

Katarzyna Affek, Monika Załęska-Radziwiłł, Maria Łebkowska

## Wyznaczanie bezpiecznej zawartości leków w środowisku wodnym na podstawie badań ekotoksykologicznych

Stosowanie farmaceutyków w leczeniu ludzi i zwierząt hodowlanych powoduje dostawanie się pozostałości leków oraz metabolitów ich biotransformacji do ścieków, wód powierzchniowych i w konsekwencji do wody przeznaczonej do spożycia. Według podziału farmaceutycznego wyróżniono 13 głównych grup leków działających m.in. na układ nerwowy i układ krążenia, stosowanych w chorobach układu oddechowego, pokarmowego oraz w terapii chorób nowotworowych [1]. W Niemczech wykorzystuje się około 2700 preparatów leczniczych, a produkcja 900 różnych substancji aktywnych wynosi 38 tys. ton rocznie [2]. W Polsce wytwarza się około 2500 preparatów [3]. W środowisku wodnym wykrywa się leki w ilościach od  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  do  $\text{mg}/\text{m}^3$ , przy czym największe ich zawartości występują w ściekach farmaceutycznych i szpitalnych, natomiast mniejsze w wodach powierzchniowych i w wodzie przeznaczonej do spożycia. Z danych ekotoksykologicznych wynika, że większość leków nie wywiera znacznego szkodliwego wpływu na organizmy badane w testach ostrych, krótkoterminowych. Stwierdzono natomiast, że farmaceutyki charakteryzuje toksyczność przewlekła (chroniczna), wynikająca z długotrwałego oddziaływania na bioindykatory w testach chronicznych.

W tabeli 1 podano przykładowe wyniki badań ekotoksykologicznych (test ostry i test chroniczny) dotyczących wybranych leków na tle ich ilości wykrywanych w wodach powierzchniowych [4]. Dane te wskazują, że analizowane leki działają szkodliwie na organy ryb podczas ekspozycji długoterminowej w ilościach mniejszych niż wykrywane w wodzie powierzchniowej. Stąd też wielu autorów postuluje konieczność prowadzenia badań toksyczności chronicznej farmaceutyków [5–8] i wyznaczania wartości NOEC (no observed effect concentration), które służą do określania takich ich ilości, które nie wywołują szkodliwych skutków w środowisku (PNEC – predicted no effect concentration). Ilości te można wyznaczyć metodą obligatoryjnych współczynników bezpieczeństwa, zalecaną przez EMA (European Medicines Agency), stosując współczynnik AF (assessment factor) równy 10 lub metodami statystycznych modeli ekstrapolacyjnych [9, 10]. Wyznaczona wartość PNEC służy do oceny ryzyka wywołanego obecnością szkodliwych związków w środowisku wodnym, zgodnie ze wzorem PEC/PNEC (PEC – predicted environmental concentration). Wartość PEC wylicza się zgodnie z procedurą [9] – jeśli  $\text{PEC}/\text{PNEC} \geq 1$ , wówczas ryzyko

Tabela 1. Ekotoksyczność wybranych leków i ich maksymalne ilości wykryte w wodzie powierzchniowej [4]

Table 1. Ecotoxicity of selected pharmaceuticals and their maximum concentrations detected in surface water [4]

Wskaźnik, jednostka	Diklofenak	Karbamazepina	Metoprolol
Zawartość, $\text{mg}/\text{m}^3$	2	1,6	2,2
Test ostry LC(EC) <sub>50</sub>	22430	>13800	438000
Test chroniczny LOEC* (uszkodzony organ)	1 (wątroba, nerki, skrzel)	1 (nerki)	1 (wątroba)

\*LOEC (lowest observed effect concentration) określone dla pstrąga tęczowego i karpia

określa się jako duże, a jeśli  $\text{PEC}/\text{PNEC} < 1$  – ryzyko jest niewielkie. Wielu autorów uważa, że szacowanie ryzyka w oparciu o jednogatunkowe testy toksyczności dostarcza informacji o względnej szkodliwości badanego związku chemicznego i nie może charakteryzować ryzyka w całym analizowanym ekosystemie. Do weryfikacji tzw. ilości bezpiecznych (PNEC) postuluje się prowadzenie badań wielogatunkowych w modelowych zbiornikach wodnych typu mikrokosm i mezokosm, różniących się objętością, zasiedleniem organizmami i doбором kryteriów służących do oceny punktów końcowych reakcji testowych [11–14].

Należy podkreślić, że w ostatnim dziesięcioleciu nastąpił wzrost zainteresowania problematyką ekotoksyczności leków, ich oznaczaniem w środowisku wodnym i metodami eliminacji farmaceutyków ze ścieków i wody przeznaczonej do spożycia. Najwięcej danych dotyczy związków sterydowych, w tym hormonów, leków przeciwzapalnych i regulujących ciśnienie krwi oraz regulatorów tłuszczu, natomiast niewiele informacji można znaleźć o szkodliwości leków stosowanych w chemioterapii nowotworów. Na przykład cytostatyk 5-fluorouracyl powoduje inhibicję biosyntezy monofosforanu tymidyny, co zakłóca replikację DNA i proliferację komórek nowotworowych.

Stąd też celem niniejszej pracy było wykorzystanie testu wielogatunkowego do weryfikacji tzw. bezpiecznej ilości 5-fluorouracylu (PNEC) wyznaczonej na podstawie testów jednogatunkowych. Analizowany lek jest wykorzystywany w leczeniu raka piersi, skóry, pęcherza moczowego i płuc, a jego roczne zużycie wynosi około 120 kg (Austria). Wykryte w ściekach szpitalnych ilości tego farmaceutyku wyniosły  $20 \div 122 \text{ mg}/\text{m}^3$  (Austria) oraz  $27 \text{ mg}/\text{m}^3$  (Szwajcaria) [15].

## Materiały i metody

W badaniach użyto 5-fluorouracylu (nr CAS 51-21-8) o masie 130,08 g/mol i sumarycznym wzorze  $C_4H_3FN_2O_2$  (Fluka). Przeprowadzono następujące testy jednogatunkowe:

- wzrostowy przy użyciu sinic (PN-EN ISO 8692:2008),
- wzrostowy przy użyciu rzęsy drobnej (PN-EN ISO 20079:2004),
- wzrostowy na rybach (OECD 215),
- wzrostowy na pierwotniakach (Microbiotests, Belgia),
- przeżywalności na rybach (PN-C-04610-04:1990),
- immobilizacji na skorupiakach (Microbiotests, Belgia),
- reprodukcji na skorupiakach (OECD 211).

Stężenia śmiertelne i efektywne ( $LC(EC)_{50}$ ) leku obliczono metodą probitową, określając 95% przedziały ufności [8,16]. Wartość NOEC wyznaczono w testach chronicznych przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji i testu Tukeya [17], a wartość PNEC obliczono z najmniejszej wartości NOEC uzyskanej w testach jednogatunkowych stosując  $AF=10$ , zgodnie z procedurą EMA. Jako PEC, czyli przewidywaną zawartość 5-fluorouracylu w wodzie powierzchniowej przyjęto:  $PEC_1=0,005 \text{ mg/m}^3$  (obliczony z uwzględnieniem tylko dobowego zużycia leku) i  $PEC_2=0,00064 \text{ mg/m}^3$  (obliczony z uwzględnieniem wskaźnika penetracji rynku) [15]. Ocenę ryzyka określono z ilorazu  $PEC/PNEC$ . Wartość PNEC, wyznaczoną z użyciem najbardziej wrażliwego bioindykatora uznana za bezpieczną, zweryfikowano w modelu ekosystemu typu mikrokosm. Model ten stanowiło akwarium zawierające  $10 \text{ dm}^3$  wody oczyszczonej w biofiltrze i zasiedlonej rzęsą drobną (*Lemna minor*) oraz cyjanobakteriami i glonami. Reprezentantami zwierząt były skorupiaki *Daphnia magna* i *Heterocypris incongruens* oraz ryby *Danio rerio*. Osad denni stanowiła warstwa piasku i osad czynny (mikrobenos) umieszczony w krystalizatorach. Po dwóch tygodniach adaptacji organizmów wprowadzono 5-fluorouracyl w ilości bezpiecznej (PNEC). Badania prowadzono przez 4 tygodnie, przez które utrzymywano ciągle napowietrzanie wody i warunki świetlne 12 h/12 h. Badania kontrolne przeprowadzono na początku doświadczeń oraz po 14 d i 28 d. Analizy fizyczno-chemiczne obejmowały następujące wskaźniki: temperatura, pH (pH-metr EPP-3t Elmetrum), RWO (spektrofotometr TOC 5000 Shimadzu), ChZT oraz związki azotu i fosforu [18–22]. Badania biologiczne polegały na ocenie zmian ilościowych organizmów planktonu i osadu dennego oraz wyznaczeniu wskaźników ogólnej różnorodności gatunkowej Shannona-Wienera ( $H'$ ) [23], jak również przyrostu liczby i powierzchni listków *Lemna minor* (przy użyciu oprogramowania komputerowego do cyfrowej analizy obrazu UTHSCSA Image Tool v. 3.0). Określono także zmiany liczby bakterii na podłożu agarowym MPA [24]. Równolegle ustawiono próbkę kontrolną jak wyżej, ale bez dodatku 5-fluorouracylu.

## Dyskusja wyników badań

Na podstawie wyników jednogatunkowych testów ekotoksyczności sporządzono profil szkodliwości 5-fluorouracylu, ustawiając wartości NOEC od największej do najmniejszej (tab. 2). Najmniejszą wartość NOEC ( $0,006 \text{ mg/m}^3$ ) otrzymano w teście reprodukcji *Daphnia magna*. Posłużyła ona do wyznaczenia wartości PNEC (przy  $AF=10$ ) 5-fluorouracylu, tj.  $0,0006 \text{ mg/m}^3$ . W tabeli 3 przedstawiono ocenę ryzyka 5-fluorouracylu w stosunku do organizmów wodnych.

Tabela 2. Profil toksyczności 5-fluorouracylu w odniesieniu do organizmów wodnych [8,16]

Table 2. 5-fluorouracil toxicity profile in regard to aquatic organisms [8,16]

Bioindykator	Rodzaj testu	Czas h	NOEC $\text{mg/m}^3$
<i>Danio rerio</i>	wzrostowy (narybek)	672	<1560
<i>Lebistes reticulatus</i>	wzrostowy (narybek)	672	<1560
<i>Tetrahymena thermophila</i>	wzrostowy	24	195
<i>Scenedesmus obliquus</i>	wzrostowy	72	100
<i>Desmodesmus quadricauda</i>	wzrostowy	72	100
<i>Microcystis aeruginosa</i>	wzrostowy	72	40
<i>Lemna minor</i>	wzrostowy (pow. liści)	168	25
<i>Lemna minor</i>	wzrostowy (liczba liści)	168	13
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	wzrostowy	72	5
<i>Daphnia magna</i>	reprodukcji	672	0,006

Z danych zawartych w tabeli 3 wynika, że niezależnie od spodziewanej zawartości 5-fluorouracylu w wodzie ( $PEC_1$  i  $PEC_2$ ) ryzyko związane z obecnością tego związku w ekosystemach w stosunku do zwierząt bezkręgowych jest duże. Wartość PNEC równą  $0,0006 \text{ mg/m}^3$ , uznana jako bezpieczna wg procedury EMA, zweryfikowano w modelu mikrokosmowym, w którym działaniu 5-fluorouracylu poddano biocenozę złożoną z przedstawicieli producentów, konsumentów i destruktorów. W czasie 28 d badań nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach wskaźników fizyczno-chemicznych pomiędzy próbką badaną a kontrolną (tab. 4). W obu próbkach zaobserwowano zwiększenie wartości ChZT – wskaźnik ten osiągnął najwyższą wartość w ostatnim dniu badań, co wiązało się prawdopodobnie z obecnością produktów przemian metabolicznych organizmów i odchodów zwierzęcych.

Tabela 3. Ocena ryzyka 5-fluorouracylu w odniesieniu do organizmów wodnych

Table 3. Risk assessment for 5-fluorouracil in regard to aquatic organisms

PNEC $\text{mg/m}^3$	PEC $\text{mg/m}^3$	PEC/PNEC	Ocena ryzyka
0,0006	$PEC_1: 0,005$ $PEC_2: 0,00064$	8,30 1,06	duże ryzyko

Zmiany w liczebności organizmów planktonu przedstawiono w tabeli 5. Wyniki badań wykazały, że ogólna liczba glonów w 14. dobie badań zmniejszyła się w obecności 5-fluorouracylu, a w próbce kontrolnej wzrosła. Zaobserwowano także, że liczba skorupiaków w obu próbkach zwiększała się w czasie, jednak przyrost liczby zwierząt w wodzie zawierającej 5-fluorouracyl był znacznie mniejszy. Nie stwierdzono istotnych różnic między zawartością bakterii w próbce badanej i kontrolnej. Okazało się, że 5-fluorouracyl nie wpływał na wzrost i rozwój *Lemna minor* oraz bioróżnorodność fitoplanktonu, natomiast ograniczał bioróżnorodność organizmów mikrobenos (tab. 6–9).

Na podstawie analizy mikroskopowej organizmów osadu dennego w próbce z 5-fluorouracylem po 28 d wykryto jedynie *Colpidium colpoda*, natomiast w tym czasie w próbce kontrolnej nastąpił rozwój *Paramecium* sp.,

Tabela 4. Wyniki badań jakości wody w modelowym ekosystemie wodnym typu mikrokosm w obecności 5-fluorouracylu  
Table 4. Water quality results in microcosm study in the presence of 5-fluorouracil

Próbka	Wskaźnik, jednostka	Badanie po czasie		
		0d	14 d	28 d
5-Fluorouracyl (0,0006 mg/m <sup>3</sup> )	temperatura, °C	20	20	20
	pH	8,5	8,2	8,2
	ChZT, gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	44,6	102,2	270
	RWO, gC/m <sup>3</sup>	1,2	12,7	5,1
	azot amonowy, gN/m <sup>3</sup>	<0,02	0,35	–*
	azotyny, gN/m <sup>3</sup>	0,91	0,004	0,35
	azotany, gN/m <sup>3</sup>	0,9	0,9	1,4
	fosforany, gP/m <sup>3</sup>	2,7	1,8	2,7
Próbka kontrolna	temperatura, °C	20	20	20
	pH	8,5	7,7	8,2
	ChZT, gO <sub>2</sub> /m <sup>3</sup>	53,6	111,1	256,5
	RWO, gC/m <sup>3</sup>	0,76	4,94	6,94
	azot amonowy, gN/m <sup>3</sup>	0,34	0,01	2,48
	azotyny, gN/m <sup>3</sup>	0,09	0,006	0,07
	azotany, gN/m <sup>3</sup>	1,0	1,2	0,5
	fosforany, gP/m <sup>3</sup>	1,7	0,5	3,6

\*poza zakresem oznaczenia

Tabela 5. Liczba organizmów planktonu w modelowym ekosystemie wodnym typu mikrokosm w obecności 5-fluorouracylu  
Table 5. Number of planktonic organisms in microcosm study in the presence of 5-fluorouracil

Próbka	Wskaźnik	Badanie po czasie		
		0d	14 d	28 d
5-Fluorouracyl (0,0006 mg/m <sup>3</sup> )	ogólna liczba glonów w 1 cm <sup>3</sup>	546000	95832	172656
	liczba organizmów w 10 dm <sup>3</sup> <i>Daphnia magna</i> <i>Heterocypris incongruens</i>	17	277	912
		10	72	270
Próbka kontrolna	ogólna liczba glonów w 1 cm <sup>3</sup>	524 000	696 960	57 024
	liczba organizmów w 10 dm <sup>3</sup> <i>Daphnia magna</i> <i>Heterocypris incongruens</i>	28	166	2531
		8	78	673

*Trinema sp.* i *Centropyxis sp.* Zastosowana w badaniach modelowych tzw. bezpieczna zawartość 5-fluorouracylu (0,0006 mg/m<sup>3</sup>) okazała się zbyt duża, ponieważ wpłynęła negatywnie na bioróżnorodność organizmów osadu dennego i liczebność skorupiaków w planktonie. Eksperyment wielogatunkowy (mikrokosm) potwierdził ocenę ryzyka wyznaczonego w przypadku organizmów wodnych w testach jednogatunkowych, z której wynikało, że przy określonych dwóch wartościach PEC ryzyko związane z obecnością 5-fluorouracylu było duże. Nie wykazano szkodliwości 5-fluorouracylu w stosunku do ryb, co było zgodne z danymi literaturowymi [25]. W testach immobilizacji *D. magna* omówionych w pracach [25, 26] uzyskano mniejsze wartości EC<sub>50</sub> (odpowiednio 36 000 mg/m<sup>3</sup> i 20 000 mg/m<sup>3</sup>) od uzyskanych w niniejszych badaniach

(>100 000 mg/m<sup>3</sup>). Chroniczny test reprodukcji tych skorupiaków dowiódł natomiast szkodliwego wpływu 5-fluorouracylu (NOEC=0,006 mg/m<sup>3</sup>), gdy tymczasem w piśmiennictwie można spotkać większe wartości (2,8 mg/m<sup>3</sup>) [27].

W celu ograniczenia możliwości przedostawania się pozostałości leków do wód ujmowanych przez zakłady wodociągowe proponuje się stosowanie wysokoefektywnych metod utleniania ścieków ze szpitali i przemysłu farmaceutycznego [28]. Podejmuje się także badania nad wykrywaniem oraz usuwaniem farmaceutyków z wody przeznaczonej do spożycia, m.in. przez filtrację na granulowanym węglu aktywnym, ozonowanie, chlorowanie oraz nanofiltrację [29–31]. Problematyka występowania leków i ich skutecznej eliminacji z wody pozostaje nadal otwarta i wymaga intensywnych badań.

Tabela 6. Liczba organizmów fitoplanktonu w modelowym ekosystemie wodnym typu mikrokosm w obecności 5-fluorouracylu  
 Table 6. Number of phytoplanktonic organisms in microcosm study in the presence of 5-fluorouracil

Próbka	Organizm	Liczba organizmów w 1cm <sup>3</sup> po czasie		
		0d	14d	28d
5-Fluorouracyl (0,0006 mg/m <sup>3</sup> )	<i>Microcystis aeruginosa</i>	24000	1584	7920
	<i>Chlorella vulgaris</i>	16000	3168	8712
	<i>Synechococcus nidulans</i>	2000	0	7128
	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	16000	30096	66528
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	116000	3168	19800
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	372000	57816	54648
	<i>Navicula</i> sp.	0	0	7920
Próbka kontrolna	<i>Microcystis aeruginosa</i>	34000	6336	0
	<i>Chlorella vulgaris</i>	68000	22176	5544
	<i>Synechococcus nidulans</i>	0	0	4752
	<i>Desmodesmus quadricauda</i>	0	142560	15840
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	34000	26136	0
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	388000	499752	17424
	<i>Navicula</i> sp.	0	0	13464

Tabela 7. Liczba organizmów mikrobentosu w modelowym ekosystemie wodnym typu mikrokosm w obecności 5-fluorouracylu  
 Table 7. Number of microbenthic organisms in microcosm study in the presence of 5-fluorouracil

Próbka	Organizm	Liczba organizmów w 1 cm <sup>3</sup> po czasie		
		0d	14d	28d
5-Fluorouracyl (0,0006 mg/m <sup>3</sup> )	<i>Litonotus</i> sp.	368	0	0
	<i>Colpidium colpoda</i>	2944	792	792
	<i>Arcella</i> sp.	552	0	0
	<i>Euglypha</i> sp.	1288	0	0
	<i>Antophysa</i> sp.	92	0	0
	<i>Paramecium</i> sp.	644	0	0
	<i>Trinema</i> sp.	92	0	0
	<i>Pyxidicula</i> sp.	184	792	0
	<i>Euplotes</i> sp.	92	0	0
	<i>Saprodinium dentatum</i>	0	0	0
	<i>Centropyxis</i> sp.	0	0	0
	<i>Euglena</i> sp.	0	0	0
Próbka kontrolna	<i>Litonotus</i> sp.	368	0	0
	<i>Colpidium colpoda</i>	2944	1980	0
	<i>Arcella</i> sp.	552	396	0
	<i>Euglypha</i> sp.	1288	396	0
	<i>Antophysa</i> sp.	92	0	0
	<i>Paramecium</i> sp.	644	0	3168
	<i>Trinema</i> sp.	92	0	3960
	<i>Pyxidicula</i> sp.	184	0	0
	<i>Euplotes</i> sp.	92	0	0
	<i>Saprodinium dentatum</i>	0	792	0
	<i>Centropyxis</i> sp.	0	0	792
	<i>Euglena</i> sp.	0	1980	0

Tabela 8. Zmiany bioróżnorodności organizmów fitoplanktonu wg wskaźnika Shannona-Wienera w modelowym ekosystemie wodnym typu mikrokosm w obecności 5-fluorouracylu

Table 8. Changes in biodiversity of phytoplankton (Shannon-Wiener index) in microcosm study in the presence of 5-fluorouracil

Próbka	Wskaźnik Shannona-Wienera (H') po czasie		
	0 d	14 d	28 d
5-Fluorouracyl (0,0006 mg/m <sup>3</sup> )	1,0	1,0	1,5
Próbka kontrolna	0,8	0,8	1,5

Tabela 9. Zmiany bioróżnorodności organizmów mikrobentosu wg wskaźnika Shannona-Wienera w modelowym ekosystemie wodnym typu mikrokosm w obecności 5-fluorouracylu

Table 9. Changes in biodiversity of microbenthos (Shannon-Wiener index) in microcosm study in the presence of 5-fluorouracil

Próbka	Wskaźnik Shannona-Wienera (H') po czasie		
	0 d	14 d	28 d
5-Fluorouracyl (0,0006 mg/m <sup>3</sup> )	1,6	0,7	0
Próbka kontrolna	1,6	1,4	1,0

## Wnioski

◆ Przeprowadzone badania potwierdziły konieczność wykonywania testów chronicznych leków w ocenie ryzyka, co wykazały małe wartości NOEC w przypadku 5-fluorouracylu uzyskane w testach reprodukcji *Daphnia magna*.

◆ Współczynnik AF=10 (wg zaleceń EMA) nie może stanowić podstawy do szacowania bezpiecznej ilości farmaceutyków dla biocenoz wodnych. Badania bioróżnorodności wykazały, że tzw. zawartość bezpieczna 5-fluorouracylu powodowała zmniejszenie wartości wskaźnika Shannona-Wienera w odniesieniu do organizmów mikrobentosu, w porównaniu z wartością tego wskaźnika w próbce kontrolnej.

◆ Podstawę do ekotoksykologicznej oceny ryzyka wywołanego obecnością leków w wodach powierzchniowych powinien stanowić zestaw testów chronicznych uzupełniony badaniami molekularnymi oraz testami wielogatunkowymi typu mikrokosm.

## LITERATURA

1. M. GORCZYCA, A. ZEJC: Chemia leków: podręcznik dla studentów farmacji i farmaceutów (wyd. III). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
2. K. KÜMMERER: Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 2008.
3. A. KOT-WASIK, J. DĘBSKA, J. NAMIEŚNIK: Przemiany, stężenia i oznaczanie pozostałości środków farmaceutycznych w środowisku. W: Nowe Horyzonty i Wyzwania w Analityce i Monitoringu Środowiskowym. CEEAM, Gdańsk 2003.
4. M. ŁEBKOWSKA: Występowanie i ekotoksyczność wybranych leków w środowisku wodnym. *Prace naukowe Politechniki Warszawskiej. Inżynieria Środowiska* 2009, vol. 59, nr 56, ss. 5–11.
5. R. TRIEBSKORN, H. CASPER, A. HEYD, R. EIKEMPER, H.-R. KÖHLER, J. SCHWAIGER: Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 2004, Vol. 68, No. 2, pp. 151–166.
6. K. FENT, A.A. WESTON, D. CAMINADA: Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 2006, Vol. 76, No. 2, pp. 122–159.
7. C. CARLSSON, A.-K. JOHANSSON, G. ALVAN, K. BERGMAN, T. KÜHLER: Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I. Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment* 2006, Vol. 364, No. 1–3, pp. 67–87.
8. M. ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ, M. ŁEBKOWSKA, K. AF-FEK, A. ZARZECZNA: Environmental risk assessment of selected pharmaceuticals present in surface waters in relation to animals. *Archives of Environmental Protection* 2011, Vol. 37, No. 3, pp. 31–42.
9. Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use. European Medicines Agency (EMA), London 2006.
10. M. ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ: Badania ekotoksykologiczne w procesie ekologicznej oceny ryzyka w środowisku wodnym. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2007.
11. J.H. KENNEDY, T.W. la POINT, P. BALCI, J.K. STANLEY, Z.B. JOHNSON: Model aquatic ecosystems in ecotoxicological research: Consideration of design, implementation and analysis. In: Handbook of Toxicology, CRC Press LLC, Lewis Publishers 2003.
12. W.G. LANDIS, M. YU: Introduction to Environmental Toxicology. Impacts of Chemicals upon Ecological Systems. CRC Press LLC, Lewis Publishers 2004.
13. T.C.M. BROCK, R.P.A. van WIJNGAARDEN, G. van GEEST: Ecological Risk of Pesticides in Freshwater Ecosystems. Part 2: Insecticides. Alterra, Report 089, Wageningen (Netherlands) 2000.
14. F.B. TAUB: Unique information contributed by multispecies systems: examples from the standardized aquatic microcosm. *Ecological Applications* 1997, Vol. 7, No. 4, pp. 1103–1110.
15. J.O. STRAUB: Combined environmental risk assessment for 5-fluorouracil and capecitabine in Europe. *Integrated Environmental Assessment and Management* 2009, Vol. 6, pp. 540–566.
16. M. ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ, M. ŁEBKOWSKA, K. AF-FEK, N. CHRZANOWSKA: Ocena ryzyka wywołanego obecnością wybranych farmaceutyków w wodach powierzchniowych w stosunku do sinic i roślin. *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* 2011, vol. 48, ss. 372–382.
17. P.M. BERTHOUEX, L.C. BROWN: Statistic for Environmental Engineers. Lewis Publishers, CRC Press Inc. 1994.
18. PN-ISO 6060:2006 Jakość wody – Oznaczanie chemicznego zapotrzebowania tlenu.
19. PN-C-04576-06:1973 Woda i ścieki – Badania zawartości związków azotu – Oznaczanie azotu azotynowego metodą kolorymetryczną z kwasem sulfanilowym i 1-naftyloaminą.
20. PN-C-04576-08:1982 Woda i ścieki – Badania zawartości związków azotu – Oznaczanie azotu azotanowego metodą kolorymetryczną z salicylanem sodowym.
21. PN-C-04576-4:1994 Woda i ścieki – Badania zawartości związków azotu – Oznaczanie azotu amonowego w wodzie metodą bezpośredniej nessleryzacji.
22. PN-EN ISO 6878:2006 Jakość wody – Oznaczanie fosforu – Metoda spektrometryczna z molibdenianem amonu.
23. C.J. KREBS: Ecological Methodology. 2nd ed. Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park (USA) 1999.
24. A. GRABIŃSKA-LONIEWSKA [red.]: Ćwiczenia laboratoryjne z mikrobiologii ogólnej. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999.
25. R. ZAUNKOVÁ, P. ODRASKA, L. DOLEZALOVA, K. HIL-SCHEROVA, B. MARSALEK, L. BLAHA: Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytostatic pharmaceuticals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2007, Vol. 26, No.10, pp. 2208–2214.
26. M. CLEUVERS: Aquatische ökotoxikologie von Arzneimitteln: Algentest und akuter Daphnientest. *UWSF Z Umweltchem Okotox* 2002, Vol. 14, No. 2, pp. 85–89.

27. S. JERGENTZ, M. GOTH, C. SECK: Fluorouracil: A study on the chronic toxicity to *Daphnia magna* according to the OECD Guideline 211. ECT Oekotoxicologie GmbH, 2009.
28. K. IKEHATA, N.J. NAGHASHKAR, M.G. EL-DIN: Degradation of aqueous pharmaceuticals by ozonation and advanced oxidation processes: A review. *Ozone Science and Engineering* 2006, Vol. 28, No. 6, pp. 353–414.
29. M. HUERTA-FONTELA, M.T. GALCERAN, F. VENTURA: Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research* 2011, Vol. 45, No. 3, pp. 1432–1442.
30. P.E. STACKELBERG, J. GIBBS, E.T. FURLONG, M.T. MEYER, S.D. ZAUGG, R.L. LIPPINCOTT: Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds. *Science of The Total Environment* 2007, Vol. 377, No. 2–3, pp. 255–272.
31. N.C. ROWNEY, A.C. JOHNSON, R.J. WILLIAMS: Cytotoxic drugs in drinking water: A prediction and risk assessment exercise for the Thames catchment in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2009, Vol. 28, No. 12, pp. 2733–2743.

---

**Affek, K., Zaleska-Radziwiłł, M., Lebkowska, M. Determination of Safe Concentration Limits of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment Based on Ecotoxicological Studies. *Ochrona Środowiska* 2013, Vol. 35, No. 4, pp. 51–56.**

**Abstract:** The results of ecotoxicological research on determination of safe concentration limits of 5-fluorouracil (anticancer drug) in water were discussed. A method for determination of safe concentrations of pharmaceuticals according to the EMA (European Medicines Agency) guidelines was employed for this purpose. The procedure was verified in microcosm, multispecies model ecosystem studies. The experiments demonstrated that concentrations determined in water by the EMA recommended method cannot be considered safe. Additionally, the coefficient AF=10

(acc. to EMA recommendations) cannot form the basis for estimates of safe concentration limits of pharmaceuticals in aquatic biocenoses. The bioequivalence studies showed that so-called safe 5-fluorouracil concentration led to decrease in Shannon-Wiener index value in regard to microbentos. It was found that ecotoxicological risk assessment for the presence of pharmaceutical in surface waters should be based on chronic test set supported with molecular studies and multispecies microcosm testing. It should be noted that safe concentrations of pharmaceuticals that cause no risk to aquatic biota and humans should form the basis for the process optimization in regard to wastewater treatment and elimination of medicines from potable water.

**Keywords:** Water quality, 5-fluorouracil, safe concentration, microcosm.