi do pełnej mineralizacji AMs w próbce.

Fitoremediacja może być traktowana jako tania i skuteczna metoda oczyszczania wody z pozostałości AMs. Skuteczność pobierania AMs z wody zależy od gatunku zastosowanej rośliny, właściwości fizykochemicznych związku oraz jego początkowego stężenia. **W procesie fitoremediacji zanieczyszczenia są usuwane głównie na skutek działania czynników biotycznych (pobieranie przez roślinę, rozkład mikrobiologiczny) oraz abiotycznych (fotoliza, hydroliza).** To, który z czynników będzie dominujący zależy od właściwości fizykochemicznych AMs. Aby fitoremediacja była skuteczna, niezbędne jest zapewnienie optymalnych warunków wzrostu i rozwoju dla rośliny, co może ograniczyć jej zastosowanie do oczyszczania wód powierzchniowych oraz ścieków oczyszczonych.

**Jednym z głównych założeń rozprawy doktorskiej było uzupełnienie luki badawczej dotyczącej transformacji AMs w środowisku.** Aby zidentyfikować produkty transformacji AMs w próbkach środowiskowych wykonano analizę przesiewową oraz niecelowaną, z użyciem LC-MS/MS w różnych trybach pracy spektrometru mas. Produkty transformacji AMs były obecne we wszystkich próbkach, w których wykryte zostały macierzyste farmaceutyki.

Zidentyfikowano łącznie 119 TP's we wszystkich rodzajach próbek środowiskowych. Zaobserwowano, że produkty transformacji są odporne na biologiczne metody oczyszczania ścieków lub powstają w trakcie procesów oczyszczania, przez co są obecne w ściekach oczyszczonych, a następnie wprowadzane do środowiska wodnego. Co więcej, produkty transformacji mogą charakteryzować się większą stabilnością i tendencją do akumulacji w środowisku w porównaniu do macierzystego leku, czego przykładem są produkty transformacji SMX oraz SFD wykryte we wszystkich próbkach wód powierzchniowych na terenie Śląska. **Do transformacji AMs może dochodzić również po wprowadzeniu ich do gleby.** W glebie nawożonej obornikiem wzbogaconym mieszaniną DOX, TYL, SMX oraz ENF po 133 dniach zidentyfikowano 16 produktów transformacji powstałych w reakcjach utleniania, karbonylowania oraz otwarcia pierścienia. Po pobraniu przez roślinę, AMs również ulegają transformacjom, prawdopodobnie na skutek działania metabolizmu wtórnego u roślin, który odpowiada za dostosowanie się organizmu do zmiennych warunków środowiskowych i detoksyfikację. **Na podstawie wyników badań ekstraktów z korzeni i liści pietruszki zwyczajnej oraz rzodkwi japońskiej udowodniono, że tak jak w przypadku AMs, ich TP's również podlegają dystrybucji tkankowej w roślinie i mogą być przez nią akumulowane.** Pomimo całkowitego usunięcia AMs z wody oraz ścieków w procesie fotokatalizy heterogenicznej, ich produkty transformacji były obecne w mieszaninach poreakcyjnych. Rodzaj powstałych produktów transformacji zależał od warunków procesu, a w szczególności rodzaju fotokatalizatora, który wpływał na kinetykę reakcji i mógł preferencyjnie prowadzić do tworzenia się określonego rodzaju TP's.

Na podstawie wyników badań otrzymanych w trakcie realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej, można z pełnym przekonaniem stwierdzić, że **zrealizowano wszystkie założone cele badawcze oraz udowodniono, że możliwa jest jednoczesna identyfikacja AMs oraz ich produktów transformacji z użyciem LC-MS/MS pracującego w różnych trybach pracy spektrometru mas.** Rozprawa poszerza dotychczasową wiedzę na temat źródeł uwalniania pozostałości farmaceutycznych oraz ich rozprzestrzeniania się w środowisku. Badania wstępne wykazały, że fotokataliza stanowi obiecującą metodę usuwania AMs z wody oraz ścieków. Należy jednak zaznaczyć, że aby wykorzystać jej pełen potencjał, konieczne jest kontynuowanie badań pod kątem poszukiwania nowych rodzajów fotokatalizatorów, które umożliwią zwiększenie stopnia mineralizacji próbki, z zastosowaniem irradiancji zbliżonej do naturalnego promieniowania słonecznego. Fitoremediacja, chociaż skuteczna w usuwaniu AMs, ma swoje ograniczenia i może być stosowana jako etap doczyszczania ścieków po procesie oczyszczania biologicznego. Aby w pełni wykorzystać potencjał fitoremediacji, konieczne jest przetestowanie większej liczby gatunków roślin w celu wytypowania tych, które wykazują tendencję do hiperakumulacji AMs. Ścieżki transformacji wybranych AMs, opracowane w ramach rozprawy doktorskiej, stanowią znaczące uzupełnienie luki literaturowej dotyczącej ich przemian po wprowadzeniu do środowiska. Kontynuacją tych prac będą badania ekotoksyczności na różnych poziomach troficznych, które pomogą w określeniu potencjalnie negatywnego wpływu na środowisko i ludzkie zdrowie obecnych w środowisku TP's.

## Bibliografia

1. Davies, J. Where Have All the Antibiotics Gone? *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* **2006**, *17*, 287–290.
2. Olczak-Pieńkowska, A. Monitorowanie Zużycia Antybiotyków Pomocą Metodologii ATC/DDD, Jako Jedno z Narzędzi z Antybiotykoopornością. *Narodowy Program Ochrony Antybiotyków* 2013, 1–9.
3. World Health Organization *WHO Report on Surveillance of Antibiotic Consumption 2016-2018 Early Implementation*; Geneva, 2018; ISBN 9789241514880.
4. European Centre for Disease Prevention and Control *Antimicrobial Consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) AER for 2021*; Stockholm, 2021;
5. European Centre for Disease Prevention and Control *Antimicrobial Consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) AER for 2020*; Stockholm, 2020;
6. Van Boeckel, T.P.; Brower, C.; Gilbert, M.; Grenfell, B.T.; Levin, S.A.; Robinson, T.P.; Teillant, A.; Laxminarayan, R. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112*, 5649–5654, doi:10.1073/pnas.1503141112.
7. Parlament Europejski Unii Europejskiej *Rozporządzenie (WE) Nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z Dnia 22 Sierpnia 2003 r.w Sprawie Dodatków Stosowanych w Żywieniu Zwierząt*; EUR-lex, 2003; pp. 1–29;.
8. Zha, Y.; Li, Q.; Liu, H.; Ge, Y.; Wei, Y.; Wang, H.; Zhang, L.; Fan, J.; Chen, Y.; Zhang, C.; et al. Occurrence and Ecological Risk Assessment of Antibiotics in Manure and the Surrounding Soil from Typical Chicken Farms in Hangzhou, China. *Front Environ Sci* **2023**, *11*, doi:10.3389/fenvs.2023.1241405.
9. Marutescu, L.G.; Jaga, M.; Postolache, C.; Barbuceanu, F.; Milita, N.M.; Romascu, L.M.; Schmitt, H.; de Roda Husman, A.M.; Sefeedpari, P.; Glaeser, S.; et al. Insights into the Impact of Manure on the Environmental Antibiotic Residues and Resistance Pool. *Front Microbiol* **2022**, *13*, doi:10.3389/fmicb.2022.965132.
10. Slana, M.; Pahor, V.; Cvitkovič Maričič, L.; Sollner-Dolenc, M. Excretion Pattern of Enrofloxacin after Oral Treatment of Chicken Broilers. *J Vet Pharmacol Ther* **2014**, *37*, 611–614, doi:10.1111/jvp.12130.
11. Sanchuki, C.E.; Soccol, C.R.; de Carvalho, J.C.; Soccol, V.T.; do Nascimento, C.; Woiciechowski, A.L. Evaluation of Poultry Litter Traditional Composting Process. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2011**, *54*, 1053–1058, doi:10.1590/S1516-89132011000500024.
12. Wegst-Uhrich, S.R.; Navarro, D.A.; Zimmerman, L.; Aga, D.S. Assessing Antibiotic Sorption in Soil: A Literature Review and New Case Studies on Sulfonamides and Macrolides. *Chem Cent J* **2014**, *8*, 1.
13. Leal, R.M.P.; Alleoni, L.R.F.; Tornisielo, V.L.; Regitano, J.B. Sorption of Fluoroquinolones and Sulfonamides in 13 Brazilian Soils. *Chemosphere* **2013**, *92*, 979–985, doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.018.
14. Xu, Y.; Yu, X.; Xu, B.; Peng, D.; Guo, X. Sorption of Pharmaceuticals and Personal Care Products on Soil and Soil Components: Influencing Factors and Mechanisms. *Science of the Total Environment* **2021**, *753*, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141891.
15. Lertpaitoonpan, W.; Ong, S.K.; Moorman, T.B. Effect of Organic Carbon and PH on Soil Sorption of Sulfamethazine. *Chemosphere* **2009**, *76*, 558–564, doi:10.1016/j.chemosphere.2009.02.066.
16. Call, J.J.; Rakshit, S.; Essington, M.E. The Adsorption of Tylosin by Montmorillonite and Vermiculite: Exchange Selectivity and Intercalation. *Soil Science Society of America Journal* **2019**, *83*, 584–596, doi:10.2136/sssaj2018.12.0475.
17. Bai, L.; Cao, C.; Wang, C.; Wang, C.; Zhang, H.; Jiang, H. Roles of Phytoplankton- and Macrophyte-Derived Dissolved Organic Matter in Sulfamethazine Adsorption on Goethite. *Environmental Pollution* **2017**, *230*, 87–95, doi:10.1016/j.envpol.2017.06.032.
18. Guo, X.; Ge, J.; Yang, C.; Wu, R.; Dang, Z.; Liu, S. Sorption Behavior of Tylosin and Sulfamethazine on Humic Acid: Kinetic and Thermodynamic Studies. *RSC Adv* **2015**, *5*, 58865–58872, doi:10.1039/c5ra08684a.
19. Wang, N.; Guo, X.; Xu, J.; Hao, L.; Kong, D.; Gao, S. Sorption and Transport of Five Sulfonamide Antibiotics in Agricultural Soil and Soil–Manure Systems. *J Environ Sci Health B* **2015**, *50*, 23–33, doi:10.1080/03601234.2015.965612.

20. Albero, B.; Tadeo, J.L.; Escario, M.; Miguel, E.; Pérez, R.A. Persistence and Availability of Veterinary Antibiotics in Soil and Soil-Manure Systems. *Science of the Total Environment* **2018**, *643*, 1562–1570, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.06.314.
21. Herklotz, P.A.; Gurung, P.; Vanden Heuvel, B.; Kinney, C.A. Uptake of Human Pharmaceuticals by Plants Grown under Hydroponic Conditions. *Chemosphere* **2010**, *78*, 1416–1421, doi:10.1016/j.chemosphere.2009.12.048.
22. Rodriguez-Mozaz, S.; Vaz-Moreira, I.; Varela Della Giustina, S.; Llorca, M.; Barceló, D.; Schubert, S.; Berendonk, T.U.; Michael-Kordatou, I.; Fatta-Kassinos, D.; Martinez, J.L.; et al. Antibiotic Residues in Final Effluents of European Wastewater Treatment Plants and Their Impact on the Aquatic Environment. *Environ Int* **2020**, *140*, 105733, doi:10.1016/j.envint.2020.105733.
23. Samrot, A. V.; Wilson, S.; Sanjay Preeth, R.S.; Prakash, P.; Sathiyasree, M.; Saigeetha, S.; Shobana, N.; Pachiyappan, S.; Rajesh, V.V. Sources of Antibiotic Contamination in Wastewater and Approaches to Their Removal—An Overview. *Sustainability (Switzerland)* **2023**, *15*.
24. Stošić, M.; Čučak, D.; Kovačević, S.; Perović, M.; Radonić, J.; Turk Sekulić, M.; Vojinović Miloradov, M.; Radnović, D. Meat Industry Wastewater: Microbiological Quality and Antimicrobial Susceptibility of *E. Coli* and *Salmonella* Sp. Isolates, Case Study in Vojvodina, Serbia. *Water Science and Technology* **2016**, *73*, 2509–2517, doi:10.2166/wst.2016.113.
25. Zhang, H.; Zou, H.; Zhao, L.; Li, X. Seasonal Distribution and Dynamic Evolution of Antibiotics and Evaluation of Their Resistance Selection Potential and Ecotoxicological Risk at a Wastewater Treatment Plant in Jinan, China. *Environmental Science and Pollution Research* **2023**, *30*, 44505–44517, doi:10.1007/s11356-023-25202-6.
26. Achermann, S.; Bianco, V.; Mansfeldt, C.B.; Vogler, B.; Kolvenbach, B.A.; Corvini, P.F.X.; Fenner, K. Biotransformation of Sulfonamide Antibiotics in Activated Sludge: The Formation of Pterin-Conjugates Leads to Sustained Risk. *Environ Sci Technol* **2018**, *52*, 6265–6274, doi:10.1021/acs.est.7b06716.
27. Kennedy Neth, N.L.; Carlin, C.M.; Keen, O.S. Emerging Investigator Series: Transformation of Common Antibiotics during Water Disinfection with Chlorine and Formation of Antibacterially Active Products. *Environ Sci Water Res Technol* **2019**, *5*, 1222–1233, doi:10.1039/c9ew00182d.
28. Harnisz, M.; Korzeniewska, E. The Prevalence of Multidrug-Resistant *Aeromonas* Spp. in the Municipal Wastewater System and Their Dissemination in the Environment. *Science of the Total Environment* **2018**, *626*, 377–383, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.100.
29. Voigt, A.M.; Ciorba, P.; Döhla, M.; Exner, M.; Felder, C.; Lenz-Plet, F.; Sib, E.; Skutlarek, D.; Schmithausen, R.M.; Faerber, H.A. The Investigation of Antibiotic Residues, Antibiotic Resistance Genes and Antibiotic-Resistant Organisms in a Drinking Water Reservoir System in Germany. *Int J Hyg Environ Health* **2020**, *224*, doi:10.1016/j.ijheh.2020.113449.
30. Bengtsson-Palme, J.; Milakovic, M.; Švecová, H.; Ganjto, M.; Jonsson, V.; Grabic, R.; Udikovic-Kolic, N. Industrial Wastewater Treatment Plant Enriches Antibiotic Resistance Genes and Alters the Structure of Microbial Communities. *Water Res* **2019**, *162*, 437–445, doi:10.1016/j.watres.2019.06.073.
31. Fouz, N.; Pangesti, K.N.A.; Yasir, M.; Al-Malki, A.L.; Azhar, E.I.; Hill-Cawthorne, G.A.; El Ghany, M.A. The Contribution of Wastewater to the Transmission of Antimicrobial Resistance in the Environment: Implications of Mass Gathering Settings. *Trop Med Infect Dis* **2020**, *5*, doi:10.3390/tropicalmed5010033.
32. Rolbiecki, D.; Harnisz, M.; Korzeniewska, E.; Jałowiecki, Ł.; Płaza, G. Occurrence of Fluoroquinolones and Sulfonamides Resistance Genes in Wastewater and Sludge at Different Stages of Wastewater Treatment: A Preliminary Case Study. *Applied Sciences (Switzerland)* **2020**, *10*, doi:10.3390/app10175816.
33. Christou, A.; Agüera, A.; Bayona, J.M.; Cytryn, E.; Fotopoulos, V.; Lambropoulou, D.; Manaia, C.M.; Michael, C.; Revitt, M.; Schröder, P.; et al. The Potential Implications of Reclaimed Wastewater Reuse for Irrigation on the Agricultural Environment: The Knowns and Unknowns of the Fate of Antibiotics and Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes – A Review. *Water Res* **2017**, *123*, 448–467, doi:10.1016/j.watres.2017.07.004.
34. Voigt, M.; Bartels, I.; Nickisch-Hartfiel, A.; Jaeger, M. Determination of Minimum Inhibitory Concentration and Half Maximal Inhibitory Concentration of Antibiotics and Their Degradation Products to Assess the Eco-Toxicological Potential. *Toxicol Environ Chem* **2019**, *101*, 315–338, doi:10.1080/02772248.2019.1687706.
35. Borecka, M.; Białk-Bielińska, A.; Haliński, Ł.P.; Pazdro, K.; Stepnowski, P.; Stolte, S. The Influence of Salinity on the Toxicity of Selected Sulfonamides and Trimethoprim towards the Green Algae *Chlorella Vulgaris*. *J Hazard Mater* **2016**, *308*, 179–186, doi:10.1016/j.jhazmat.2016.01.041.

36. Baumann, M.; Weiss, K.; Maletzki, D.; Schüssler, W.; Schudoma, D.; Kopf, W.; Kühnen, U. Aquatic Toxicity of the Macrolide Antibiotic Clarithromycin and Its Metabolites. *Chemosphere* **2015**, *120*, 192–198, doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.089.
37. Kołodziejska, M.; Maszkowska, J.; Białk-Bielińska, A.; Steudte, S.; Kumirska, J.; Stepnowski, P.; Stolte, S. Aquatic Toxicity of Four Veterinary Drugs Commonly Applied in Fish Farming and Animal Husbandry. *Chemosphere* **2013**, *92*, 1253–1259, doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.057.
38. Isidori, M.; Lavorgna, M.; Nardelli, A.; Pascarella, L.; Parrella, A. Toxic and Genotoxic Evaluation of Six Antibiotics on Non-Target Organisms. *Science of the Total Environment* **2005**, *346*, 87–98, doi:10.1016/j.scitotenv.2004.11.017.
39. World Health Organization *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*; WHO: Geneva, 2015; ISBN 9789241509763.
40. Rabølle, M.; Spliid, N.H. Sorption and Mobility of Metronidazole, Olaquinox, Oxytetracycline and Tylosin in Soil. *Chemosphere* **2000**, *40*, 715–722, doi:10.1016/S0045-6535(99)00442-7.
41. Kodešová, R.; Grabic, R.; Kočárek, M.; Klement, A.; Golovko, O.; Fér, M.; Nikodem, A.; Jakšík, O. Pharmaceuticals' Sorptions Relative to Properties of Thirteen Different Soils. *Science of the Total Environment* **2015**, *511*, 435–443, doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.088.
42. Sassman, S.A.; Lee, L.S. Sorption of Three Tetracyclines by Several Soils: Assessing the Role of PH and Cation Exchange. *Environ Sci Technol* **2005**, *39*, 7452–7459, doi:10.1021/es0480217.
43. Wang, N.; Guo, X.; Xu, J.; Hao, L.; Kong, D.; Gao, S. Sorption and Transport of Five Sulfonamide Antibiotics in Agricultural Soil and Soil–Manure Systems. *J Environ Sci Health B* **2015**, *50*, 23–33, doi:10.1080/03601234.2015.965612.
44. Wang, S.; Wang, H. Adsorption Behavior of Antibiotic in Soil Environment: A Critical Review. *Front Environ Sci Eng* **2015**, *9*, 565–574.
45. Rosendahl, I.; Siemens, J.; Groeneweg, J.; Linzbach, E.; Laabs, V.; Herrmann, C.; Vereecken, H.; Amelung, W. Dissipation and Sequestration of the Veterinary Antibiotic Sulfadiazine and Its Metabolites under Field Conditions. *Environ Sci Technol* **2011**, *45*, 5216–5222, doi:10.1021/es200326t.
46. Haham, H.; Oren, A.; Chefetz, B. Insight into the Role of Dissolved Organic Matter in Sorption of Sulfapyridine by Semiarid Soils. *Environ Sci Technol* **2012**, *46*, 11870–11877, doi:10.1021/es303189f.
47. Thiele-Bruhn, S.; Aust, M.O. Effects of Pig Slurry on the Sorption of Sulfonamide Antibiotics in Soil. *Arch Environ Contam Toxicol* **2004**, *47*, 31–39, doi:10.1007/s00244-003-3120-8.
48. Zhang, H.; Zhou, Y.; Huang, Y.; Wu, L.; Liu, X.; Luo, Y. Residues and Risks of Veterinary Antibiotics in Protected Vegetable Soils Following Application of Different Manures. *Chemosphere* **2016**, *152*, 229–237, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.111.
49. García-Galán, M.J.; Díaz-Cruz, S.; Barceló, D. Multiresidue Trace Analysis of Sulfonamide Antibiotics and Their Metabolites in Soils and Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction Followed by Liquid Chromatography-Electrospray-Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2013**, *1275*, 32–40, doi:10.1016/j.chroma.2012.12.004.
50. Łukaszewicz, P.; Kumirska, J.; Białk-Bielińska, A.; Dołzonek, J.; Stepnowski, P. Assessment of Soils Contamination with Veterinary Antibiotic Residues in Northern Poland Using Developed MAE-SPE-LC/MS/MS Methods. *Environmental Science and Pollution Research* **2017**, *24*, 21233–21247, doi:10.1007/s11356-017-9757-z.
51. Hu, Y.; Yan, X.; Shen, Y.; Di, M.; Wang, J. Antibiotics in Surface Water and Sediments from Hanjiang River, Central China: Occurrence, Behavior and Risk Assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* **2018**, *157*, 150–158, doi:10.1016/j.ecoenv.2018.03.083.
52. Zhao, F.; Chen, L.; Yang, L.; Li, S.; Sun, L.; Yu, X. Distribution, Dynamics and Determinants of Antibiotics in Soils in a Peri-Urban Area of Yangtze River Delta, Eastern China. *Chemosphere* **2018**, *211*, 261–270, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.07.162.
53. Pan, M.; Wong, C.K.C.; Chu, L.M. Distribution of Antibiotics in Wastewater-Irrigated Soils and Their Accumulation in Vegetable Crops in the Pearl River Delta, Southern China. *J Agric Food Chem* **2014**, *62*, 11062–11069, doi:10.1021/jf503850v.
54. Duong, H.A.; Phung, T.V.; Nguyen, T.N.; Phan Thi, L.A.; Pham, H.V. Occurrence, Distribution, and Ecological Risk Assessment of Antibiotics in Selected Urban Lakes of Hanoi, Vietnam. *J Anal Methods Chem* **2021**, *2021*, doi:10.1155/2021/6631797.

55. Li, L.; Liu, D.; Zhang, Q.; Song, K.; Zhou, X.; Tang, Z.; Zhou, X. Occurrence and Ecological Risk Assessment of Selected Antibiotics in the Freshwater Lakes along the Middle and Lower Reaches of Yangtze River Basin. *J Environ Manage* **2019**, *249*, 109396, doi:10.1016/j.jenvman.2019.109396.
56. García-Galán, M.J.; Díaz-Cruz, M.S.; Barceló, D. Determination of 19 Sulfonamides in Environmental Water Samples by Automated On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (SPE-LC-MS/MS). *Talanta* **2010**, *81*, 355–366, doi:10.1016/j.talanta.2009.12.009.
57. Mirzaei, R.; Mesdaghinia, A.; Hoseini, S.S.; Yunesian, M. Antibiotics in Urban Wastewater and Rivers of Tehran, Iran: Consumption, Mass Load, Occurrence, and Ecological Risk. *Chemosphere* **2019**, *221*, 55–66, doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.187.
58. Dan, A.; Zhang, X.; Dai, Y.; Chen, C.; Yang, Y. Occurrence and Removal of Quinolone, Tetracycline, and Macrolide Antibiotics from Urban Wastewater in Constructed Wetlands. *J Clean Prod* **2020**, *252*, doi:10.1016/j.jclepro.2019.119677.
59. Asghar, M.A.; Zhu, Q.; Sun, S.; Peng, Y.; Shuai, Q. Suspect Screening and Target Quantification of Human Pharmaceutical Residues in the Surface Water of Wuhan, China, Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Science of the Total Environment* **2018**, *635*, 828–837, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.179.
60. Madikizela, L.M.; Tavengwa, N.T.; Chimuka, L. Status of Pharmaceuticals in African Water Bodies: Occurrence, Removal and Analytical Methods. *J Environ Manage* **2017**, *193*, 211–220.
61. Lillenberg, M.; Nei, L.; Roasto, M. Enrofloxacin and Ciprofloxacin Uptake by Plants from Soil. *Agronomy Research* **2010**, *1*, 807–814.
62. Wu, X.; Conkle, J.L.; Gan, J. Multi-Residue Determination of Pharmaceutical and Personal Care Products in Vegetables. *J Chromatogr A* **2012**, *1254*, 78–86, doi:10.1016/j.chroma.2012.07.041.
63. Azanu, D.; Mortey, C.; Darko, G.; Weisser, J.J.; Styrihave, B.; Abaidoo, R.C. Uptake of Antibiotics from Irrigation Water by Plants. *Chemosphere* **2016**, *157*, 107–114, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.05.035.
64. Albero, B.; Tadeo, J.L.; Del Mar Delgado, M.; Miguel, E.; Pérez, R.A. Analysis of Multiclass Antibiotics in Lettuce by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Monitor Their Plant Uptake. *Molecules* **2019**, *24*, doi:10.3390/molecules24224066.
65. Figueroa-Diva, R.A.; Vasudevan, D.; MacKay, A.A. Trends in Soil Sorption Coefficients within Common Antimicrobial Families. *Chemosphere* **2010**, *79*, 786–793, doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.017.
66. Azanu, D.; Styrihave, B.; Darko, G.; Weisser, J.J.; Abaidoo, R.C. Occurrence and Risk Assessment of Antibiotics in Water and Lettuce in Ghana. *Science of the Total Environment* **2018**, *622–623*, 293–305, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.287.
67. Madikizela, L.M.; Ncube, S.; Chimuka, L. Uptake of Pharmaceuticals by Plants Grown under Hydroponic Conditions and Natural Occurring Plant Species: A Review. *Science of the Total Environment* **2018**, *636*, 477–486.
68. Englande, A.J.; Krenkel, P.; Shamas, J. Wastewater Treatment & Water Reclamation. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*; Elsevier, 2015.
69. Oberoi, A.S.; Jia, Y.; Zhang, H.; Khanal, S.K.; Lu, H. Insights into the Fate and Removal of Antibiotics in Engineered Biological Treatment Systems: A Critical Review. *Environ Sci Technol* **2019**, *53*, 7234–7264, doi:10.1021/acs.est.9b01131.
70. Kruglova, A.; Mikola, A.; Gonzalez-Martinez, A.; Vahala, R. Effect of Sulfadiazine and Trimethoprim on Activated Sludge Performance and Microbial Community Dynamics in Laboratory-Scale Membrane Bioreactors and Sequencing Batch Reactors at 8°C. *Biotechnol Prog* **2019**, *35*, 1–8, doi:10.1002/btpr.2708.
71. Zhou, H.; Li, X.; Xu, G.; Yu, H. Overview of Strategies for Enhanced Treatment of Municipal/Domestic Wastewater at Low Temperature. *Science of the Total Environment* **2018**, *643*, 225–237.
72. Ekta, P.; Modi, N.R.; Nainesh Modi, C.R. A Review of Phytoremediation. ~ 1485 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **2018**, *7*, 1485–1489.
73. Kafle, A.; Timilsina, A.; Gautam, A.; Adhikari, K.; Bhattarai, A.; Aryal, N. Phytoremediation: Mechanisms, Plant Selection and Enhancement by Natural and Synthetic Agents. *Environmental Advances* **2022**, *8*.
74. Jeevanantham, S.; Saravanan, A.; Hemavathy, R. V.; Kumar, P.S.; Yaashikaa, P.R.; Yuvaraj, D. Removal of Toxic Pollutants from Water Environment by Phytoremediation: A Survey on Application and Future Prospects. *Environ Technol Innov* **2019**, *13*, 264–276.
75. Bártíková, H.; Skálová, L.; Stuchíková, L.; Vokřál, I.; Vaněk, T.; Podlipná, R. Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Plants and Their Role in Uptake and Biotransformation of Veterinary Drugs in the Environment. *Drug Metab Rev* **2015**, *47*, 374–387, doi:10.3109/03602532.2015.1076437.

76. Zhang, J.J.; Yang, H. Metabolism and Detoxification of Pesticides in Plants. *Science of the Total Environment* **2021**, *790*, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148034.
77. Ghori, Z.; Iftikhar, H.; Bhatti, M.F.; Nasar-Um-Minullah; Sharma, I.; Kazi, A.G.; Ahmad, P. Phytoextraction: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Soil. In *Plant Metal Interaction: Emerging Remediation Techniques*; Elsevier Inc., 2015; pp. 361–384 ISBN 9780128031582.
78. Pachura, P.; Ociepa-Kubicka, A.; Skowron-Grabowska, B. Assessment of the Availability of Heavy Metals to Plants Based on the Translocation Index and the Bioaccumulation Factor. *Desalination Water Treat* **2016**, *57*, 1469–1477, doi:10.1080/19443994.2015.1017330.
79. Kasprzak, M.; Fijałowski, K. Wskaźniki Fitoremediacji. In *Fitoremediacja potencjał roślin do oczyszczania środowiska*; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, 2020; Vol. 1, pp. 156–159 ISBN 978-83-01-21170-7.
80. Kitamura, R.S.A.; Vicentini, M.; Bitencourt, V.; Vicari, T.; Motta, W.; Brito, J.C.M.; Cestari, M.M.; Prodocimo, M.M.; de Assis, H.C.S.; Gomes, M.P. Salvinia Molesta Phytoremediation Capacity as a Nature-Based Solution to Prevent Harmful Effects and Accumulation of Ciprofloxacin in Neotropical Catfish. *Environmental Science and Pollution Research* **2023**, doi:10.1007/s11356-023-25226-y.
81. Tai, Y.; Fung-Yee Tam, N.; Ruan, W.; Yang, Y.; Yang, Y.; Tao, R.; Zhang, J. Specific Metabolism Related to Sulfonamide Tolerance and Uptake in Wetland Plants. *Chemosphere* **2019**, *227*, 496–504, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.04.069.
82. Masiyambiri, V.; Yaou Balarabe, B.; Adjama, I.; Moussa, H.; Illiassou Oumarou, M.N.; Iro Sodo, A.M. A Study of the Phytoremediation Process Using Water Lettuce (*Pistia Stratiotes*) in the Removal of Ciprofloxacin. *American Journal of Life Science and Innovation* **2023**, *2*, 1–8, doi:10.54536/ajlsi.v2i1.1092.
83. Chen, J.; Liu, S.S.; He, L.X.; Cheng, Y.X.; Ye, P.; Li, J.; Ying, G.G.; Wang, Y.J.; Yang, F. The Fate of Sulfonamides in the Process of Phytoremediation in Hydroponics. *Water Res* **2021**, *198*, doi:10.1016/j.watres.2021.117145.
84. Gahlawat, S.; Gauba, P. Phytoremediation of Aspirin and Tetracycline by Brassica Juncea. *Int J Phytoremediation* **2015**, *18*, 929–935, doi:10.1080/15226514.2015.1131230.
85. Bhatt, E.; Gauba, P. Phytotoxicity of Tetracycline and Amoxicillin on Vigna Radiata and Its Remediation Potential in Hydroponic System. *Curr Trends Biotechnol Pharm* **2021**, *15*, 299–314, doi:10.5530/ctbp.2021.3.1.
86. Oturan, M.A.; Aaron, J.J. Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications. A Review. *Crit Rev Environ Sci Technol* **2014**, *44*, 2577–2641, doi:10.1080/10643389.2013.829765.
87. Elmolla, E.S.; Chaudhuri, M. Comparison of Different Advanced Oxidation Processes for Treatment of Antibiotic Aqueous Solution. *Desalination* **2010**, *256*, 43–47, doi:10.1016/j.desal.2010.02.019.
88. Nguyen, T.T.; Nam, S.N.; Son, J.; Oh, J. Tungsten Trioxide (WO<sub>3</sub>)-Assisted Photocatalytic Degradation of Amoxicillin by Simulated Solar Irradiation. *Sci Rep* **2019**, *9*, 1–18, doi:10.1038/s41598-019-45644-8.
89. Elmolla, E.S.; Chaudhuri, M. Photocatalytic Degradation of Amoxicillin, Ampicillin and Cloxacillin Antibiotics in Aqueous Solution Using UV/TiO<sub>2</sub> and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub> Photocatalysis. *Desalination* **2010**, *252*, 46–52, doi:10.1016/j.desal.2009.11.003.
90. Tran, M.L.; Fu, C.C.; Juang, R.S. Removal of Metronidazole and Amoxicillin Mixtures by UV/TiO<sub>2</sub> Photocatalysis: An Insight into Degradation Pathways and Performance Improvement. *Environmental Science and Pollution Research* **2019**, *26*, 11846–11855, doi:10.1007/s11356-019-04683-4.
91. Gar Alalm, M.; Ookawara, S.; Fukushi, D.; Sato, A.; Tawfik, A. Improved WO<sub>3</sub> Photocatalytic Efficiency Using ZrO<sub>2</sub> and Ru for the Degradation of Carbofuran and Ampicillin. *J Hazard Mater* **2016**, *302*, 225–231, doi:10.1016/j.jhazmat.2015.10.002.
92. El-Kemary, M.; El-Shamy, H.; El-Mehasseb, I. Photocatalytic Degradation of Ciprofloxacin Drug in Water Using ZnO Nanoparticles. *J Lumin* **2010**, *130*, 2327–2331, doi:10.1016/j.jlumin.2010.07.013.
93. Eskandari, M.; Goudarzi, N.; Moussavi, S.G. Application of Low-Voltage UVC Light and Synthetic ZnO Nanoparticles to Photocatalytic Degradation of Ciprofloxacin in Aqueous Sample Solutions. *Water and Environment Journal* **2018**, *32*, 58–66, doi:10.1111/wej.12291.
94. Eskandari, M.; Goudarzi, N.; Moussavi, S.G. Application of Low-Voltage UVC Light and Synthetic ZnO Nanoparticles to Photocatalytic Degradation of Ciprofloxacin in Aqueous Sample Solutions. *Water and Environment Journal* **2018**, *32*, 58–66, doi:10.1111/wej.12291.

95. Kadi, M.W.; Mohamed, R.M.; Ismail, A.A. Facile Synthesis of Mesoporous BiFeO<sub>3</sub>/Graphene Nanocomposites as Highly Photoactive under Visible Light. *Opt Mater (Amst)* **2020**, *104*, 109842, doi:10.1016/j.optmat.2020.109842.
96. Zhen, Q.; Gao, L.; Sun, C.; Gong, H.; Hu, P.; Song, S.; Li, R. Honeycomb-like TiO<sub>2</sub>@GO Nanocomposites for the Photodegradation of Oxytetracycline. *Mater Lett* **2018**, *228*, 318–321, doi:10.1016/j.matlet.2018.06.041.
97. Beheshti, F.; M. A. Tehrani, R.; Khadir, A. Sulfamethoxazole Removal by Photocatalytic Degradation Utilizing TiO<sub>2</sub> and WO<sub>3</sub> Nanoparticles as Catalysts: Analysis of Various Operational Parameters. *International Journal of Environmental Science and Technology* **2019**, *16*, 7987–7996, doi:10.1007/s13762-019-02212-x.
98. Liu, Q.; Shen, J.; Yang, X.; Zhang, T.; Tang, H. 3D Reduced Graphene Oxide Aerogel-Mediated Z-Scheme Photocatalytic System for Highly Efficient Solar-Driven Water Oxidation and Removal of Antibiotics. *Appl Catal B* **2018**, *232*, 562–573, doi:10.1016/j.apcatb.2018.03.100.
99. Palominos, R.A.; Mondaca, M.A.; Giraldo, A.; Peñuela, G.; Pérez-Moya, M.; Mansilla, H.D. Photocatalytic Oxidation of the Antibiotic Tetracycline on TiO<sub>2</sub> and ZnO Suspensions. *Catal Today* **2009**, *144*, 100–105, doi:10.1016/j.cattod.2008.12.031.
100. Speight, J.G. Chemical Transformations in the Environment. In *Environmental Organic Chemistry for Engineers*; Elsevier, 2017; pp. 305–353.
101. Sun, X.; Ji, S.; Wang, M.; Dou, J.; Yang, Z.; Qiu, H.; Kou, S.; Ji, Y.; Wang, H. Fabrication of Porous TiO<sub>2</sub>-RGO Hybrid Aerogel for High-Efficiency, Visible-Light Photodegradation of Dyes. *J Alloys Compd* **2020**, *819*, 153033, doi:10.1016/j.jallcom.2019.153033.
102. Lonkar, S.P.; Pillai, V. V.; Alhassan, S.M. Facile and Scalable Production of Heterostructured ZnS-ZnO/Graphene Nano-Photocatalysts for Environmental Remediation. *Sci Rep* **2018**, *8*, 1–14, doi:10.1038/s41598-018-31539-7.
103. Ameta, R.; Solanki, M.S.; Benjamin, S.; Ameta, S.C. Photocatalysis. In *Advanced Oxidation Processes for Wastewater Treatment: Emerging Green Chemical Technology*; Elsevier Inc., 2018; pp. 135–175 ISBN 9780128105252.
104. Migani, A.; Blancafort, L. Theoretical Studies of Photochemistry on TiO<sub>2</sub> Surfaces. In *Encyclopedia of Interfacial Chemistry: Surface Science and Electrochemistry*; Elsevier, 2018; pp. 637–653 ISBN 9780128098943.
105. Bodzek, M.; Rajca, M. Photocatalysis in the Treatment and Disinfection of Water. Part I. Theoretical Backgrounds. *Ecological Chemistry and Engineering S* **2012**, *19*, 489–512, doi:10.2478/v10216-011-0036-5.
106. Ribeiro, A.R.; Nunes, O.C.; Pereira, M.F.R.; Silva, A.M.T. An Overview on the Advanced Oxidation Processes Applied for the Treatment of Water Pollutants Defined in the Recently Launched Directive 2013/39/EU. *Environ Int* **2015**, *75*, 33–51.
107. Sharma, A.; Ahmad, J.; Flora, S.J.S. Application of Advanced Oxidation Processes and Toxicity Assessment of Transformation Products. *Environ Res* **2018**, *167*, 223–233, doi:10.1016/j.envres.2018.07.010.
108. Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.M.; Guwy, A.J. Multi-Residue Method for the Determination of Basic/Neutral Pharmaceuticals and Illicit Drugs in Surface Water by Solid-Phase Extraction and Ultra Performance Liquid Chromatography-Positive Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2007**, *1161*, 132–145, doi:10.1016/j.chroma.2007.05.074.
109. Łukaszewicz, P.; Białk-Bielińska, A.; Dołżonek, J.; Kumirska, J.; Caban, M.; Stepnowski, P. A New Approach for the Extraction of Tetracyclines from Soil Matrices: Application of the Microwave-Extraction Technique. *Anal Bioanal Chem* **2018**, *410*, 1697–1707, doi:10.1007/s00216-017-0815-7.
110. Wagil, M.; Kumirska, J.; Stolte, S.; Puckowski, A.; Maszkowska, J.; Stepnowski, P.; Białk-Bielińska, A. Development of Sensitive and Reliable LC-MS/MS Methods for the Determination of Three Fluoroquinolones in Water and Fish Tissue Samples and Preliminary Environmental Risk Assessment of Their Presence in Two Rivers in Northern Poland. *Science of the Total Environment* **2014**, *493*, 1006–1013, doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.082.
111. Dziurda, D.; Polak, S.; Skowron, A.; Kuschill-Dziurda, J.; Brandys, J. Analysis of Non-Hospital Antibacterial Pharmacotherapy in Poland. *International Journal of Infectious Diseases* **2008**, *12*, 483–489, doi:10.1016/j.ijid.2007.12.014.



112. Rogowska, J.; Zimmermann, A.; Muszyńska, A.; Ratajczyk, W.; Wolska, L. Pharmaceutical Household Waste Practices: Preliminary Findings from a Case Study in Poland. *Environ Manage* **2019**, *64*, 97–106, doi:10.1007/s00267-019-01174-7.
113. Lipinski, C.A. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discov Today Technol* **2004**, *1*, 337–341.
114. Lewer, J.M.; Stickelman, Z.R.; Huang, J.H.; Peloquin, J.F.; Kostal, J. *Structure-to-Process Design Framework for Developing Safer Pesticides*; 2022; Vol. 8;.
115. Zhang, M.; He, L.Y.; Liu, Y.S.; Zhao, J.L.; Liu, W.R.; Zhang, J.N.; Chen, J.; He, L.K.; Zhang, Q.Q.; Ying, G.G. Fate of Veterinary Antibiotics during Animal Manure Composting. *Science of the Total Environment* **2019**, *650*, 1363–1370, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.147.
116. Puig, P.; Borrull, F.; Aguilar, C.; Calull, M. Sample Stacking for the Analysis of Penicillins by Microemulsion Electrokinetic Capillary Chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2006**, *831*, 196–204, doi:10.1016/j.jchromb.2005.12.004.
117. Al Bakain, R.; Rivals, I.; Sassiati, P.; Thiébaud, D.; Hennion, M.C.; Euvrard, G.; Vial, J. Comparison of Different Statistical Approaches to Evaluate the Orthogonality of Chromatographic Separations: Application to Reverse Phase Systems. *J Chromatogr A* **2011**, *1218*, 2963–2975, doi:10.1016/j.chroma.2011.03.031.
118. Qiang, Z.; Adams, C. Potentiometric Determination of Acid Dissociation Constants (PK a) for Human and Veterinary Antibiotics. *Water Res* **2004**, *38*, 2874–2890, doi:10.1016/j.watres.2004.03.017.
119. Boxall, A.B.A.; Johnson, P.; Smith, E.J.; Sinclair, C.J.; Stutt, E.; Levy, L.S. Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants. *J Agric Food Chem* **2006**, *54*, 2288–2297, doi:10.1021/jf053041t.
120. Segura, P.A.; Gagnon, C.; Sauv e, S. A Fully Automated On-Line Preconcentration and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Anti-Infectives in Wastewaters. *Anal Chim Acta* **2007**, *604*, 147–157, doi:10.1016/j.aca.2007.09.058.
121. Drug Bank Available online: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01190>.
122. Llin as, A.; Glen, R.C.; Goodman, J.M. Solubility Challenge: Can You Predict Solubilities of 32 Molecules Using a Database of 100 Reliable Measurements? *J Chem Inf Model* **2008**, *48*, 1289–1303, doi:10.1021/ci800058v.
123. Kault, S.; Ritschel, W.A. *Quantitative Structure-Pharmacokinetic Relationship of a Series of Sulfonamides in the Rat\**; 1990; Vol. 15;.
124. Carda-Broch, S.; Berthod, A. Countercurrent Chromatography for the Measurement of the Hydrophobicity of Sulfonamide Amphoteric Compounds. *Chromatographia* **2004**, *59*, 79–87, doi:10.1365/s10337-003-0140-5.
125. Kim, S.C.; Carlson, K. Temporal and Spatial Trends in the Occurrence of Human and Veterinary Antibiotics in Aqueous and River Sediment Matrices. *Environ Sci Technol* **2007**, *41*, 50–57, doi:10.1021/es060737+.
126. Gros, M.; Petrovi c, M.; Barcel o, D. Development of a Multi-Residue Analytical Methodology Based on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) for Screening and Trace Level Determination of Pharmaceuticals in Surface and Wastewaters. *Talanta* **2006**, *70*, 678–690, doi:10.1016/j.talanta.2006.05.024.
127. Yi, X.; Bayen, S.; Kelly, B.C.; Li, X.; Zhou, Z. Improved Detection of Multiple Environmental Antibiotics through an Optimized Sample Extraction Strategy in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. *Anal Bioanal Chem* **2015**, *407*, 9071–9083, doi:10.1007/s00216-015-9074-7.
128. Bian, K.; Liu, Y.H.; Wang, Z.N.; Zhou, T.; Song, X.Q.; Zhang, F.Y.; He, L.M. Determination of Multi-Class Antimicrobial Residues in Soil by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *RSC Adv* **2015**, *5*, 27584–27593, doi:10.1039/c4ra13919d.
129. Huang, Y.; Cheng, M.; Li, W.; Wu, L.; Chen, Y.; Luo, Y.; Christie, P.; Zhang, H. Simultaneous Extraction of Four Classes of Antibiotics in Soil, Manure and Sewage Sludge and Analysis by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with the Isotope-Labelled Internal Standard Method. *Analytical Methods* **2013**, *5*, 3721–3731, doi:10.1039/c3ay40220g.
130. Hu, W.; Ma, L.; Guo, C.; Sha, J.; Zhu, X.; Wang, Y. Simultaneous Extraction and Determination of Fluoroquinolones, Tetracyclines and Sulfonamides Antibiotics in Soils Using Optimised Solid Phase Extraction Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Int J Environ Anal Chem* **2012**, *92*, 698–713, doi:10.1080/03067319.2010.520122.

131. Rossmann, J.; Schubert, S.; Gurke, R.; Oertel, R.; Kirch, W. Simultaneous Determination of Most Prescribed Antibiotics in Multiple Urban Wastewater by SPE-LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2014**, *969*, 162–170, doi:10.1016/j.jchromb.2014.08.008.
132. Nurmi, J.; Pellinen, J. Multiresidue Method for the Analysis of Emerging Contaminants in Wastewater by Ultra Performance Liquid Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2011**, *1218*, 6712–6719, doi:10.1016/j.chroma.2011.07.071.
133. McClure, E.L.; Wong, C.S. Solid Phase Microextraction of Macrolide, Trimethoprim, and Sulfonamide Antibiotics in Wastewaters. *J Chromatogr A* **2007**, *1169*, 53–62, doi:10.1016/j.chroma.2007.08.062.
134. Ramos Payán, M.; Bello López, M.Á.; Fernández-Torres, R.; González, J.A.O.; Callejón Mochón, M. Hollow Fiber-Based Liquid Phase Microextraction (HF-LPME) as a New Approach for the HPLC Determination of Fluoroquinolones in Biological and Environmental Matrices. *J Pharm Biomed Anal* **2011**, *55*, 332–341, doi:10.1016/j.jpba.2011.01.037.
135. Ho, Y.B.; Zakaria, M.P.; Latif, P.A.; Saari, N. Simultaneous Determination of Veterinary Antibiotics and Hormone in Broiler Manure, Soil and Manure Compost by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2012**, *1262*, 160–168, doi:10.1016/j.chroma.2012.09.024.
136. Hou, J.; Wan, W.; Mao, D.; Wang, C.; Mu, Q.; Qin, S.; Luo, Y. Occurrence and Distribution of Sulfonamides, Tetracyclines, Quinolones, Macrolides, and Nitrofurans in Livestock Manure and Amended Soils of Northern China. *Environmental Science and Pollution Research* **2015**, *22*, 4545–4554, doi:10.1007/s11356-014-3632-y.
137. Maia, A.S.; Paíga, P.; Delerue-Matos, C.; Castro, P.M.L.; Tiritan, M.E. Quantification of Fluoroquinolones in Wastewaters by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Environmental Pollution* **2020**, *259*, doi:10.1016/j.envpol.2020.113927.
138. Botitsi, E.; Frosyni, C.; Tsipi, D. Determination of Pharmaceuticals from Different Therapeutic Classes in Wastewaters by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *387*, 1317–1327, doi:10.1007/s00216-006-0804-8.
139. Huang, F.; Zou, S.; Deng, D.; Lang, H.; Liu, F. Antibiotics in a Typical Karst River System in China: Spatiotemporal Variation and Environmental Risks. *Science of the Total Environment* **2019**, *650*, 1348–1355, doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.131.
140. Gros, M.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. Rapid Analysis of Multiclass Antibiotic Residues and Some of Their Metabolites in Hospital, Urban Wastewater and River Water by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2013**, *1292*, 173–188, doi:10.1016/j.chroma.2012.12.072.
141. Liu, X.; Liu, Y.; Xu, J.R.; Ren, K.J.; Meng, X.Z. Tracking Aquaculture-Derived Fluoroquinolones in a Mangrove Wetland, South China. *Environmental Pollution* **2016**, *219*, 916–923, doi:10.1016/j.envpol.2016.09.011.
142. Yu, X.; Chen, J.; Liu, X.; Sun, Y.; He, H. The Mechanism of Uptake and Translocation of Antibiotics by Pak Choi (*Brassica Rapa* Subsp. *Chinensis*). *Science of the Total Environment* **2022**, *810*, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.151748.
143. Yu, X.; Liu, H.; Pu, C.; Chen, J.; Sun, Y.; Hu, L. Determination of Multiple Antibiotics in Leafy Vegetables Using QuEChERS-UHPLC-MS/MS. *J Sep Sci* **2018**, *41*, 713–722, doi:10.1002/jssc.201700798.
144. Malchi, T.; Maor, Y.; Tadmor, G.; Shenker, M.; Chefetz, B. Irrigation of Root Vegetables with Treated Wastewater: Evaluating Uptake of Pharmaceuticals and the Associated Human Health Risks. *Environ Sci Technol* **2014**, *48*, 9325–9333, doi:10.1021/es5017894.
145. Chung, H.S.; Lee, Y.J.; Rahman, M.M.; Abd El-Aty, A.M.; Lee, H.S.; Kabir, M.H.; Kim, S.W.; Park, B.J.; Kim, J.E.; Hacimüftüoğlu, F.; et al. Uptake of the Veterinary Antibiotics Chlortetracycline, Enrofloxacin, and Sulphathiazole from Soil by Radish. *Science of the Total Environment* **2017**, *605–606*, 322–331, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.231.
146. Wang, J.; Lin, H.; Sun, W.; Xia, Y.; Ma, J.; Fu, J.; Zhang, Z.; Wu, H.; Qian, M. Variations in the Fate and Biological Effects of Sulfamethoxazole, Norfloxacin and Doxycycline in Different Vegetable-Soil Systems Following Manure Application. *J Hazard Mater* **2016**, *304*, 49–57, doi:10.1016/j.jhazmat.2015.10.038.
147. Tian, R.; Zhang, R.; Uddin, M.; Qiao, X.; Chen, J.; Gu, G. Uptake and Metabolism of Clarithromycin and Sulfadiazine in Lettuce. *Environmental Pollution* **2019**, *247*, 1134–1142, doi:10.1016/j.envpol.2019.02.009.
148. Raich-Montiu, J.; Beltrán, J.L.; Prat, M.D.; Granados, M. Studies on the Extraction of Sulfonamides from Agricultural Soils. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397*, 807–814, doi:10.1007/s00216-010-3580-4.

149. Gómez-Granados, F.; Codony, R.; Granados, M.; Prat, M.D. Fluoroquinolones in Soils: Assessment of Extraction Methods. *Int J Environ Anal Chem* **2011**, *91*, 1353–1366, doi:10.1080/03067319.2010.500056.
150. Grobben-Verpoorten, A.; Dihuidi, K.; Roets, E.; Hoogmartens, J.; Vanderhaeghe, H. *Determination of the Stability of Tetracycline Suspensions by High Performance Liquid Chromatography*; 1985; Vol. 7;.
151. Periti, P.; Mazzei, T.; Mini, E.; Novelli, A. *Drug Disposition Clinical Pharmacokinetic Properties of the Macrolide Antibiotics Effects of Age and Various Pathophysiological States (Part I) 1*;
152. Gozlan, I.; Rotstein, A.; Avisar, D. Amoxicillin-Degradation Products Formed under Controlled Environmental Conditions: Identification and Determination in the Aquatic Environment. *Chemosphere* **2013**, *91*, 985–992, doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.095.
153. Wegh, R.S.; Berendsen, B.J.A.; Driessen-Van Lankveld, W.D.M.; Pikkemaat, M.G.; Zuidema, T.; Van Ginkel, L.A. Non-Targeted Workflow for Identification of Antimicrobial Compounds in Animal Feed Using Bioassay-Directed Screening in Combination with Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2017**, *34*, 1935–1947, doi:10.1080/19440049.2017.1364431.
154. Manz, K.E.; Feerick, A.; Braun, J.M.; Feng, Y.L.; Hall, A.; Koelmel, J.; Manzano, C.; Newton, S.R.; Pennell, K.D.; Place, B.J.; et al. Non-Targeted Analysis (NTA) and Suspect Screening Analysis (SSA): A Review of Examining the Chemical Exposome. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **2023**, *33*, 524–536.
155. Nguyen, P.Y.; Carvalho, G.; Reis, M.A.M.; Oehmen, A. A Review of the Biotransformations of Priority Pharmaceuticals in Biological Wastewater Treatment Processes. *Water Res* **2021**, *188*, 116446, doi:10.1016/j.watres.2020.116446.
156. Black, G.; Lowe, C.; Anumol, T.; Bade, J.; Favela, K.; Feng, Y.-L.; Knolhoff, A.; Mceachran, A.; Nuñez, J.; Fisher, C.; et al. Exploring Chemical Space in Non-Targeted Analysis: A Proposed ChemSpace Tool. *Anal Bioanal Chem* **2023**, *415*, 35–44, doi:10.1007/s00216-022-04434-4.
157. Zhang, P.; Carlsten, C.; Chaleckis, R.; Hanhineva, K.; Huang, M.; Isobe, T.; Koistinen, V.M.; Meister, I.; Papazian, S.; Sdougkou, K.; et al. Defining the Scope of Exposome Studies and Research Needs from a Multidisciplinary Perspective. *Environ Sci Technol Lett* **2021**, *8*, 839–852.
158. Bajkacz, S.; Felis, E.; Kycia-Słocka, E.; Harnisz, M.; Korzeniewska, E. Development of a New SLE-SPE-HPLC-MS/MS Method for the Determination of Selected Antibiotics and Their Transformation Products in Anthropogenically Altered Solid Environmental Matrices. *Science of the Total Environment* **2020**, *726*, 138071, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138071.
159. Michael, I.; Rizzo, L.; McArdell, C.S.; Manaia, C.M.; Merlin, C.; Schwartz, T.; Dagot, C.; Fatta-Kassinos, D. Urban Wastewater Treatment Plants as Hotspots for the Release of Antibiotics in the Environment: A Review. *Water Res* **2013**, *47*, 957–995, doi:10.1016/j.watres.2012.11.027.
160. Ozyigit, I.I.; Arda, L.; Yalcin, B.; Yalcin, I.E.; Ucar, B.; Hocaoglu-Ozyigit, A. Lemna Minor, a Hyperaccumulator Shows Elevated Levels of Cd Accumulation and Genomic Template Stability in Binary Application of Cd and Ni: A Physiological and Genetic Approach. *Int J Phytoremediation* **2021**, *23*, 1255–1269, doi:10.1080/15226514.2021.1892586.
161. Horvat, T.; Vidaković-Cifrek, Ž.; Oreščanin, V.; Tkalec, M.; Pevalek-Kozlina, B. Toxicity Assessment of Heavy Metal Mixtures by Lemna Minor L. *Science of the Total Environment* **2007**, *384*, 229–238, doi:10.1016/j.scitotenv.2007.06.007.
162. Ammar, H.B.; Brahim, M. Ben; Abdelhédi, R.; Samet, Y. Green Electrochemical Process for Metronidazole Degradation at BDD Anode in Aqueous Solutions via Direct and Indirect Oxidation. *Sep Purif Technol* **2016**, *157*, 9–16, doi:10.1016/j.seppur.2015.11.027.
163. Ammar, H.B.; Brahim, M. Ben; Abdelhédi, R.; Samet, Y. Enhanced Degradation of Metronidazole by Sunlight via Photo-Fenton Process under Gradual Addition of Hydrogen Peroxide. *J Mol Catal A Chem* **2016**, *420*, 222–227, doi:10.1016/j.molcata.2016.04.029.
164. Tran, M.L.; Fu, C.C.; Juang, R.S. Effects of Water Matrix Components on Degradation Efficiency and Pathways of Antibiotic Metronidazole by UV/TiO<sub>2</sub> Photocatalysis. *J Mol Liq* **2019**, *276*, 32–38, doi:10.1016/j.molliq.2018.11.155.
165. Senta, I.; Krizman-Matasic, I.; Terzic, S.; Ahel, M. Comprehensive Determination of Macrolide Antibiotics, Their Synthesis Intermediates and Transformation Products in Wastewater Effluents and Ambient Waters by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Chromatogr A* **2017**, *1509*, 60–68, doi:10.1016/j.chroma.2017.06.005.

166. Kang, D.H.; Gupta, S.; Rosen, C.; Fritz, V.; Singh, A.; Chander, Y.; Murray, H.; Rohwer, C. Antibiotic Uptake by Vegetable Crops from Manure-Applied Soils. *J Agric Food Chem* **2013**, *61*, 9992–10001, doi:10.1021/jf404045m.
167. Yousef, F.; Mansour, O.; Herballi, J.; Author, C. Sulfonamides : Historical Discovery Development (Structure-Activity Relationship Notes). *IN-VITRO IN-VIVO IN-SILICO JOURNAL* **2018**, *1*, 1–15.
168. Babić, S.; Zrnčić, M.; Ljubas, D.; Ćurković, L.; Škorić, I. Photolytic and Thin TiO<sub>2</sub> Film Assisted Photocatalytic Degradation of Sulfamethazine in Aqueous Solution. *Environmental Science and Pollution Research* **2015**, *22*, 11372–11386, doi:10.1007/s11356-015-4338-5.
169. Li, M.; Wang, C.; Yau, M.; Bolton, J.R.; Qiang, Z. Sulfamethazine Degradation in Water by the VUV/UV Process: Kinetics, Mechanism and Antibacterial Activity Determination Based on a Mini-Fluidic VUV/UV Photoreaction System. *Water Res* **2017**, *108*, 348–355, doi:10.1016/j.watres.2016.11.018.
170. Deng, F.; Li, S.; Zhou, M.; Zhu, Y.; Qiu, S.; Li, K.; Ma, F.; Jiang, J. A Biochar Modified Nickel-Foam Cathode with Iron-Foam Catalyst in Electro-Fenton for Sulfamerazine Degradation. *Appl Catal B* **2019**, *256*, doi:10.1016/j.apcatb.2019.117796.
171. Lamshöft, M.; Sukul, P.; Zühlke, S.; Spittler, M. Metabolism of <sup>14</sup>C-Labelled and Non-Labelled Sulfadiazine after Administration to Pigs. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *388*, 1733–1745, doi:10.1007/s00216-007-1368-y.

## Dorobek naukowy

### Publikacje:

1. Płonka, J.; Górny, A.; **Kokoszka (Stando), K.**; Barchanska, H. Metabolic profiles in the course of the shikimic acid pathway of *Raphanus sativus* var. *longipinnatus* exposed to mesotrione and its degradation products. *Chemosphere* **2020**, *245*, 125616, doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125616. **(IF=7,086; 140 pkt, TOP10)**
2. Bajkacz, S.; Adamczewska, P.; **Kokoszka (Stando), K.**; Kycia-Stocka, E.; Sochacki, A.; Felis, E. Supramolecular Solvent-Based Microextraction of Selected Anticonvulsant and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs from Sediment Samples. *Molecules* **2020**, *25*, 1–20, doi:10.3390/molecules25235671. **(IF=4,411; 140 pkt)**
3. **Kokoszka (Stando), K.**; Kobus, A.; Bajkacz, S. Optimization of a method for extraction and determination of residues of selected antimicrobials in soil and plant samples using HPLC-UV-MS/MS. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 1–14, doi:10.3390/ijerph18031159. **(IF=4,614; 140 pkt)**
4. Buta, M.; Korzeniewska, E.; Harnisz, M.; Hubeny, J.; Zieliński, W.; Rolbiecki, D.; Bajkacz, S.; Felis, E.; **Kokoszka (Stando), K.** *Sci. Total. Environ.* Microbial and chemical pollutants on the manure-crops pathway in the perspective of “One Health” holistic approach. *Sci. Total Environ.* **2021**, *785*, 147411, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.147411. **(IF=10,753; 200 pkt, TOP10)**
5. **Kokoszka (Stando), K.**; Wilk, J.; Felis, E.; Bajkacz, S. Application of UHPLC-MS/MS method to study occurrence and fate of sulfonamide antibiotics and their transformation products in surface water in highly urbanized areas. *Chemosphere* **2021**, *283*, 131189, doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131189. **(IF=8,943; 140 pkt, TOP10)**
6. Płonka, J.; Barchanska, H.; **Kokoszka (Stando), K.**; Krzyżanowska, A. Effect of herbicide stress on the content of tyramine and its metabolites in Japanese radish sprouts (*Raphanus sativus*). *J. Food Compos. Anal.* **2021**, *104301*, doi:10.1016/j.jfca.2021.104301. **(IF=4,520; 100 pkt)**
7. **Kokoszka (Stando), K.**; Zieliński, W.; Korzeniewska, E.; Felis, E.; Harnisz, M.; Bajkacz, S. Suspect screening of antimicrobial agents transformation products in environmental samples development of LC-QTrap method running in pseudo MRM transitions. *Sci. Total. Environ.* **2022**, *808*, 152114, doi:10.1016/j.scitotenv.2021.152114. **(IF=10,753; 200 pkt)**
8. **Stando, K.**; Kasprzyk, P.; Felis, E.; Bajkacz, S. Heterogeneous Photocatalysis of Metronidazole in Aquatic Samples. *Molecules* **2021**, *26(24)*, 1-16, doi: 10.3390/molecules26247612. **(IF=4,927, 140 pkt)**
9. **Stando, K.**; Korzeniewska, E.; Felis, E.; Harnisz, M.; Buta M.; Bajkacz, S. Determination of antimicrobial agents and their transformation products in an agricultural water-soil system modified with Manure. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 17529, doi: 10.1038/s41598-022-22440-5. **(IF=4,996; 140 pkt, TOP10)**
10. **Stando, K.**; Korzeniewska, E.; Felis, E.; Harnisz, M.; Bajkacz, S. Uptake of pharmaceutical pollutants and their metabolites from soil fertilized with manure to parsley tissues. *Molecules* **2022**, *27(14)*, 1–20, doi: 10.3390/molecules27144378. **(IF=4,600; 140 pkt)**
11. **Stando, K.**; Czyż, A.; Gajda, M.; Felis, E.; Bajkacz, S. Study of the Phytoextraction and Phytodegradation of Sulfamethoxazole and Trimethoprim from Water by *Limnobium laevigatum*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 1-18, doi:10.3390/ijerph192416994. **(IF=4,614; 140 pkt)**
12. Hasiya, V.; Singh, P.; Thakur, S.; **Stando, K.**; Nguyen, V.; Le, Q.; Alshehri, S.; Ahamad, T.; Wu, K.; Raizada, P. Oxygen doping facilitated N-vacancies in g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> regulates electronic band gap structure for trimethoprim and Cr (VI) mitigation: Simulation studies and photocatalytic degradation pathways. *Appl. Mater. Today* **2022**, *29*, 101676, doi:10.1016/j.apmt.2022.101676. **(IF=8,300; 140 pkt)**
13. Wolak, I.; Bajkacz, S.; Harnisz, M.; **Stando, K.**; Męcik, M.; Korzeniewska, E. Digestate from Agricultural Biogas Plants as a Reservoir of Antimicrobials and Antibiotic Resistance Genes-Implications for the Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 1–18, doi:10.3390/ijerph20032672. **(20 pkt)**

14. **Stando, K.**; Wilk, J.; Jakóbiak-Kolon, A.; Felis, E.; Bajkacz, S. Application of UHPLC-MS/MS method to monitor the occurrence of sulfonamides and their transformation products in soil in Silesia, Poland. *Enviro. Sci. & Pollution Res.* **2023**, 30, 112922–112942, doi: 10.1007/s11356-023-30146-y. (IF=5,800; 100 pkt)
15. **Stando, K.**; Grzybowski, M.; Byczek-Wyrostek, A.; Bajkacz, S. Efficiency of phytoremediation and identification of biotransformation pathways of fluoroquinolones in the aquatic environment. *International Int. J. Phytoremediation* **2023**, 26(7), 1027–1037, doi: 10.1080/15226514.2023.2288898. (IF= 3,700; 100 pkt)
16. **Stando, K.**; Kopiec, M.; Pieszczyk, M.; Zogornik, P.; Kowalska, K.; Felis, E.; Bajkacz, S. Degradation of fluoroquinolones and macrolides by solar light-driven heterogeneous photocatalysis – Proposed drug transformation pathways; *J. Photochem. Photobiol. A*; **2024**; 453; 115651; doi: 10.1016/j.jphotochem.2024.115651. (IF=4,300; 70 pkt)

$$\sum_{IF} = 92,317 \quad \sum_{MNI\&SW} = 2050$$

**h-index = 7 (wg. google scholar oraz bazy Scopus)**

*Monografie:*

1. Bajkacz, S.; **Kokoszka (Stando), K.** Analiza niecelowana jako narzędzie do poszukiwania produktów przemian ksenobiotyków w środowisku. *Bioanalitika tom 2, nowe strategie analityczne i rozwiązania aparaturowe*; Staneczko-Baranowska, I., Buszewski, B., Eds.; PWN: Warszawa, **2020**; pp. 643–660, ISBN: 978-83-01-21282-7.
2. Bajkacz, S.; **Stando, K.** Non-targeted analysis as a tool for searching transformation products. *Handbook of Bioanalytics*; Staneczko-Baranowska, I., Buszewski, B., Eds.; Springer Nature: Szwajcaria, **2022**; pp. 1–23, ISBN: 978-3-030-63957-0.

*Komunikaty ustne (wygłoszone osobiście):*

1. **K. Kokoszka (Stando), S. Bajkacz, wystąpienie ustne:** „New analytical tools for the determination of anthropogenic pollutants in the environmental samples”. National Scientific Conference „Understand the Science” IV Edition, (26 września 2020), konferencja międzynarodowa (on-line).
2. **K. Kokoszka (Stando), S. Bajkacz, wystąpienie ustne:** „Analiza niecelowana jako narzędzie do identyfikacji produktów transformacji wybranych farmaceutyków w środowisku”, e-Zjazd Wiosenny SSPTChem 2021, 27–29 maja 2021, konferencja krajowa (on-line).
3. **K. Kokoszka (Stando), S. Bajkacz, wystąpienie ustne:** „Oznaczanie pozostałości środków bakteriobójczych oraz identyfikacja ich produktów transformacji w środowisku wodnym”. 63. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego (Łódź, 13–17 września 2021), konferencja krajowa.
4. **K. Stando, S. Bajkacz, E. Felis, M. Harnisz, E. Korzeniewska, wystąpienie ustne:** „LC-MS/MS w badaniach akumulacji i degradacji wybranych leków weterynaryjnych w glebie oraz tkankach pietruszki”. XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej, PoKoChA 2022 (Łódź, 19–23 czerwca 2022), konferencja krajowa.

*Prezentacje posterowe (prezentowane osobiście):*

1. J. Płonka, **K. Kokoszka (Stando), poster:** „Metabolity wtórne w procesie detoksyfikacji rośliny potraktowanej herbicydami”. Aktualne problemy chemii analitycznej: XIII Seminarium naukowe, (Katowice, 17 maja 2019), konferencja krajowa.
2. **K. Kokoszka (Stando), W. Zieliński, E. Korzeniewska, E. Felis, M. Harnisz, S. Bajkacz, poster:** „Analysis of pharmaceutical residues and their transformation products in groundwater and

municipal sewage samples". QUO VADIS Life Sciences (Opole, 23–27 czerwca 2021), konferencja międzynarodowa (on-line). **(poster został wyróżniony w kategorii za najlepszy poster)**

3. **K. Kokoszka (Stando)**, S. Bajkacz, **poster**: „Development of a method for extraction and determination of residues of selected antimicrobials in soil and plant tissues”. QUO VADIS Life Sciences (Opole, 23–27 czerwca 2021), konferencja międzynarodowa (on-line), konferencja krajowa.
4. **K. Stando**, J. Wilk, S. Bajkacz, **poster**: „Occurrence of transformation products of sulfonamides in environmental water samples from urbanized areas of Silesia, Poland”. 5th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry (Kroczyce, 13–15 czerwca, 2022), konferencja krajowa.
5. **K. Stando**, S. Bajkacz, E. Felis, M. Harnisz, E. Korzeniewska, **poster**: „Distribution and degradation of antimicrobials in the soil-water system”. 5th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry (Kroczyce, 13–15 czerwca, 2022), konferencja krajowa.
6. **K. Stando**, S. Bajkacz, P. Kasprzyk, E. Felis, **poster**: „Zastosowanie fotokatalizy heterogenicznej do oczyszczania wody z pozostałości metronidazolu”. XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej, PoKoChA 2022 (Łódź, 19–23 czerwca 2022), konferencja krajowa.
7. **K. Stando**, A. Czyż, M. Gajda, E. Felis, S. Bajkacz, **poster**: „Zastosowanie Limnobium Laevigatum do fitoremediacji wody zanieczyszczonej sulfametoksazolem oraz trimetoprimem”. Zjazd Zimowy SMPTChem 2022 (Opole, 10 grudzień 2022), konferencja krajowa.

*Współautorstwo wykładów, komunikatów i prezentacji posterowych:*

1. N. Kuźnik, M. Wysocka-Gajda, M.M. Tomczyk, K. Bakalorz, A. Buchcik, M. Marczyk, **K. Kokoszka (Stando)**, **wystąpienie ustne**: „Środki kontrastowe do obrazowania magnetyczno-rezonansowego”. II Seminarium Ogólnoakademickie Metody fizykochemiczne w badaniach naukowych, (Sosnowiec, 23 kwietnia 2018), konferencja krajowa.
2. J. Wilk, **K. Stando**, S. Bajkacz, **poster**: „Porównanie występowania wybranych sulfonamidów w środowisku wodnym i w glebie na terenach miejskich województwa śląskiego”. Zjazd Zimowy SMPTChem 2022 (Opole, 10 grudzień 2022), konferencja krajowa.
3. A. Kicińska, **K. Stando**, S. Bajkacz, **poster**: „Rozkład tetracykliny w procesach inicjowanych światłem słonecznym”. Zjazd Wiosenny SMPTChem 2023 (Chęciny, 3–7 maja 2023), konferencja krajowa.
4. J. Wilk, **K. Stando**, A. Grabowska, S. Bajkacz, **poster**: „Zastosowanie procesów inicjowanych światłem do usuwania deksametazonu z roztworów wodnych”. XVI Konferencja Naukową „Mikrozanieczyszczenia w środowisku człowieka (Częstochowa, 18–20 września 2024), konferencja krajowa.
5. J. Wilk, **K. Stando**, S. Bajkacz, **poster**: „Opracowanie metod ekstrakcji i oznaczania leków antybakteryjnych w próbkach środowiskowych”. XIII Polska Konferencja Chromatograficzna (Katowice, 25–28 czerwca 2023), konferencja krajowa.
6. J. Wilk, **K. Stando**, A. Grabowska, S. Bajkacz, **poster**: „Zastosowanie LC-MS/MS w ocenie stopnia degradacji farmaceutyków w ciekłych próbkach modelowych”. Zjazd Zimowy SMPTChem 2023 (Łódź, 9 grudnia 2023), konferencja krajowa.
7. A. Kicińska, **K. Stando**, S. Bajkacz, **poster**: „Rozkład mikrozanicyszczeń w procesach inicjowanych światłem słonecznym – identyfikacja produktów degradacji”. Zjazd Zimowy SMPTChem 2023 (Łódź, 9 grudnia 2023), konferencja krajowa.
8. A. Kicińska, **K. Stando**, E. Felis, S. Bajkacz, **wystąpienie ustne**: „Fotodegradacja tetracyklin w procesach inicjowanych światłem słonecznym”. I Warszawskie Sympozjum Chemiczne „w ProbUWce” (Warszawa, 27–28 kwietnia 2024), konferencja krajowa.

9. S. Bajkacz, **K. Stando**, J. Wilk, E. Korzeniewska, M. Harnisz, E. Felis, **wystąpienie ustne**: „Antibiotic residues in the environment”. XIV Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Chromatografia Jonowa i Techniki Pokrewne 2024 (Katowice, 9–10 kwietnia 2024), konferencja międzynarodowa.
10. S. Bajkacz, **K. Stando**, E. Felis, M. Harnisz, E. Korzeniewska, **wystąpienie ustne**: „Losy środków bakteriobójczych w ekosystemach rolniczych”. 66. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, PTChem 2024 (Poznań, 15–20 września 2024), konferencja krajowa.

#### *Projekty badawcze*

1. Kierownik w projekcie (maj 2020 – styczeń 2021): „Oznaczanie antybiotyków sulfonamidowych w próbkach wód powierzchniowych”, Badania statutowe, młodzi naukowcy (BKM-542/RCH-1/2020; 04/010/BKM20/0130).
2. Kierownik w projekcie (maj 2021 – styczeń 2022): „Badania wpływu procesów fotokatalitycznych na stabilność wybranych farmaceutyków”, Badania statutowe, młodzi naukowcy (BKM-516/RCH1/2021; 04/010/BKM21/1023).
3. Kierownik w projekcie (maj 2022 – styczeń 2023): „Zastosowanie fitoremediacji do oczyszczania wód z pozostałości środków bakteriobójczych”, Badania statutowe, młodzi naukowcy (BKM-593/RCH1/2022; 04/010/BKM22/1046).
4. Kierownik w projekcie (17 maja 2022 – 16 listopada 2023): „Zastosowanie fitoremediacji do oczyszczania wód z pozostałości niesteroidowych leków przeciwzapalnych”, Grant na rozpoczęcie działalności naukowej w nowej tematyce badawczej (IDUB: 32/014/SDU/10-22-38).
5. Wykonawca w projekcie (październik 2019 – sierpień 2022): „Lekooporność drobnoustrojów środowiskowych w perspektywie podejścia holistycznego "Jedno Zdrowie", Projekt OPUS 14 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) (2017/27/B/NZ9/00267).



# **Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej**

**Oświadczenia współautorów  
publikacji określające ich  
indywidualny wkład autorski**