



EKOTOKSYKOLOGIA
Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie 1 i 2

**OCENA EKOTOKSYCZNOŚCI Z
WYKORZYSTANIEM PRZEDSTAWICIELA
ROŚLIN WYŻSZYCH –
RZĘSY WODNEJ (*Lemna minor*)**

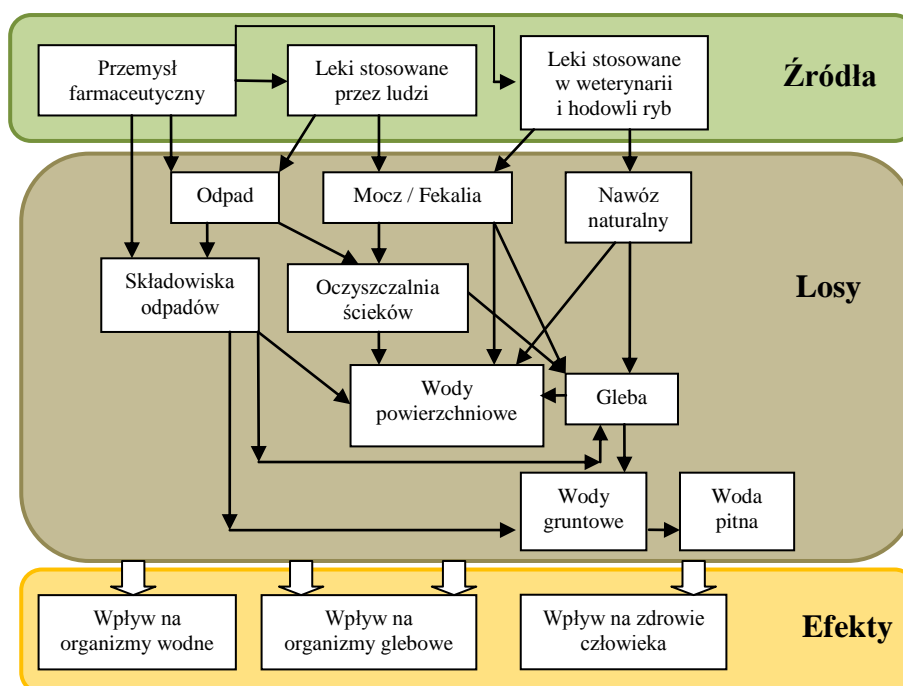
Gdańsk, 2017

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Od niemal 15 lat obszar chemii i toksykologii środowiska coraz częściej obejmuje ocenę obecności tak zwanych nowo pojawiających się zanieczyszczeń organicznych (ang. *new emerging pollutants*), które stanowią potencjalne zagrożenie zarówno dla całych ekosystemów jak i bezpośrednio dla zdrowia człowieka [1-2]. Do tego rodzaju zanieczyszczeń zaliczone zostały między innymi pozostałości różnych środków farmaceutycznych, spośród których największe zagrożenie niosą leki o działaniu przeciwbakteryjnym (antybiotyki i chemioterapeutyki), głównie ze względu na przyczynianie się do niebezpiecznego zjawiska antybiotykooporności [3-8].

Obie grupy leków są szeroko stosowane nie tylko w celach leczniczych czy profilaktycznych, ale także jako promotory wzrostu [3, 9]. Oszacowano, iż związki te w lecznictwie człowieka stanowią zaledwie trzecią grupę co do wielkości i częstości zastosowania, natomiast w weterynarii aż 70 % zużywanych farmaceutyków to antybiotyki i chemioterapeutyki [10]. Wiadomo, że nie podlegają one całkowitej eliminacji w organizmie żywym i są z niego wydalane zarówno w postaci niezmienionej jak i pod postacią metabolitów [11-15]. W efekcie różnymi drogami przedostają się do środowiska naturalnego (**Rysunek 1**) [2, 10, 16].

Niewątpliwie obecność zanieczyszczeń pochodzenia farmaceutycznego w środowisku nie jest nowym zjawiskiem, ale stosunkowo niedawno ujawnionym. Historia badań pozostałości antybiotyków w środowisku sięga lat 80-tych, kiedy to po raz pierwszy wykryto je w wodach powierzchniowych [17-18]. Jednak zainteresowanie tym problemem wzrosło dopiero na przełomie wieków, kiedy to w 1999 roku Hirsch i współpracownicy opublikowali wyniki badań dotyczące obecności pozostałości antybiotyków w ściekach oczyszczonych oraz wodach powierzchniowych na terenie Niemiec [19]. Mimo iż od tego czasu bardzo wiele uwagi poświęcano oszacowaniu źródeł emisji i stopnia narażenia na obecność pozostałości tych związków w środowisku, wciąż niewiele wiadomo na temat rzeczywistego zagrożenia, jakie niosą one dla środowiska i zdrowia człowieka [2, 20].



Rysunek 1. Źródła oraz drogi rozprzestrzeniania się leków w środowisku

Stężenia pozostałości antybiotyków i chemioterapeutyków weterynaryjnych w środowisku są niskie (rzędu ppb, ppt), mimo to stały dopływ tych zanieczyszczeń do środowiska w połączeniu z ich właściwościami fizykochemicznymi może być przyczyną długotrwałej ekspozycji organizmów wodnych jak i glebowych na te związki. Ciągłe narażenie w połączeniu z aktywnością biologiczną tych substancji może być wystarczające do wywołania negatywnych, odległych efektów toksycznych.

Sulfonamidy (do których należy sulfadimetoksyna), ze względu na niską cenę oraz relatywnie wysoką skuteczność w zwalczaniu wielu chorób bakteryjnych, stosowane są w medycynie jak i weterynarii od ponad 60 lat [11, 13, 23]. Mimo iż w chwili obecnej, ze względu na udowodniony niekorzystny wpływ na zdrowie człowieka, stanowią one grupę leków coraz rzadziej stosowaną w medycynie, w dalszym ciągu są farmaceutykami pierwszego wyboru w weterynarii [11, 23-24]. Potwierdza to fakt, iż zajmują drugie miejsce najczęściej stosowanych leków weterynaryjnych w krajach Unii Europejskiej [9, 25-26]. Szacuje się, iż od momentu odkrycia ich właściwości przeciwbakteryjnych przez Gerharda Domagk`a w 1935 r., dostępnych było około 5000 różnych sulfonamidów, z czego w praktyce do najczęściej stosowanych zalicza się jedynie kilkanaście związków [12-13, 27-28]. Dotychczas opublikowane wyniki badań wskazują, iż leki te cechują się wysoką trwałością w środowisku oraz względnie niskim potencjałem sorpcyjnym. Pośród pozostałych klas antybiotyków i chemioterapeutyków charakteryzują się więc największym ryzykiem przenikania do wód powierzchniowych i gruntowych, stanowiąc tym samym zagrożenie

dla całych ekosystemów wodnych i zdrowia człowieka [29]. Mimo tego wciąż niepoznane są skutki, jakie mogą wywołać pozostałości tych leków w przyrodzie.

Ze względu na dużą ilość zarejestrowanych farmaceutyków na całym świecie (np. 3000 tylko w samej Wielkiej Brytanii), niemożliwe jest przetestowanie toksyczności każdego z nich wobec kilku różnych organizmów. Z tych względów, w celu dokonania oceny ryzyka ekotoksykologicznego, konieczne jest przeprowadzenie pewnego rodzaju selekcji, np. na podstawie ilości stosowanych preparatów, czy też ich potencjalnej toksyczności. Do tego celu często wykorzystywane są różnego rodzaju metody obliczeniowe, dzięki którym możliwe jest jednoczesne oszacowanie toksyczności dla szerokiej grupy leków wobec danych organizmów, wykorzystując do tego celu zależności struktura – aktywność [30-32]. Mimo, iż metody te są z pewnością niezmiernie użyteczne i pomocne w przewidywaniu toksyczności i zachowania się danego związku w środowisku, nie są w stanie zastąpić testów *in vivo* oraz *in vitro* [10].

Szerokie zastosowanie w ocenie ryzyka ekotoksykologicznego wielu substancji chemicznych znajdują natomiast metody biologiczne wykorzystujące organizmy żywe jako receptory określonych zanieczyszczeń. Wyróżnić można tutaj:

- **bioczujniki**, w których składnik aktywny biologicznie (bakterie, enzymy, przeciwciała i in.) stanowi część urządzenia pomiarowego;
- **biotesty**, w których materiał biologiczny stanowi oryginalne urządzenie kontrolno-pomiarowe [33].

Zastosowanie tych ostatnich ma w chwili obecnej kluczowe znaczenie w ocenie ryzyka ekotoksykologicznego pozostałości farmaceutyków w środowisku.

Organizmy wykorzystywane w biotestach muszą spełniać odpowiednie kryteria, tj.:

- powszechność występowania oraz całoroczna dostępność;
- niewielkie zróżnicowanie pod względem genetycznym oraz brak chorób i pasożytów;
- wysoka przeżywalność w warunkach prowadzenia testu – zwykle w laboratorium w niewielkich naczyniach;
- reprezentatywność dla danego ekosystemu oraz miarodajność oddziaływań na różnych obszarach;
- względnie duża tolerancja w stosunku do badanych zanieczyszczeń;
- prostota zależności między stężeniem zanieczyszczeń w środowisku a mierzonym parametrem, np.: zahamowaniem wzrostu, zmianom morfologicznym itp.;
- niezmienność parametrów podczas transportu oraz w czasie potrzebnym na ich pomiar [33].

Ponadto opracowana procedura testowa musi mieć podstawy statystyczne, być powtarzalna –

zarówno wewnątrz laboratorium jak i między laboratoriami [33].

W badaniach ekotoksykologicznych parametrem mierzonym jest odpowiedź biologiczna, np. aktywność enzymu, hamowanie wzrostu komórek, rozmnażanie, żywotność, śmiertelność i inne. Na podstawie określonej w wyniku przeprowadzonego testu, wyznacza się wartości wskaźników będących ilościową miarą toksyczności badanej substancji. Siłę toksycznego oddziaływania na organizmy żywe określają najczęściej takie wskaźniki jak: IC₅₀ (ang. *Inhibitory Concentration*), EC₅₀/ED₅₀ (ang. *Effective Concentration/Dose*), LD₅₀/LC₅₀ (ang. *Lethal Dose/Concentration*). Zależność dawka-odpowiedź służy również wyznaczeniu dawki i czasu narażenia, przy którym prawdopodobieństwo wystąpienia efektów toksycznych jest odpowiednio niskie. W tym celu określane są wartości tzw. stężeń/dawek progowych (granicznych), takich jak: NOEL/NOEC (ang. *No Observed Effect Level/Concentration*), LOEL/LOEC (ang. *Lowest Observed Effect Level/Concentration*), NOAEL (ang. *No Observed Adverse Effect Level*) i LOAEL (ang. *Lowest Observed Adverse Effect Level*) [34].

W celu zapewnienia wysokiej jakości i wiarygodności uzyskiwanych wyników, badania ekotoksykologiczne prowadzone są według ściśle określonych procedur (OECD lub ISO). Wśród organizmów wskaźnikowych wykorzystywanych w testach toksykologicznych wyróżnić można: bakterie, sinice, glony (zielenice, okrzemki), rośliny naczyniowe (rzęsa wodna, rośliny zakorzenione), bezkręgowce (rozwiłitki, wrotki, dżdżownice) i kręgowce (ryby). Wybór odpowiedniego biotestu do badań toksyczności zależy m.in. od rodzaju wymaganych informacji, właściwości fizykochemicznych badanej substancji i wrażliwości gatunku testowanego organizmu. Wykorzystanie tylko jednego gatunku organizmu żywego jako elementu aktywnego biotestu obarczone jest ryzykiem popełnienia błędu niedoszacowania wyniku toksyczności badanej substancji w odniesieniu do całego ekosystemu. Ryzyko takie zmniejsza się poprzez stosowanie baterii (zespołu) biotestów, których działanie oparte jest na wykorzystaniu organizmów o różnej wrażliwości i reprezentujących różne poziomy troficzne [34]. Pozwala to rozpoznać potencjalny wpływ danego związku chemicznego na cały ekosystem.

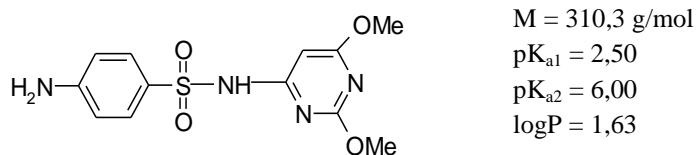
Spośród wielu różnych organizmów, w badaniach toksykologicznych szerokie zastosowanie znajdują ryby i skorupiaki. Jednak ze względów zarówno naukowych jak i praktycznych, zastosowanie tych drugich, nie wiąże się z koniecznością posiadania dużego i dobrze zorganizowanego laboratorium. Skorupiaki, w tym przede wszystkim dafnie, są organizmami powszechnie występującymi na całym świecie, w różnych biocenozach słodkowodnych. Pełnią ważną rolę w łańcuchu troficznym, zajmując miejsce między producentami a drapieżcami. Dobra znajomość ich fizjologii umożliwia prowadzenie hodowli laboratoryjnej, także w ujęciu

długoterminowych testów chronicznych [33].

W ocenie fitotoksyczności wykorzystywane są natomiast glony, rośliny naczyniowe – rzęsa wodna i ukorzenione makrofity wodne i lądowe, bowiem reprezentują one organizmy o szczególnym znaczeniu dla swoich siedlisk naturalnych. Dostarczają tlen, zapewniają obieg substancji organicznych, kontrolują jakość wody oraz równowagę gleby i osadów dennych. Zapewniają także schronienie i siedlisko życia innym organizmom i insektom, bezkręgowcom, itp. Zmiany zachodzące na tym poziomie troficznym mogą bezpośrednio wpływać na strukturę i funkcjonowanie całego ekosystemu. Spośród wymienionych organizmów słodkowodne gatunki glonów należą do najczęściej stosowanych organizmów służących ocenie fitotoksyczności [35]. Często używa się ich jako odpowiedników roślin wyższych. Nieco rzadziej zastosowanie znajdują sinice i okrzemki, co wynika najprawdopodobniej z ich powolnego wzrostu i wymagających warunków hodowli. Gatunki należące do grup roślin naczyniowych są wykorzystywane w najmniejszym stopniu. Stanowią one około 7 – 10 % wszystkich wykonywanych testów, co wynikać może z faktu, iż dotychczas gatunki roślinne uważane były za mniej wrażliwe w stosunku do substancji chemicznych niż organizmy zwierzęce. Takie stanowisko nie zostało jednak poparte jednoznacznymi wynikami badań. Prawdopodobnie ze względu na duże rozmiary, powolny wzrost i brak ustalonych metod przeprowadzenia testów z wykorzystaniem zakorzenionych roślin, organizmy te są sporadycznie stosowane w formie materiału biologicznego [33, 35].

Biorąc powyższe pod uwagę, celem niniejszego ćwiczenia będzie określenie toksyczności wybranego przedstawiciela tej grupy leków (sulfadimetoksyny, **Rysunek 2**) wobec rośliny wyższej powszechnie zasiedlającej środowisko wodne – rzęsy wodnej.

Rzęsa drobna (*Lemna minor*) to gatunek słodkowodny, występujący w wodach stojących lub wolno płynących, zarówno w tropikach jak i umiarkowanych strefach klimatycznych. Z jednej strony należy on do organizmów łatwo przystosowujących się do zmieniających się warunków środowiska, a z drugiej – wrażliwych na zanieczyszczenia substancjami toksycznymi. Cechy rzęsy wodnej, takie jak: małe rozmiary, prosta budowa, wegetatywny sposób rozmnażania i krótki czas pomiędzy poszczególnymi podziałami sprawiają, iż jest on organizmem często wykorzystywanym w badaniach laboratoryjnych i ocenie ryzyka ekotoksykologicznego wybranych substancji chemicznych w środowisku.



Rysunek 2. Budowa chemiczna i wybrane parametry fizykochemiczne sulfadimetoksyny

2. WYKONANIE ĆWICZENIA

Test hamowania wzrostu rzęsy wodnej *Lemna minor* zostanie przeprowadzony zgodnie z procedurą opisaną przez Drost'a i współprac., opierającą się o wytyczne OECD 221 [36-37]. W badaniach zastosowana zostanie sterylna (120 °C, 20 min) pożywka Steinberg'a (OECD 221), służąca zarówno do sporządzania rozcieńczeń badanych substancji chemicznych, jak i pożywka w próbkach kontrolnych. Hodowla rzęsy wodnej prowadzona będzie w wyżej wymienionej pożywce (pH 5,5 ± 0,2) w jednorazowych, polistyrenowych 6-dołkowych mikro płytkach inkubowanych w komorze fitotronowej, zapewniającej stałą temperaturę (25 ± 2 °C) i oświetlenie (6000 lx), a tym samym logarytmiczny wzrost roślin. Dla każdej serii badawczej nastawiona zostanie przynajmniej jedna, niezależna płytka zawierająca tylko pożywkę (próbka kontrolna). Następnie we wszystkich dołkach mikro płytki umieszczona zostanie pojedyncza roślina, składająca się z 3 frondów (listków). Tak przygotowane próbki przeniesione zostaną do komory fitotronowej, w której inkubowane będą przez 7 dni w warunkach takich samych, w jakich prowadzona była hodowla roślin (25 ± 2 °C, 6000 lx). Ocena stopnia hamowania wzrostu rzęsy wodnej przez badane substancje chemiczne dokonana zostanie poprzez wyznaczenie mokrej i suchej masy roślin w dniu nastawienia testu oraz po jego zakończeniu względem próbki kontrolnej. Wszystkie eksperymenty przeprowadzone zostaną w trzech niezależnych powtórzeniach. Wyniki przedstawione zostaną w formie krzywych zależności dawka – efekt, co umożliwi wyznaczenie takich wskaźników jak EC₅₀.

MATERIAŁY I ODCZYNNIKI

- płytka 6-dołkowa – 4 szt.
- kolba miarowa 50 ml – 1 szt.
- mały lejek – 1 szt.
- pipeta 1 ml (do SDM) – 1 szt.
- pipeta 5 ml (do dołków + do pożywki) – 2 szt.
- pipeta 10 ml (pożywka Steinberga) – 1 szt.
- eza
- pożywka Steinberga

na ćwiczeniu nr 1

2.1. Część 1 - Test toksyczności SDM:

1. Z roztworu wyjściowego soli sodowej sulfadimetoksyny (SDM) w wodzie o stężeniu 500 mg/L należy przygotować stężony roztwór (ang. *stock solution*) SDM w pożywce Steinberga, o stężeniu dwukrotnie wyższym (20 μM) niż najwyższe stężenie testowane podczas tego eksperymentu (10 μM). Roztwór ten należy przygotować w kolbie miarowej o objętości 50 ml.

Zadaniem Studenta jest obliczenie jaką objętość roztworu wyjściowego należy pobrać, aby przygotować stężony roztwór do testu (tzw. „*stock solution*”).

2. Następnie należy przygotować 4 płytki 6-dołkowe do prowadzenia niniejszego testu, zakładając, że dwie z nich wykorzystane zostaną do kontroli (należy opisać *kontrola*), a pozostałe dwie do oceny toksyczności SDM wobec rzęsy wodnej (należy opisać *SDM_1*, *SDM_2*).

3. Do każdego dołka płytek kontrolnych (*kontrola*) należy dodać po 10 ml pożywki.

4. Płytki przeznaczone do oceny toksyczności SDM (*SDM_1*, *SDM_2*) należy przygotować w następujący sposób:

- do pierwszego dołka należy dodać 10 ml „*stock solution*”;
- do pozostałych pięciu dołków dodać po 5 ml pożywki;
- następnie metodą seryjnych rozcieńczeń przygotować w każdym dołku rozcieńczenia badanego leku poprzez pobranie z poprzedniego dołka 5 ml roztworu leku i dodaniu ich do następnego dołka (z *1* do *2*); następnie po wymieszaniu zawartości w dołku czynność powtórzyć i przenosić kolejne porcje 5 ml z dołka *2* do *3*, z *3* do *4*, z *5* do *6*, z *6* nadmiarowe 5 ml wylać do zlewki;
- tym samym w każdym dołku powinno znajdować się 5 ml roztworu leku;
- ostatecznie do każdego dołka należy dodać po 5 ml pożywki.

W ten sam sposób przygotować drugą płytkę.

5. Do tak przygotowanych płytek, do każdego z dołków należy dodać po jednej roślinie (rzęsie) zawierającej najlepiej 3 frondy (listki).

6. Tak przygotowane płytki należy sfotografować w celu określenia powierzchni frondów na początku testu (obsługę odpowiedniego stanowiska objaśni prowadzący).

7. Tak przygotowane płytki należy włożyć do komory fitotronowej i inkubować przez 7 dni.

2.2. Część 2 – Wyznaczenie suchej i mokrej masy roślin:

Przed przystąpieniem do oceny toksyczności SDM po 7 dniach inkubacji, należy wyznaczyć suchą i mokrą masę pojedynczych roślin. Pozwoli to na dokładne określenie późniejszego przyrostu roślin i obserwowanego efektu toksycznego.

W tym celu z pozostałych roślin, znajdujących się w kolbie z hodowlą wybrać 6 dowolnych roślin (zawierających po 3 frondy). Obsuszyć na ręczniku papierowym i umieścić na folii aluminiowej (o dokładnie oznaczonej i zapisanej w notatkach masie), zważyć (mokra masa), a następnie umieścić w suszarce (60 °C, do ustalenia stałej masy (około 30 min)) i określić suchą masę. *Za wartość mierzonego parametru dla pojedynczej rośliny (b_0) przyjąć wartość średnią uzyskaną z dokonanego pomiaru.*

na ćwiczeniu nr 2

Zadaniem Studenta jest obliczenie stężenia SDM znajdującego się w każdym dołku płytki.

1. Po 7 dniach inkubacji należy wyznaczyć powierzchnię frondów oraz suchą i mokrą masę roślin z każdego pojedynczego dołka, postępując zgodnie z tym co zostało opisane **w ćwiczeniu nr 1**, tzn.:

- Wszystkie rośliny z danego dołka należy obsuszyć na ręczniku papierowym i umieszczając na folii aluminiowej (o dokładnie oznaczonej i zapisanej w notatkach masie) zważyć (mokra masa), a następnie wysuszyć w suszarce (60 °C, do ustalenia stałej masy (około 30 min)) i określić ich suchą masę. Oznacza to, że zadaniem Studenta jest wyznaczenie suchej i mokrej masy roślin (z dokładnością do 0,01 g) w sumie z 4 x 6 dołków, czyli 24 dołków (każdy dołek osobno).

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

1. Korzystając z poniższego wzoru obliczyć stopień zahamowania wzrostu roślin w każdym dołku oraz na tej podstawie wyznaczyć krzywą zależności dawka – efekt. Obliczenia wykonać na podstawie danych powierzchni frondów, mokrej masy roślin i suchej masy roślin (ocenić, który wynik jest dokładniejszy i dlaczego).

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \cdot 100$$

gdzie: b_c – wartość mierzonego parametru po 7 dniach testu pomniejszona o wartość z dnia 0 dla próby kontrolnej (b_0)
 b_T – wartość mierzonego parametru po 7 dniach testu pomniejszona o wartość z dnia 0 dla badanej próbki (b_0)
 I – stopień inhibicji

2. Z uzyskanych krzywych dawka – efekt należy wyznaczyć wartości następujących współczynników EC_{50} , NOEC, LOEC.
3. Uzyskane dane toksyczności SDM porównać z danymi literaturowymi toksyczności innych znanych związków wobec rzęsy wodnej (np. herbicydów).

4. LITERATURA

1. K. Kümmerer, *The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges*, J. Environ. Manage., 90, 2354-2366, 2009.
2. A. Nikolaou, S. Meric, D. Fatta, *Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments*, Anal. Bioanal. Chem., 387, 1225-1234, 2007.
3. K. Kümmerer, *Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I*, Chemosphere, 75, 417-434, 2009.
4. K. Kümmerer, *Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II*, Chemosphere, 75, 435-441, 2009.
5. J. L. Martinez, *Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants*, Environ. Poll., 157, 2893-2902, 2009.
6. M. Teuber, *Veterinary use and antibiotic resistance*, Curr. Opin. Microbiol., 4, 493-499, 2001.
7. A. Pruden, R. Pei, H. Storteboom, K. H. Carlsson, *Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado*, Environ. Sci. Technol., 40, 7445-7450, 2006.
8. C. Ding, J. He, *Effect of antibiotics in the environment on microbial populations*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, 925-941, 2010.
9. K.-R. Kim, G. Ownes, S.-I. Kwon, K.-H. So, D.-B. Lee, Y. S. Ok, *Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment*, Water Air Soil. Pollut., 214, 163-174, 2011.
10. [red.] M. Petrović, D. Barceló, *Analysis, fate and removal of pharmaceutical in the water cycle*, Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier, Amsterdam 2007.
11. D. Dzierżanowska, *Antybiotykoterapia praktyczna*, Wydawnictwo α -medica press, Warszawa 2009.
12. Z. Roliński, *Farmakologia i farmakoterapia weterynaryjna*, PWRiL, Warszawa 2008.
13. B. F. Kania, *Praktyczna chemioterapia weterynaryjna*, MEDYK, Warszawa, 2005.
14. A. Zejc, M. Gorczyca, *Chemia leków*, PZWL, Warszawa 2004.
15. A. Danysz, *Farmakologia*, PZWL, Warszawa 1977.
16. N. Kemper, *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*, Ecol. Ind., 8, 1-13, 2008.
17. C. D. Watts, B. Crathorne, M. Fielding, S. D. Killops, *Nonvolatile organic compounds in treated waters*, Environ. Health Perspect., 46, 87-89, 1982.
18. M. L. Richardson, J. M. Bwron, *The fate of pharmaceuticals in the aquatic environment*, J. Pharm. Pharmacol., 37, 1-12, 1985.
19. R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K. L. Kratz, *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*, Sci. Total Environ., 225, 109-118, 1999.
20. O. A. Jones, J. N. Lester, N. Voulvoulis, *Pharmaceuticals: a threat to drinking water?* Trends Biotechnol., 23, 163-167, 2005.
21. M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela, S. Herranz, E. Rodriguez, *An overview of sample preparation procedures for LC – MS multiclass antibiotic determination in environmental samples and food samples*, Anal. Bioanal. Chem., 395, 921-946, 2009.
22. C. Hao, R. Clement, P. Yang, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of bioactive pharmaceutical compounds in the aquatic environment – a decade's activities*, Anal. Bioanal. Chem., 387, 1247-1257, 2007.
23. [red.] K. Kümmerer, *Pharmaceuticals in the environment - sources, fate, effects and risks*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2004.
24. [red.] D. Dzierżanowska, *Zakażenia szpitalne*, Wydawnictwo α -medica press, Warszawa 2008.

25. M. J. García-Galán, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and assess risk from sulfonamides*, Trends Anal. Chem., 28, 804-819, 2009.
26. M. J. García-Galán, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics*, Trends Anal. Chem., 27, 1008-1022, 2008.
27. T. Kindlik, *Zarys nauki o lekach*, PZWL, Warszawa 1972.
28. P. Sukul, M. Spittler, *Sulfonamides in the environment as veterinary drugs*, Rev. Environ. Contam. Toxicol., 187, 67-101, 2006.
29. K. Stoob, *Veterinary sulfonamide antibiotics in the environment: fate in grassland soils and transport to surface waters*, praca doktorska, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, 2005.
30. S. Kar, K. Roy, *First report on interspecies quantitative correlation of ecotoxicity of pharmaceuticals*, Chemosphere, 81, 738-747, 2010.
31. Y. J. Lee, S. E. Lee, D. S. Lee, Y. H. Kim, *Risk assessment of human antibiotics in Korean aquatic environment*, Environ. Toxicol. Pharmacol., 26, 216-221, 2008.
32. J. C. Madden, S. J. Enoch, M. Hewitt, M. T. D. Cronin, *Pharmaceuticals in the environment: Good practice in predicting acute ecotoxicological effects*, Toxcol. Lett., 185, 85-101, 2009.
33. G. Nałęcz-Jawecki, *Badanie toksyczności środowiska wodnego metodą bioindykacji*, Biul. Wydz. Farm., AMW, 2, 11-17, 2003.
34. [red.] J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiska*, CEEAM, Gdańsk 2003.
35. M. Bielińska, G. Nałęcz-Jawecki, *Zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego lekami I: Ocena toksyczności trzech fluorochinolonów dla rzęsy drobnej Lemna minor*, Biul. Wydz. Farm. WUM, 4, 24-30, 2009.
36. W. Drost, M. Matzke, T. Backhaus, *Heavy metal toxicity to Lemna minor: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure*, Chemosphere, 67, 36-43, 2007.
37. OECD 221, *Lemna sp. Growth inhibition test. Guideline for the testing of chemicals*, Organization for Economic Cooperation and Development, Paryż 2006.