



UNIWERSYTET OPOLSKI

Instytut Chemii

PRACA DOKTORSKA

Jerzy Pogrzeba

**Zastosowanie cyjanobakterii jako biosorbentów do usuwania
ksenofarmaceutyków**

**Application of cyanobacteria as biosorbents for the removal of
xenopharmaceuticals**

Praca napisana pod kierunkiem
dr hab. Anny Poliwoda, prof. UO

Opole 2024

Podziękowania

*Chciałbym serdecznie podziękować **Pani Profesor Annie Poliwodzie** za podjęcie się roli promotora niniejszego doktoratu, przekazanie olbrzymiej ilości wiedzy oraz okazanie cierpliwości, za wiele godzin spędzonych na naukowych dyskusjach oraz wskazywanie drogi jaką należało obrać w badaniach, za konstruktywną krytykę, wykazywanie błędów oraz jak je sprostować i ustrzec się ich na przyszłość.*

*Pragnę podziękować również **Profesorowi Jackowi Lipokowi** oraz całemu zespołowi Katedry Farmacji i Chemii Ekologicznej za możliwość pracy w „Mrowisku”, serdeczne przyjęcie oraz okazane wsparcie w prowadzonych pracach badawczych, za wiele miło spędzonych chwil oraz bardziej lub mniej naukowych dyskusjach.*

*Dziękuję również **Pani Profesor Wioletcie Ochędzan – Siodlak** oraz **Panu doktorowi Pawłowi Grochowi** za nauczanie obsługi oraz możliwość wykonywania badań za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego.*

*Dziękuję również serdecznie mojej przyjaciółce **Emilii**, na której radę i pomoc merytoryczną mogłem zawsze liczyć, za poświęcony czas, wartościowe uwagi, spojrzenie na tę pracę krytycznym okiem oraz okazane wsparcie i zrozumienie w najtrudniejszych chwilach.*

*Jestem również bardzo wdzięczny za okazane wsparcie, pomoc oraz za dzielenie ze mną radości oraz smutków, przyjaciołom **Matysowi i Natalii**, na których radę i wysłuchanie zawsze mogłem liczyć.*

*Z całego serca dziękuję również **mojej rodzinie, w szczególności rodzicom**, za okazane zrozumienie dla obranej drogi życia oraz nieustanne wspieranie mnie w podążaniu nią. Za okazane wsparcie i miłość, która pozwoliła pokonać wszystkie kryzysy jakie pojawiły się przez cztery lata pracy i podczas pisania doktoratu oraz która pozwoliła mi w pełni cieszyć się z ukończonej pracy.*

Niniejszą pracę dedykuję

mojej rodzinie.

Spis treści:

1. Przegląd literatury.....	9
1.1. Ksenofarmaceutyki.....	9
1.2. Szkodliwość leków przeciwbólowych dla ludzi i innych organizmów.....	14
1.3. Biosorbenty i ich podział.....	15
1.4. Mechanizmy biosorpcji.....	17
1.5. Zastosowanie biosorbentów.....	20
1.6. Cyjanobakterie – mikroorganizmy o wysokim potencjale biosorpcyjnym – charakterystyka i właściwości.....	25
2. Cel pracy.....	31
3. Metodologia pracy badawczej.....	33
3.1. Używana aparatura i odczynniki.....	33
3.1.1. Aparatura.....	33
3.1.2. Odczynniki.....	33
3.2. Oznaczanie wybranych ksenofarmaceutyków w badanych próbkach z użyciem chromatografii cieczowej z detektorem UV-VIS i spektrometrem mas.....	34
3.3. Procedura pracy z testowanymi mikroorganizmami.....	35
3.3.1. Badane gatunki i hodowla cyjanobakterii.....	35
3.3.2. Hodowle zachowawcze i przygotowanie inokulum.....	36
3.3.3. Przygotowanie i prowadzenie hodowli eksperymentalnych.....	36
3.3.4. Kontrola wzrostu i metabolizmu sinic.....	37
3.4. Przygotowanie próbek do analizy.....	39
3.4.1. Wydzielenie pozostałości ksenofarmaceutyków z płynów pohodowlanych.....	39
3.4.2. Izolacja badanych leków z powierzchni komórek, po procesie biosorpcji.....	39
3.4.3. Izolacja testowanych leków z wnętrza komórek.....	40
3.5. Przygotowanie próbek i wykonanie analiz za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM).....	40
3.6. Badanie toksyczności wybranych układów płynów pohodowlanych wobec modelowych organizmów bezkręgowych i roślinnych.....	40
3.6.1. Hodowle bezkręgowca.....	41
3.6.2. Hodowle mikroalg.....	41
4. Prezentacja i dyskusja wyników.....	43
4.1. Optymalizacja metody analitycznej oznaczania badanych farmaceutyków.....	43
4.2. Odpowiedź cyjanobakterii oraz ich zdolność do biosorpcji w obecność ksenofarmaceutyków.....	46
4.2.1. Wpływ testowanych substancji na wzrost wybranych gatunków cyjanobakterii.....	47
4.2.2. Zmiany metaboliczne w komórkach badanych organizmów wywołane działaniem pojedynczej substancji.....	48
4.2.3. Skuteczność biosorpcji poszczególnych ksenofarmaceutyków.....	50
4.2.3.1. Usuwanie leków z medium hodowlanego.....	50
4.2.3.2. Adsorpcja leków na powierzchni komórek testowanych cyjanobakterii.....	52

4.3. Ocena efektywności usuwania farmaceutyków przez cyjanobakterie w różnych warunkach (mieszaniny leków, konsorcja cyjanobakterii, pożywka pozbawiona w związku węgla).....	53
4.3.1. Rozwój pojedynczych gatunków i ich konsorcjów w obecności mieszanin testowanych leków.....	54
4.3.2. Metaboliczne zmiany w komórkach pojedynczych gatunków i konsorcjów sinic w odpowiedzi na mieszaniny testowanych leków.....	55
4.3.3. Efektywność biosorpcji ksenofarmaceutyków z mieszaniny przez poszczególne gatunki sinic oraz ich konsorcja.	56
4.3.3.1. Usuwanie farmaceutyków z hodowli zawierających mieszaniny leków	56
4.3.3.2. Adsorpcja poszczególnych leków na powierzchni komórek.....	57
4.3.3.3. Dyfuzja i transport aktywny badanych leków do wnętrza komórek....	58
4.3.4. Analizy powierzchni komórek testowanych cyjanobakterii w układach dwugatunkowych z wykorzystaniem techniki SEM.....	59
4.3.5. Dynamika usuwania testowanych związków z ich mieszaniny.....	61
4.3.6. Hodowla cyjanobakterii w pożywkach pozbawionych węgla jako źródła pożywienia.....	64
4.3.6.1. Rozwój testowanych gatunków sinic w obecności badanych związków w pożywce pozbawionej węgla.....	64
4.3.6.2. Biosorpcja testowanych związków w pożywce pozbawionej węgla....	66
4.3.7. Usuwanie badanych ksenofarmaceutyków przez gatunek <i>Arthrospira platensis</i> .68	
4.3.7.1. Wpływ testowanych ksenofarmaceutyków na rozwój i metabolizm <i>A. platensis</i>	69
4.3.7.2. Efektywność biosorpcji testowanych ksenofarmaceutyków z medium hodowlanego przez <i>A. platensis</i>	71
4.3.8. Podsumowanie zdolności biosorpcji testowanych leków przez cyjanobakterie...73	
4.4. Badanie toksyczności płynów pochodzących.....	76
4.4.1. Rozwielitka – <i>Daphnia magna</i>	76
4.4.2. Mikroalgi – <i>Chlorella vulgaris</i> i <i>Haematococcus pluvialis</i>	79
4.5. Identyfikacja metabolitów badanych ksenofarmaceutyków biosyntezy przez cyjanobakterie.....	81
5. Podsumowanie	87
6. Wnioski	90
7. Summary	91
8. Literatura.....	93
9. Dorobek naukowy	104
10. Spis rysunków i tabel.....	106
11. Supplement.....	108

Wykaz skrótów

- ♦ -C – pożywka zburzała o związki zawierające węgiel
- ♦ APC – allofikocyjanina
- ♦ ATP – adenozylo-5'-trifosforan
- ♦ CCALA - Kolekcja Kultur Organizmów Autotroficznych Instytutu Botaniki Czeskiej Akademii Nauk w Trzeboniu
- ♦ COX – cyklooksygenaza
- ♦ DCF – diklofenak; (kwas *o*-N-(2,6-dichlorofenylo)aminofenylooctowy)
- ♦ EPS – zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe
- ♦ GR – współczynnik wzrostu (ang. *growth rate*)
- ♦ LC – MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
- ♦ IBF – ibuprofen; (kwas (RS)-2-[4-(2-metylopropylo)fenylo]propanowy)
- ♦ NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
- ♦ NAPQI – N-Acetylo-p-benzochinonoimina
- ♦ NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne
- ♦ PAR – paracetamol; (N-(4-hydroksyfenylo)acetamid)
- ♦ PBP – fikobiliproteiny
- ♦ PC – fikocyjanina
- ♦ PE – fikoerytryna
- ♦ PGE – prostaglandyna
- ♦ PSII – fotosystem II
- ♦ Q-TOF – analizatorem czasu przelotu połączony z kwadrupolem
- ♦ ROS – reaktywne formy tlenu
- ♦ SEM – skaningowy mikroskop elektronowy
- ♦ SPE – ekstrakcja do fazy stałej
- ♦ WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

1. Przegląd literatury

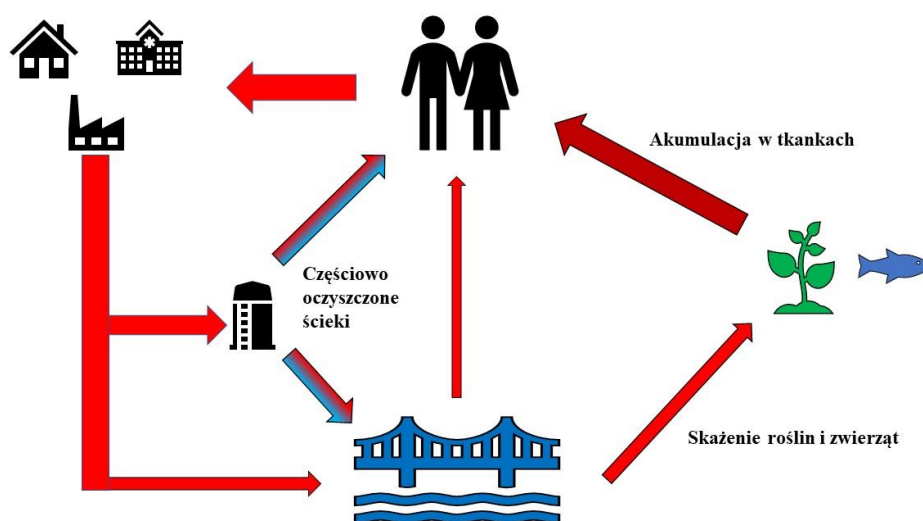
1.1. Ksenofarmaceutyki

Postępująca industrializacja i urbanizacja, pomimo wynikających z niej korzyści dla człowieka, wiąże się z coraz większym zagrożeniem dla środowiska naturalnego. Jest to efektem rosnącej emisji różnorodnych ksenobiotyków do środowiska, spośród których największą grupę stanowią zanieczyszczenia chemiczne, zarówno nieorganiczne, jak i organiczne [Naidu, 2021; Suzuki, 2020, Rathi, 2021]. I o ile sposób eliminowania ze ścieków substancji nieorganicznych oraz jonów metali jest dobrze poznany, co przekłada się na coraz częstsze wdrażanie tych metod w procesach oczyszczania, to niestety w przypadku zanieczyszczeń organicznych nie wszystkie procesy przebiegają prawidłowo. Dlatego, aby przeciwdziałać tego typu skażeniu, wiele państw wprowadza obligatoryjne przepisy prawne ograniczające użycie substancji niebezpiecznych oraz zakazujące ich bezpośredniego zrzucania do kanalizacji lub środowiska, bez wcześniejszego przetworzenia [Bunke, 2019; Lazarus, 2023]. Problemem jest jednak to, iż duża część ksenobiotyków organicznych ma tendencję do akumulacji w tkankach, co powoduje ich długotrwałe pozostawanie w środowisku. Wynika to bezpośrednio z zależności troficznych. W rezultacie zanieczyszczenia są przenoszone wraz ze zwierzętami z terenów, które nie są objęte restrykcyjnymi przepisami dotyczącymi zanieczyszczeń. Poza tym, większość tych skażeń chemicznych prowadzi do licznych schorzeń zarówno wśród roślin, zwierząt, jak i ludzi [Dhairrykar, 2022; Felis, 2020; Świacka, 2021]. Powodują one stres oksydacyjny, zwiększają ryzyko zachorowania na nowotwory, uszkodzają genom oraz wpływają negatywnie na wiele układów, w tym hormonalny, sercowo-naczyniowy oraz reprodukcyjny. Przy czym największe zagrożenie stanowią związki, które charakteryzują się wysoką trwałością chemiczną i wykazują aktywność biologiczną już w niewielkich ilościach, a jednocześnie są szeroko stosowane. Dlatego też takie dziedziny życia, jak produkcja pigmentów, papiernictwo, przemysł tekstylny oraz farmacja i medycyna są częstymi źródłami najbardziej niebezpiecznych ksenobiotyków środowiskowych [Imtiazuddin, 2012]. Niektóre zanieczyszczenia chemiczne, szczególnie te hydrofobowe, zidentyfikowano w organizmach zamieszkujących obszary okołobiegunowe. Ksenobiotyki organiczne wykryto także w płodach zwierzęcych i ludzkich [Kotta-Loizou, 2024; Meakin, 2022].

Aktywne substancje farmaceutyczne stanowią obecnie coraz poważniejsze zagrożenie dla środowiska, zarówno wodnego jak i lądowego. Jest to bardzo szeroka grupa związków chemicznych, do której należą między innymi: leki hormonalne, przeciwbólowe i przeciwzapalne oraz antybiotyki. Wiele z tych substancji przedostaje się bezpośrednio do wód zarówno powierzchniowych jak i gruntowych, gdzie stanowią istotne zagrożenie dla bytujących tam organizmów żywych. Głównym źródłem zanieczyszczeń lekami w środowisku jest niewłaściwe zarządzanie nimi, zarówno przez indywidualnych użytkowników, jak i osoby przepisujące leki.

Nadmierne spożycie leków często prowadzi do wydalania ich nadmiaru z moczem, co przyczynia się do zanieczyszczenia ekosystemu [Ashfaq, 2017; Aus der Beek, 2016; Barcellos, 2022; Sellier, 2022]. Szczególnym przypadkiem są leki dostępne bez recepty, które można kupić praktycznie wszędzie. Przyczyną zwiększających się stężeń leków w wodach naturalnych jest również niewłaściwe gospodarowanie ich pozostałościami, czyli wrzucanie ich do odpadów ogólnych lub do instalacji sanitarnych, zamiast przekazywanie do profesjonalnej utylizacji. Kolejnymi źródłami zanieczyszczeń są zakłady produkcyjne, zlokalizowane w krajach o mniej restrykcyjnych przepisach dotyczących gospodarki odpadami. Niewłaściwa utylizacja produktów o złych parametrach, oczyszczanie urządzeń i inne działania prowadzone w tych zakładach mogą skutkować przedostawaniem się dużych ilości ksenofarmaceutyków do środowiska [Kolecka, 2022]. Inne źródła to apteki, placówki medyczne, punkty sprzedaży oraz źle zabezpieczony transport. W szczególności wskazać tu można złe praktyki w zakresie przechowywania i utylizacji wyrobów medycznych przez placówki zajmujące się ich dystrybuowaniem i stosowaniem. Dodatkowym źródłem pozostałości ksenofarmaceutyków w środowisku naturalnym, są również praktyki weterynaryjne i produkcja zwierząt hodowlanych [Alsayadi, 2023; Parra-Saldivar, 2021; Vatovec, 2017; Vaudin, 2022; Zandaryaa, 2021].

Zanieczyszczenie lekami stanowi poważne konsekwencje dla wszystkich ekosystemów. Substancje te po przedostaniu się do środowiska często dalej aktywnie oddziałują na znajdujące się tam organizmy zarówno wodne jak i lądowe [Liu, 2013; Vaudin, 2022]. Na poniższym rysunku zilustrowano prosty cykl obiegu związków farmaceutycznie aktywnych, który ma miejsce w środowisku po przedostaniu się do niego ksenofarmaceutyków (Rys. 1).

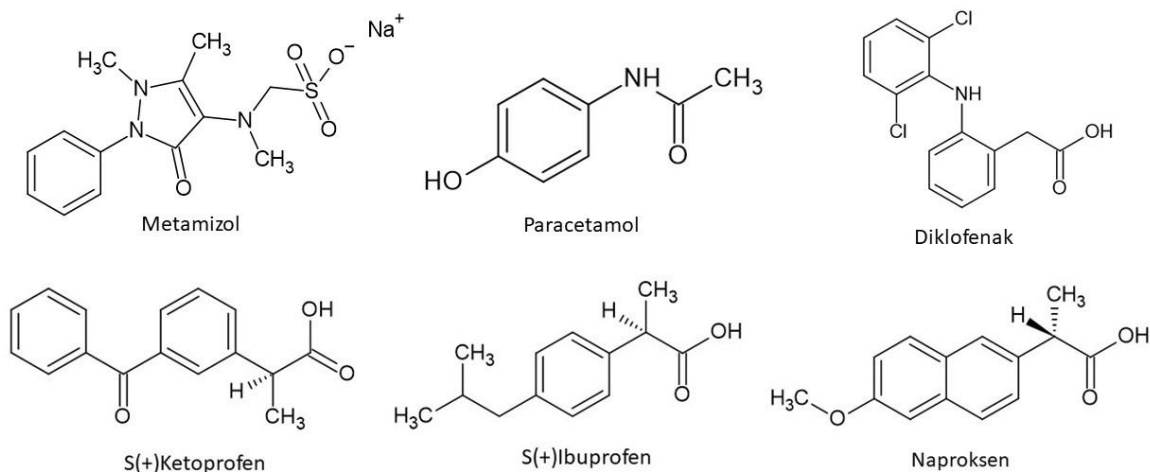


Rysunek 1. Schemat obiegu leków ksenofarmaceutyków w środowisku.

Spośród wielu grup ksenofarmaceutyków, leki przeciwbólowe i przeciwzapalne, a szczególnie te dostępne bez recepty stanowią poważne zagrożenie dla organizmów wodnych i lądowych oraz

wyzwanie dla współczesnej nauki, aby opracować skuteczne metody ich usuwania i utylizacji. Wśród tych leków można rozróżnić dwie podgrupy. Pierwszą z nich są leki przeciwbólowe, nie wykazujące działania przeciwzapalnego ani narkotycznego, czyli nieopiodowe leki przeciwbólowe, a drugą niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) (Rys. 2) [Gallardo-Altamirano, 2019; KołECKA, 2022]. Do najpowszechniej stosowanych i dostępnych bez recepty leków pierwszej podgrupy należą paracetamol (PAR) i metamizol (Rys. 2) [Igwegbe, 2021; Jasiecka, 2014; Vo, 2019]. Paracetamol to organiczny związek chemiczny z grupy pochodnych p-aminofenolu i jako jeden z nielicznych leków przeciwbólowych jest dobrze rozpuszczalny w wodzie. Wykazuje silne działania przeciwbólowe i przeciwgorączkowe. Nie powoduje również rozrzedzania krwi. Lek ten jest przyjmowany głównie doustnie (tabletki, syrop), *per rectum* (czopki) oraz w iniekcji dożylniej. W organizmie człowieka transportowany jest z krwią do docelowych miejsc działania oraz do wątroby, gdzie jest metabolizowany. W przeważającej ilości lek ten jest wydalany z moczem w postaci niezmienionej jako glukuronid paracetamolu i siarczan paracetamolu. Około 8-10 % tego związku jest przekształcane przez enzymy z grupy cytochromów P450: CYP2E1 (E.C. 1.14.14.1), CYP1A2 (E.C. 1.14.14.73), CYP3A4 (1.13.14.97), do silnie toksycznego związku - N-Acetylo-p-benzochinoniminy (NAPQI). Przy stosowaniu dawek terapeutycznych paracetamolu, metabolit ten jest skutecznie wydalany z organizmu, jednak przy większych dawkach, NAPQI powstaje jako główny metabolit, co prowadzi do jego akumulacji w organizmie i sprzyja działaniu toksycznemu [Athersuch, 2018; Manyike, 2000; Thijssen, 2004]. Dowiedziono również, że paracetamol przenika przez łożysko i oddziałuje na płód, prowadząc do zaburzeń w rozwoju [Allegaert, 2015]. Poza tym, podobnie jak NLPZ, dobrze przenika barierę krew – mózg i gromadzi się w przysadce oraz podwzgórzu, gdzie działa jako inhibitor oksygenazy typu 3 (COX-3; E.C. 1.14.99.1), która odpowiada za syntezę prostaglandyn odpowiedzialnych za mediowanie stanu gorączkowego, a nie stanów zapalnych, jak na przykład prostaglandyna E2 (PGE2). Pomimo tego inhibicja COX-3 prowadzi do słabego zaniku stanów zapalnych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Stąd też paracetamol nie jest zaliczany do niesteroidowych leków przeciwzapalnych, choć jego metabolizm przebiega w podobny sposób oraz wykazuje zbliżony efekt działania [Przybyła, 2021].

Innym związkiem przeciwbólowym, który nie wykazuje działania przeciwzapalnego jest metamizol. Pomimo, iż jest to lek o ponad 100-letniej historii, jego mechanizm działania nie jest w pełni poznany. Obecnie wiadomo, że ma on podobny sposób działania i metabolizowania w organizmie jak paracetamol, nie jest jednak tak popularnym lekiem. Główną przyczyną jest to, iż wśród naukowców trwa spór o toksyczne działanie metamizolu, w szczególności o jego potencjalne powodowanie agranulocytozy i mielotoksyczności. Dlatego w wielu krajach rozwiniętych stosowanie tego leku u ludzi zostało bardzo ograniczone. Jednakże w praktyce weterynaryjnej oraz w krajach rozwijających się metamizol jest nadal szeroko stosowany [Hoffmann, 2020; Jasiecka, 2014; Lutz, 2019].



Rysunek 2. Struktury chemiczne wybranych związków o działaniu przeciwbólowym i/lub przeciwzapalnym.

Do drugiej grupy zaliczamy takie związki jak: diklofenak (DCF), ibuprofen (IBF), naproksen i ketoprofen (Rys.2). Substancje te są obecne w wielu popularnych produktach farmaceutycznych, które są dostępne nie tylko w placówkach sprzedaży specjalistycznej takich jak apteki, ale również w popularnych sklepach sieci handlowych, kioskach i stacjach paliw, co sprawia, że nie podlegają one kontroli pod względem reglamentacji i stosowania [Brennan, 2021; Mlunguza, 2019]. Choć wykazują podobne działanie, pod względem budowy chemicznej charakteryzują się bardzo dużymi różnicami. Ibuprofen to związek chemiczny z grupy kwasów arylopropionowych, natomiast diklofenak to kwas arylooctowy, ale w obu przypadkach obecność grupy -COOH jest kluczowa dla ich działania przeciwzapalnego i przeciwbólowego. Poza tym, ibuprofen występuje w dwóch formach enancjomerycznych (R(-)-ibuprofenu i S(+)-ibuprofenu), z których tylko enancjomer S jest formą farmaceutycznie aktywną. Enancjomer R jest przekształcany w organizmie człowieka do formy aktywnej za sprawą racemazy α -metyloacylo-CoA (E.C. 5.1.99.4). Ze względu na to, że przekształcenie R(-)-ibuprofenu do S(+)-ibuprofenu zachodzi w organizmie, ibuprofen jest sprzedawany jako racemat, czyli mieszanina obu enancjomerów, co jest również tańsze i łatwiejsze w produkcji niż izolacja tylko aktywnego enancjomeru [Evans, 2001; Montes, 2016; Rainsford, 2012; Rainsford, 2013]. Natomiast diklofenak zawiera w swojej strukturze dwa pierścienie benzenowe, połączone grupą aminową oraz dwa atomy chloru przyłączone do pierścienia. To podstawienie atomami chloru zwiększa hydrofobowy charakter diklofenaku, co wpływa na jego właściwości farmakokinetyczne [Alfaro, 2020; Sandri, 2014].

Farmaceutyki z tej grupy, w zależności od rodzaju związku aktywnego są przyjmowane w różnych formach. Ibuprofen i naproksen są najczęściej podawane doustnie, a w pozostałych przypadkach dożylnie lub przez inhalację. Diklofenak i ketoprofen są natomiast najczęściej stosowane w maściach, ale również podaje się je doustnie lub dożylnie. Niezależnie od sposobu podania wszystkie związki zaliczane do niesteroidowych leków przeciwzapalnych, wykazują podobne działanie, metabolizm oraz wydalanie przez organizm człowieka [Fokunang, 2018; Mitchell, 1993]. Różnice

między poszczególnymi substancjami polegają na preferowanych drogach wchłaniania, interakcjach z innymi lekami oraz intensywności działania. Przykładowo naproksen jest związkiem o znacznie silniejszym działaniu niż ibuprofen, przez co stosowany jest w leczeniu takich schorzeń jak reumatoidalne zapalenie stawów, kamica nerkowa oraz dna moczanowa [Brutkus, 2018]. Natomiast ibuprofen często podawany jest razem z paracetamolem, ponieważ związki te dobrze uzupełniają się w ogólnym działaniu, niwelując szereg objawów niespecyficznych [Abushanab, 2021]. Działanie wszystkich niesteroidowych leków przeciwzapalnych polega na przerwaniu enzymatycznego szlaku syntezy chemicznych mediatorów stanu zapalnego. NLPZ w sposób odwracalny i nieselektywny prowadzą do inhibicji cyklooksygenazy 1 (COX-1; E.C 1.14.99.1) oraz 2 (COX-2; E.C 1.14.99.2) co powoduje zaprzestanie przekształcania kwasu arachidonowego do prostaglandyn - komórkowych informatorów stanu zapalnego. Prostaglandyny odpowiadają również za powstawanie stanów gorączkowych (prostaglandyna E₂ produkowana w podwzgórzcu) oraz zwiększenie wrażliwości neuroreceptorów na działanie neuroprzekazników. Niektóre NLPZ powodują również zmniejszenie krzepliwości krwi, poprzez przeciwdziałanie agregacji trombocytów. Ze względu na przedstawiony mechanizm działania substancje te niwelują lub usuwają wiele objawów niespecyficznych, takich jak bóle, stany zapalne czy gorączka, przez co są używane w leczeniu wielu schorzeń [Abushanab, 2021; Montes, 2016; Mitchell, 1993]. Niesteroidowe leki przeciwzapalne po wniknięciu do organizmu, w 90% łączą się z białkami osocza, a następnie wraz z krwią są transportowane po całym organizmie, gdzie powodują nieselektywną inhibicję cyklooksygenaz. Pozostałe 10% działają celowo, na przykład poprzez wchłanianie przez skórę. Większość z tych związków ma charakter hydrofobowy. Aby ułatwić ich wydalanie są one metabolizowane, głównie w wątrobie, do form bardziej hydrofilowych. Ich metabolizm można podzielić na dwie fazy. W pierwszej fazie związki te podlegają przemianom przez enzymy z grupy cytochromów P450, natomiast w drugiej fazie część metabolitów ulega dalszym przemianom przez 5'-difosfoglukuronozylotransferazy urydyny (UGT). W rzeczywistości, niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) i ich metabolity są wydalone przede wszystkim z moczem, ale niektóre mogą być także usuwane przez inne drogi, takie jak układ pokarmowy, ślina czy drogi oddechowe [Bindu, 2020; Marchlewicz, 2015; Ríos, 2022].

Brak odpowiedniej świadomości i edukacji w zakresie stosowania leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych, skutkuje tym, iż wiele osób nadużywa tych substancji, wychodząc z błędnego założenia, że zwiększenie dawki spowoduje szybsze lub intensywniejsze działanie tych leków w sposób liniowy. W dzisiejszych czasach wiele osób uzależnia się również od stosowania NLPZ, zażywając te substancje nie tylko w celu uśmierzania silnych stanów zapalnych i bólowych. Ludzie zażywają te leki również przy łagodnych natężeniach tych stanów, aby poprawić komfort funkcjonowania. Jest to zatem działanie nie tyle terapeutyczne, co wynikające jedynie z chęci poprawy wygody codziennego życia. Substancje z tej grup są coraz częściej wykorzystywane jako łatwo dostępne używki, często zastępujące alkohol lub papierosy, w celu zmniejszenia stanów stresowych, przemęczenia lub osiągnięcia lekkiego stanu narkotycznego. Może to prowadzić

do stopniowego uzależnienia od tych substancji. Problem ten dotyczy szczególnie ludzi narażonych na silny stres lub długotrwały ból. Stąd spożycie tych leków w nadmiarze notuje się głównie w miejskich aglomeracjach krajów rozwiniętych, wśród pracowników korporacji i sportowców [Brennan, 2021; Cooper, 2013; Montuori, 2024]. Można zatem stwierdzić, że niezależnie od miejsca na świecie, konsumpcja NLPZ stale wzrasta i jest już na bardzo wysokim poziomie.

1.2. Szkodliwość leków przeciwbólowych dla ludzi i innych organizmów

Szczególnie narażone na niepożądane działania leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych są organizmy wodne, ze względu na to, iż znaczna część związków z tej grupy przedostaje się do środowiska poprzez ścieki, powodując zanieczyszczenie różnych typów wód oraz gleb. Główne skutki oddziaływania na organizmy wodne, obecnych w środowisku farmaceutyków i ich pozostałości, obejmują zaburzenia pracy enzymów oraz wywoływanie stresu oksydacyjnego. Wyższe stężenia ksenofarmaceutyków w środowisku powodują również, szczególnie u ryb, destabilizację funkcjonowania układów hormonalnych, cytotoksyczność oraz zaburzenia behawioralne. Prowadzi to do ograniczenia rozrodczości i deformacji organów. W skrajnych przypadkach dochodzi do mutacji i uszkodzeń materiału genetycznego co skutkuje występowaniem wad w przyszłych pokoleniach organizmów, nawet po ustaniu skażenia [Aus der Beek, 2016; da Silveira Barcellos, 2022; Gworek, 2021; Izadi, 2020; Rastogi, 2021].

Ksenofarmaceutyki są często bardzo trudne do usunięcia w procesach oczyszczania ścieków oraz uzdatnianiu wody. Skutkuje to nieświadomym narażeniem człowieka na ich działanie zarówno w przestrzeniach wspólnych takich jak otwarte zbiorniki wodne, jak i w gospodarstwach domowych. Długotrwałe narażenie na niskie stężenia farmaceutyków może prowadzić do destabilizacji homeostazy organizmu człowieka bez zauważalnych makro zmian, czyli widocznych negatywnych objawów narażenia. Małe dawki tych substancji spożywane razem z wodą pitną, mogą działać w sposób podobny do dawek terapeutycznych, co w konsekwencji przy długotrwałym narażeniu, może zaburzać syntezę prostaglandyn [Brennan, 2021]. W rezultacie taka sytuacja prowadzi do stopniowego przyzwyczajania organizmu do leczniczych stężeń tych ksenofarmaceutyków. W efekcie zalecane dawki terapeutyczne mogą nie wywoływać wystarczająco silnego efektu w momencie choroby. Skutkiem tego jest zwiększona konsumpcja leków i ich przedostawanie się do środowiska. Narażenie ludzi na działania niepożądane przeciwbólowych ksenofarmaceutyków może mieć miejsce nie tylko poprzez picie wody przeznaczonej do spożycia. Dowiedziono, że leki mogą kumulować się zarówno w organizmach zwierzęcych jak i roślinnych. W konsekwencji dochodzi do nieświadomego przyjmowania tych substancji wraz z pożywieniem [Richmond, 2018; Xie, 2017].

1.3. Biosorbenty i ich podział

Z uwagi na udowodnione szkodliwe działanie ksenofarmaceutyków w środowisku oraz brak efektywnego sposobu usuwania leków na etapie oczyszczenia ścieków, związki z tej grupy stają się coraz większym zagrożeniem dla równowagi ekosystemów. Naukowcy podejmują działania w celu opracowania efektywnych metod usuwania leków zarówno na etapie oczyszczenia ścieków, jaki i bezpośrednio w środowisku naturalnym. Ponadto poszerzana jest wiedza na temat wpływu tych substancji na składniki biosfery [Bazargan, 2021; de Fátima, 2018; Pérez-Cejuela, 2020]. Problem zanieczyszczenia lekami przeciwbólowymi i przeciwzapalnymi próbuje się częściowo rozwiązać poprzez stosowanie odpowiednich sorbentów. Badania pokazują, iż może to być efektywna metoda oczyszczania ścieków z substancji aktywnych. Jednak stosowanie syntetycznych materiałów rodzi kolejne problemy. Pierwszym z nich jest fakt, że wprowadzenie takich materiałów do środowiska dodaje kolejne zanieczyszczenie, które w przyszłości może stać się problemem. Sorbenty syntetyczne to zazwyczaj materiały polimerowe, a coraz częściej w literaturze wskazuje się na zanieczyszczenie środowiska mikroplastikiem. Dodatkowo wytworzenie takiego sorbentu wymaga określonych procesów technologicznych i reakcji chemicznych, w których używa się głównie substancji polimerowych i organicznych. W połączeniu z nakładem energetycznym niezbędnym do wytworzenia tego typu sorbentów oraz używanymi reagentami, zastosowanie sztucznych sorbentów może powodować sumarycznie większe szkody w środowisku niż adsorbowane przez nie zanieczyszczenie [Shuguang, 2015]. Kolejną kwestią jest późniejsza utylizacja lub regeneracja takiego materiału sorpcyjnego, aby nie dochodziło do akumulacji sorbowanych substancji. Aby pozbyć się niebezpiecznych substancji, które zostały zaadsorbowane, sorbent musi zostać poddany oczyszczaniu lub destrukcji w wysokich temperaturach. W przeciwnym razie może dojść do akumulacji ksenofarmaceutyków [Hafizi, 2019; Strzemieniecka, 2012; Zhang, 2023].

Alternatywą dla sorbentów syntetycznych są sorbenty naturalne, tak zwane biosorbenty. Jest to szeroka grupa materiałów oraz mikroorganizmów, które w naturalny sposób wykazują zdolność do sorpcji różnego rodzaju substancji chemicznych, w tym zanieczyszczeń. W wielu przypadkach zdolność ta jest bezpośrednio związana z mechanizmami, które ułatwiają organizmom przystosowanie się do niekorzystnych warunków środowiskowych, ale może być również powiązana z procesami metabolicznymi, takimi jak pobieranie substancji niezbędnych do życia [Deng, 2015; Kenzhaliyev, 2020, Vijayaraghavan, 2008]. Właściwości materiałów biologicznych, które umożliwiają przeprowadzanie procesów biosorpcji, są wykorzystywane nie tylko do usuwania zanieczyszczeń. Badane są również możliwości ich zastosowania w innych dziedzinach życia człowieka, w których obecnie stosowane są sorbenty syntetyczne. Przykładem takiego działania mogą być wyniki badań, w których sztuczne wypełnianie kolumnienek w technice ekstrakcji do fazy stałej (SPE) zastąpiono włóknami celulozowymi [Erlandsson, 1990; Godage, 2020]. Biosorbenty stanowią bardzo szeroką

grupę materiałów zdolnych do adsorpcji substancji chemicznych, jednak w ich podstawowym podziale wyróżniane są dwie grupy: biosorbenty pasywne i biosorbenty aktywne [Park, 2010].

Biosorbenty pasywne

Biosorbenty pasywne to zazwyczaj materiały pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego. Należą do nich również zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe (EPS), które organizmy lub mikroorganizmy produkują w celu ochrony przed negatywnymi czynnikami środowiskowymi. Ich cechą charakterystyczną jest to, że biosorpcja nie jest związana z procesem metabolicznym. Zachodzi jedynie poprzez oddziaływanie tych materiałów z substancjami. Oddziaływania te mogą mieć charakter fizyczny, determinowany przez ilość i wielkość porów na powierzchni materiału, lub wynikać z budowy biochemicznej, czyli reakcji z występującymi na powierzchni komórek związkami lub ich grupami funkcyjnymi [Ayele, Suresh, 2021; Ayele, Getachew, 2021; Liu, 2002; Park, 2010; Silva, 2019]. Zaletą tej grupy sorbentów jest to, iż wiele odpadów przemysłowych, takich jak odpady rolnicze (łuski po kukurydzy, słoma i trociny), które zwykle traktowane są jako odpad, może zostać wykorzystane do biosorpcji wielu zanieczyszczeń. Może być to dodatkowy etap wykorzystania odpadów, zamiast przeznaczać je wyłącznie na cele energetyczne. Biomasa przed spalaniem w wysokich temperaturach mogłaby być również użyta jako materiały do usuwania zanieczyszczeń [Basile, 2009; Moyo, 2014; Qin, 2020; Park, 2010; Wu, 2014]. W przypadku procesów technologicznych warto również podkreślić możliwość zastosowania modyfikowanych materiałów naturalnych lub organizmów w celu tworzenia struktur do selektywnej filtracji i separacji poszczególnych substancji. Biosorbenty pasywne można modyfikować poprzez zastosowanie kwasów, wodorotlenków lub innych substancji oraz procesów fizykochemicznych. Popularnym sposobem modyfikacji naturalnych materiałów sorpcyjnych jest piroliza, w wyniku której otrzymuje się biowęgiel. Proces ten jest jedną z najpowszechniejszych modyfikacji biosorbentów. Węgiel aktywny jest szeroko stosowany zarówno w filtrach przemysłowych, jak i w gospodarstwach domowych. Używany jest również jako lek na problemy żołądkowe. Swoją wysoką skuteczność zawdzięcza neutralnemu dla środowiska i organizmów składowi (znacząca przewaga węgla) oraz bardzo dużej i zróżnicowanej wielkości porów. Główną wadą tego sorbentu są jednak wysokie koszty energetyczne i finansowe jego wytwarzania [Bansal; 1988]. Z tego powodu niemodyfikowane biosorbenty pasywne mogą być lepszym rozwiązaniem do zagospodarowania odpadów biologicznych, ze względu na niższe koszty związane z ich pozyskaniem i brakiem potrzeby modyfikacji. Pomimo wielu zalet w porównaniu do sorbentów syntetycznych, problemem w przypadku biosorbentów pasywnych pozostaje fakt, iż jedynie gromadzą one zanieczyszczenia na swojej powierzchni. Akumulacja substancji zachodzi na sorbentach, co w konsekwencji skutkuje koniecznością ich późniejszej neutralizacji lub biotransformacji [Bibbins-Martínez, 2023; Torres, 2020].

Biosorbenty aktywne

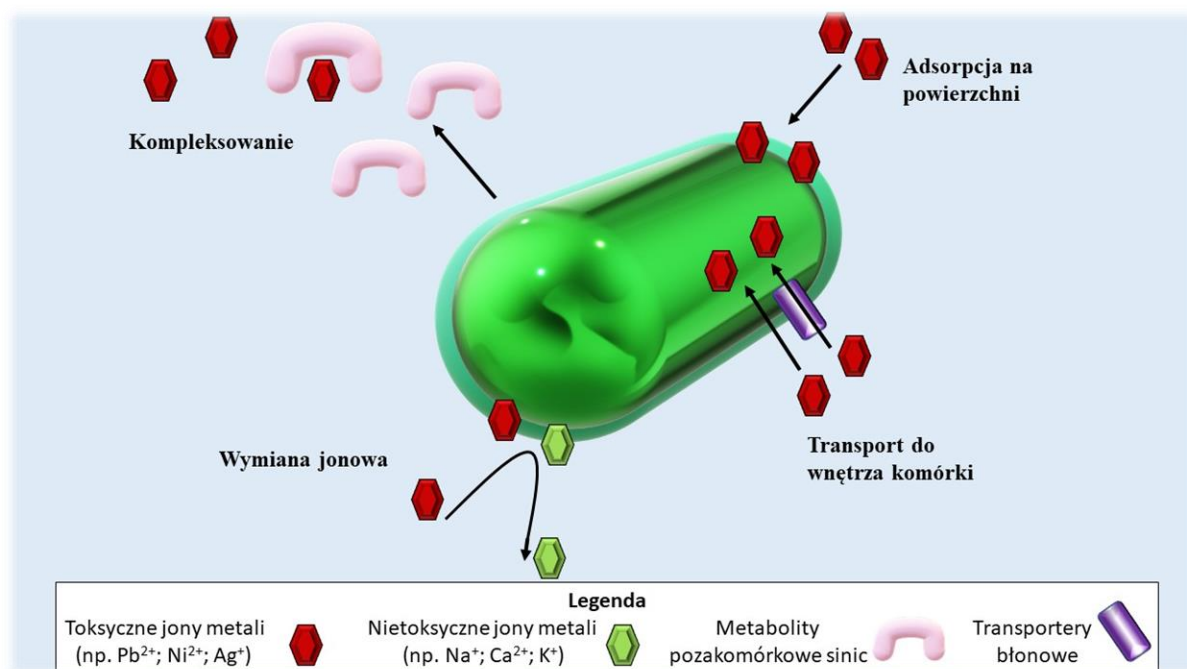
Do biosorbentów aktywnych zaliczamy wiele organizmów, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii, grzybów i mikroalg. Istotnym elementem odróżniający sorbenty aktywne od pasywnych jest to, iż w przypadku tych pierwszych proces biosorpcji opiera się między innymi na dyfuzji substancji do wnętrza komórek oraz ukierunkowanej produkcji metabolitów zewnątrzkomórkowych przez organizmy. Natomiast, w procesie aktywnym substancje mogą być nie tylko wychwytywane i unieruchamiane na powierzchni, ale również być rozkładane, przekształcane i wykorzystywane w procesach metabolicznych niektórych mikroorganizmów [Borowiak, 2021; Del Álamo, 2022; Gallardo-Altamirano; 2019]. Dodatkowo w przypadku działania czynników stresowych, takich jak zanieczyszczenia, procesy biochemiczne w organizmach ulegają zmianie na skutek bezpośredniego lub pośredniego oddziaływania toksycznych substancji na szlaki metaboliczne. Prowadzi to do zmian w ilości i składzie substancji produkowanych przez te organizmy. Wiele z tych związków, takich jak barwniki, czy zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe (EPS), może wykazywać właściwości podobne do substancji otrzymanych syntetycznie, co sprawia, że mogą stanowić ich naturalny i biodegradowalny zamiennik. Dlatego też, po procesie biosorpcji, w kolejnych etapach procesu technologicznego można pozyskać określone substancje z komórek aktywnych biosorbentów [Hug, 2020; Park, 2010; Zhang, 2016]. Dobrym przykładem ilustrującym działanie aktywnych biosorbentów jest zdolność niektórych mikroorganizmów do degradowania fosfonianów. Ta grupa związków charakteryzuje się obecnością w swojej strukturze przynajmniej jednego wiązania pomiędzy atomem węgla i fosforu. Jest to wiązanie niezwykle trwałe, którego chemiczna lub fizyczna degradacja wymaga stosowania silnych kwasów, wysokiej temperatury lub intensywnego promieniowania. Niektóre mikroorganizmy, dzięki posiadanemu aparatowi enzymatycznemu, rozkładają fosfoniany w warunkach fizjologicznych, rozczepiając wiązanie C-P, a uzyskane pierwiastki wykorzystują w procesach metabolicznych. Biosorbenty aktywne mają jednak jedną poważną wadę. Warunki środowiskowe lub parametry prowadzenia hodowli laboratoryjnych muszą być stabilne, aby organizmy te mogły się rozwijać. Dodatkowo ilość substancji sorbowanej musi zawierać się w przedziale stężeń, który nie wykazuje silnego działania toksycznego na aktywne biosorbenty [Drzyga, 2018; Lenartowicz, 2015; Kononova; 2002; Ternan, 1998].

1.4. Mechanizmy biosorpcji

Biosorpcja to złożony proces, w którym materiały biologiczne, takie jak mikroorganizmy, rośliny czy pochodne organiczne, wiążą i usuwają zanieczyszczenia z roztworów wodnych. Dlatego istnieje kilka różnych mechanizmów, przez które zachodzi biosorpcja, z których każdy charakteryzuje się unikalnym sposobem oddziaływania między biosorbentem a substancjami zanieczyszczającymi (Rys.3). W niniejszym rozdziale omówione zostaną główne mechanizmy biosorpcji, które stanowią podstawę efektywnego usuwania zanieczyszczeń w różnych warunkach środowiskowych [Park, 2010; Torres, 2020].

Pierwszym z mechanizmów jest adsorpcja na powierzchni komórki. Mechanizm ten jest często związany z wielkością cząstek oraz wielkością porów danego biosorbentu. Ta właściwość jest powszechnie wykorzystywana do akumulacji substancji w przypadku sorbentów sztucznych lub modyfikowanych biosorbentów. Adsorpcja na powierzchni komórki opiera się na zjawiskach chemicznych i fizycznych. Reakcje chemiczne polegają na oddziaływaniu substancji z różnego rodzaju grupami funkcyjnymi znajdującymi się na powierzchni komórek lub należącymi do otoczki komórkowej, takimi jak grupa aminowa, karboksylowa czy hydroksylowa. W zależności od warunków środowiskowych i rodzaju reagujących ze sobą substancji, wiązania pomiędzy grupami funkcyjnymi składników błony komórkowej a sorbowaną substancją mogą być trwałe lub tymczasowe. Błona komórkowa mikroorganizmów oraz bardziej złożone struktury występujące na przykład u roślin, mają nieregularne kształty. W zależności od wielkości cząstek i formy zanieczyszczenia, przykładowo roztworu lub koloidu, oraz struktury powierzchni biosorbentu, proces adsorpcji związków na powierzchni może przebiegać z różną efektywnością. Ten mechanizm biosorpcji jest dominujący w przypadku biosorbentów pasywnych i występuje wraz z trzema pozostałymi w przypadku biosorbentów aktywnych [Torres, 2020; Volesky, 1990]. Ksenobiotyki mogą w określonych warunkach tworzyć trwałe połączenia z poszczególnymi grupami organicznymi i substancjami na powierzchni komórek. Mogą być również degradowane lub włączane jako integralna część błony komórkowej. Jest to szczególnie bardzo dobrze widoczne na przykładzie jonów metali, które po adsorpcji na powierzchni biosorbentu są najczęściej redukowane do formy metalicznej, tworząc nanocząstki (Rys.3). Efektywność tego procesu jest ściśle związana z pH środowiska reakcji, ze względu na zmiany ładunków na poszczególnych grupach funkcyjnych [Abdel, 2013; Arthira, 2020, Bazrafshan, 2016]. Wpływ odczynu środowiska na proces biosorpcji dobrze był widoczny w przypadku grzybów z rodzaju *Trichoderma*, gdzie usuwanie kadmu z największą wydajnością, wynoszącą 69,28%, zachodziło przy pH = 6, w porównaniu do innych zakresów pH [Bazrafshan, 2016].

Kolejnym mechanizmem biosorpcji przez mikroorganizmy jest kompleksowanie substancji poza komórką. Mikroorganizmy wydzielają do środowiska związki, które najczęściej mają charakter polimerowy (EPS). Zadaniem tych substancji jest nie tylko utrzymanie odpowiedniego pH czy zasolenia w otoczeniu komórki, ale także interakcja z potencjalnymi zagrożeniami, w tym chemicznymi. Dzięki EPS, biosorbenty unieszkodliwiają substancje toksyczne już w środowisku, nie dopuszczając do ich bezpośredniego kontaktu z komórką i potencjalnego jej uszkodzenia. Mikroorganizmy mogą również, w przypadku wykrycia zagrożenia, zmieniać ilość oraz skład produkowanych metabolitów, aby jeszcze skuteczniej zwalczać chemiczne zagrożenia. Niektóre organizmy pokrywają się otoczką śluzową, która ma na celu kompleksowanie potencjalnie niebezpiecznych substancji, co stanowi ochronę prewencyjną. [Liu, 2002; Markou, 2015; Moyo, 2014; Silah, 2017].



Rysunek 3. Podstawowe mechanizmy biosorpcji na przykładzie oddziaływania toksycznych jonów metali z komórką cyjanobakterii.

Trzecim mechanizmem biosorpcji jest wymiana jonowa. Na powierzchni komórki, oprócz specyficznych grup funkcyjnych, występują również jony niektórych metali (np. sodu, wapnia), związane z substancjami organicznymi. Ich obecność na powierzchni zapobiega stresowi osmotycznemu i oksydacyjnemu, oraz utrzymuje równowagę elektronową na powierzchni komórki. W przypadku zanieczyszczenia środowiska jonami metali o działaniu toksycznym (np. srebro, ołów) mikroorganizmy i rośliny potrafią zastępować jony neutralne występujące na ich zewnętrznych warstwach jonami pierwiastków, które stanowią zanieczyszczenie. Dzięki temu metale szkodliwe nie wchodzi w interakcje z innymi strukturami komórkowymi, tym samym nie wykazują działania toksycznego. Najczęściej jony te są wymieniane w stosunku ilościowym 1:1 (np. Na^+ na Ag^+) (Rys.3) [de Freitas, 2020; Mohapatra, 2019; Rinanti, 2017]. Przykładem takiego działania jest usuwanie jonów miedzi i niklu przez niektóre gatunki sinic, w tym *Arthrospira platensis* [Markou, 2015].

Ostatnim mechanizmem biosorpcji jest proces dyfuzji zanieczyszczeń do wnętrza komórki. Proces ten może być regulowany przez komórkę lub przebiegać niezależnie od niej, co zależy od rodzaju komórki oraz charakteru zanieczyszczeń. Przepływ związków chemicznych do wnętrza może odbywać się bezpośrednio przez błonę komórkową lub za pośrednictwem umieszczonych w niej kanałów. Dyfuzja do wnętrza komórki jest ściśle powiązana z możliwością biotransformacji zanieczyszczeń przez organizmy żywe. Niektóre jony metali mogą zastępować inne, podobne im pierwiastki w szlakach metabolicznych, pełniąc rolę mikroelementów lub składników centrum aktywnego enzymów. Możliwe jest również przekształcanie jonów metali w nanocząstki wewnątrz komórki. Mechanizm dyfuzji jest najczęściej spotykany w przypadku skażenia środowiska zanieczyszczeniami organicznymi.

Mikroorganizmy włączają te związki w swoje szlaki metaboliczne, korzystając z dodatkowego źródła pierwiastków chemicznych. Jest to szczególnie widoczne w przypadku pierwiastków takich jak azot czy fosfor, których dostępność w środowisku jest znacznie ograniczona w porównaniu do węgla, tlenu czy wodoru. W literaturze można znaleźć prace wskazujące na usuwanie i wykorzystywanie przez cyjanobakterie oraz inne heterotroficzne bakterie lub grzyby zanieczyszczeń, takich jak aminofosfoniany, jako dodatkowego źródła fosforu, co stymuluje ich wzrost [Singha, 2012; Sun, 2016].

1.5. Zastosowanie biosorbentów

Coraz częściej podejmowane są badania na temat możliwego wykorzystania pasywnych i aktywnych biosorbentów do usuwania zanieczyszczeń. Celem tych prac jest charakteryzacja biosorbentów, optymalizacja warunków hodowli oraz ocena ich skuteczności w usuwaniu zanieczyszczeń. Ważnym aspektem jest również analiza interakcji pomiędzy zanieczyszczeniem a biosorbentem oraz zbadanie wpływu samego skażenia na mikroorganizmy, w celu oceny ryzyka degradacji biosorbentu. Dlatego też, badania nad biosorbentami są bardzo czasochłonne i pracochłonne, bo koncentrują się na wielu typach materiałów sorpcyjnych, takich jak żywe organizmy, komórki mikroorganizmów oraz pozostałości roślinne. Celem tych prac jest sprawdzenie, jak różnego rodzaju organizmy radzą sobie z usuwaniem zdefiniowanych zanieczyszczeń w środowisku, pomijając możliwości implementacji w skali przemysłowej [Del Álamo, 2022; Borowiak, 2021; Gallardo-Altamirano, 2019]. W tym podrozdziale przedstawiono kilka grup zanieczyszczeń, które najczęściej pojawiają się w literaturze jako przedmiot badań dotyczących biosorbentów, a także omówiono postępy w badaniach nad ich neutralizacją za pomocą biosorbentów. Pierwszą i najlepiej opisaną grupą zanieczyszczeń są jony metali, które mogą być gromadzone, skompleksowane lub redukowane przez biosorbenty, ale tylko niewielka ilość z nich może być wykorzystana w żywych komórkach jako składnik w szlakach metabolicznych. Inaczej natomiast organizmy gospodarują ksenobiotykami organicznymi, obecnymi w danym ekosystemie, czyli substancjami zbudowanymi głównie z węgla, wodoru, tlenu i azotu oraz siarki i fosforu, które są podstawowymi pierwiastkami budulcowymi dla wszystkich organizmów. Złożone substancje mogą zostać rozłożone na mniejsze cząstki i wykorzystane jako substraty w procesach metabolicznych. Organiczne ksenobiotyki mogą ulegać biotransformacji, a tym samym zmianie ulegają ich właściwości [Del Álamo, 2022; Borowiak, 2021; Gallardo-Altamirano, 2019]. Ze względu na różnorodność zanieczyszczeń organicznych wyróżniono w niniejszym opisie cztery podgrupy związków organicznych.

- Metale oraz ich jony

Po kilkudziesięciu latach intensywnego rozwoju metalurgii, metale i ich jony stały się poważnym i niebezpiecznym zanieczyszczeniem. Przenikają one do środowiska z różnych źródeł, takich jak górnictwo, przemysł elektryczny i maszynowy, gospodarstwa domowe, wojsko i energetyka.

Metale mogą zakłócać równowagę osmotyczną w środowisku, co może prowadzić do katastrofalnych skutków dla ekosystemu [Mishra, 2019; Wasi, 2013]. Jony takich pierwiastków jak Cu, Na i Zn są niezbędnymi mikroelementami dla niemal każdego organizmu, jednak ich podwyższone stężenia mogą zaburzać transport substancji do i z komórek oraz wywoływać stres oksydacyjny. Dodatkowym problemem jest obecność wielu toksycznych metali i ich jonów, takich jak Pb, Cd, Ni, a także radioaktywnych izotopów, takich jak U czy Ra [Chen, 2020; Heidari, 2017; Izydorczyk, 2021, Williams, 2019]. Metale z tej grupy są szczególnie niebezpieczne, ponieważ nie tylko zakłócają równowagę jonową w biosferze i powodują stres oksydacyjny, ale także mogą kumulować się w łańcuchu pokarmowym. Nie są one bowiem przetwarzane do mniej toksycznych form, a jedynie magazynowane w tkankach. W rezultacie metale te oddziałują głównie w obrębie łańcucha pokarmowego oraz przez namnażanie się organizmów, a niebezpośrednio na całą biosferę. Z tego powodu badania nad biosorpcją koncentrują się na usuwaniu jonów metali ze ścieków i środowiska [Banerjee, 2022; Giese, 2020; Pandey, 2021; Vishnu, 2020]. Jednym z takich metali jest chrom. Wiele prac koncentruje się na usuwaniu jonów chromu z roztworów wodnych lub ścieków przy użyciu biomasy lub żywych organizmów. Najczęściej jony tego pierwiastka wiążą się z grupami aminowymi i karboksylowymi obecnymi na powierzchni komórek, gdzie dochodzi do ich kompleksowania i akumulacji, co skutkuje dezaktywacją tej toksycznej substancji [John, 2021; Vega Cuellar, 2022; Tan, 2020; Zhang, 2020]. Przykładowo w badaniach wykazano, że grzyby *Aspergillus flavus* mogą absorbować jony chromu z wydajnością 16,1 mg/g biomasy [Dey, 2019]. Z tego powodu grzyby te z powodzeniem zastosowano w pilotażowych programach oczyszczania ścieków. Również drożdże piwowskie mogą być skutecznie stosowane jako biosorbenty jonów Cu(II) oraz Pb(II) [Han, 2006]. Jako potencjalne biosorbenty zastosowanie znalazły również organizmy fotosyntetyczne, takie jak mikroalgi. Przykładowo, gatunek *Chlorella vulgaris* biosorbował jony Cd^{2+} przy początkowym stężeniu w roztworze 2,5 mg/L z skutecznością 72% [Ayele, Suresh, 2021]. W innych badaniach wykazano, że gatunek *Chlorella* sp. ma wobec jonów indu pojemność sorpcyjną wynoszącą 0,14 mM na gram biomasy, przy stężeniu tego pierwiastka w roztworze równym 20 mM. Innym, interesującym rozwiązaniem było połączenie dwóch gatunków *Aspergillus niger* i *Tetrademus obliquus*, w stosunku ilości komórek 2:1, do odzyskiwania złota z odpadów galwanicznych. Po 6 godzinach żywe komórki miały zdolność adsorpcji wynoszącą około 80 mg złota na gram biomasy, podczas gdy komórki liofilizowane miały zdolność usunięcia aż 100 mg/g [Shen, 2020]. Dla odmiany, *Graesiella emersonii*, *Arthrospira platensis* i drożdże *Saccharomyces cerevisiae* mogą usuwać pierwiastki promieniotwórcze, takie jak ^{226}Ra i ^{238}U , ^{239}Pu , ^{241}Am oraz ^{90}Sr i ^{233}U , i redukują jony uranu VI do IV [Chen, 2020; Heidari, 2017]. W niektórych przypadkach adsorpcja jonów metali na biosorbentach prowadziła do ich redukcji do zerowego stopnia utlenienia, tworząc nanocząstki tych metali [Cui, 2017; Gao, 2017; Muñoz, 2021]. Przykładem takiego procesu jest biosorpcja jonów srebra z roztworu przez grzyb *Botryosphaeria rhodina*. W wyniku tego procesu na powierzchni komórek powstawały nanocząstki chlorku srebra i srebra [Muñoz, 2021].

- Leki

Żywe komórki *Phaeodactylum tricornutum* wykazują wyższy współczynnik efektywności biosorpcji niż ich martwa biomasa. W badaniach wykorzystano między innymi oksytetracyklinę, której skuteczność usuwania wynosiła 97% przy stężeniu 2,5 mg/l [Santaeufemia, 2016]. To dowiodło, że mikroalgi mogą być używane jako żywy i nieinwazyjny element środowiska, zdolny do oczyszczania wody i gleby. Natomiast ibuprofen w stężeniu 15 mg/l został usunięty z medium hodowlanego ze skutecznością 99,9%, zarówno przez żywe jak i martwe komórki *Phaeodactylum tricornutum* [Santaeufemia, 2018]. Okazuje się, że niektóre gatunki mikroalg mogą wykazywać wysoką efektywność biosorpcji nawet przy dużych stężeniach związków. Jeszcze w innych badaniach oceniano zdolność biosorpcji bezafibratu, leku obniżającego poziom cholesterolu oraz paroksetyny (znanego antydepresanta) wykorzystując jako biosorbent osad czynny z oczyszczalni ścieków oraz wyizolowane do tego celu mikroorganizmów bytujące u ujścia rzeki Douro na Półwyspie Iberyjskim. Otrzymane wyniki jednoznacznie potwierdziły, że w ciągu dwóch tygodni oba leki zostały usunięte ze skutecznością 97%, odpowiednio przy stężeniach 1 mg/l i 500 mg/l [Duarte, 2019]. Natomiast cyprofloksacyna, która jest bardzo skuteczna w leczeniu zakażeń bakteryjnych i przenika do wielu narządów, została skutecznie adsorbowana przez korzenie figowca z efektywnością 99,27 mg/g biomasy [Fan, 2020]. Niektóre dane literaturowe zdecydowanie sugerują, że skuteczność usuwania danego ksenofarmaceutyku jest zależna od rodzaju zastosowanego biosorbentu. Li i wsp. (2019) przeprowadzili badania porównujące efektywność biosorpcji diklofenaku i 2,2,6,6-tetrametylopiperydyny (TMP) przez żywe mikroalgi oraz biowęgiel, pochodzący z pirolizy odpadów ogrodowych. Stwierdzono, że diklofenak był lepiej sorbowany przez biowęgiel, natomiast mikroalgi lepiej usuwały TMP. W obu przypadkach stwierdzono, że biosorpcja zachodzi dzięki tworzeniu wiązań wodorowych oraz interakcji elektrostatycznych z powierzchnią sorbentu [Li, 2019]. Przykładem innego bioukładu wykorzystywanego do usuwania farmaceutyków jest martwa grzybnia *Phanerochaete chrysosporium* unieruchomiona na kawałkach drewna, która przy obniżonym pH adsorbowała naproksen z wydajnością ponad 90% [Li, 2015]. Podobnie drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, unieruchomione na strukturach zbudowanych z alginianu wapnia, usuwały antybiotyk cefaleksynę z efektywnością 94% [Rasu, 2022].

- Pestycydy

Obok metali i leków, istotnym zanieczyszczeniem środowiska są pestycydy. Pestycydy są chemicznymi związkami stosowanymi w rolnictwie do ochrony upraw przed szkodnikami, chwastami i chorobami. Chociaż ich użycie przyczynia się do zwiększenia plonów i zapewnienia bezpieczeństwa żywności, pestycydy stanowią poważne zagrożenie dla środowiska i zdrowia publicznego. Wprowadzone do ekosystemów, mogą kumulować się w wodach gruntowych, glebach oraz w organizmach żywych, co prowadzi do ich bioakumulacji w łańcuchu pokarmowym. Wysokie stężenia pestycydów mogą powodować toksyczne skutki u zwierząt, ludzi oraz zakłócać

równowagę ekosystemów [Hassaan, 2020; Mahmood, 2016, Tang, 2021]. Z tego powodu konieczne jest opracowanie skutecznych metod usuwania pestycydów z środowiska, aby minimalizować ich negatywny wpływ i chronić zdrowie publiczne oraz różnorodność biologiczną. Przykładowo, wykazano, że *Ganoderma lucidum* i *Trametes* sp. mogą adsorbować pikloram ze środowiska wodnego. W tym przypadku żywe komórki wykazywały większą wydajność usuwania herbicydu niż biomasa poddana obróbce cieplnej. Autorzy, na podstawie analizy biomasy grzybów dowiedli, że za adsorpcję badanej substancji odpowiadają grupy funkcyjne karboksylowe, aminowe i fosforanowe [Maciel, 2013]. W innych badaniach wykazano, że sinice *Fischerella* sp. usuwają paration metylowy (insektycyd) z roztworu wodnego z około 80% efektywnością. W pierwszym etapie testowane związki ulegały chemisorpcji na powierzchni komórek, a następnie mikroorganizmy wykorzystywały je jako źródło fosforu [Tiwari, 2017].

Inną, dobrze poznaną grupą zanieczyszczeń pod względem biosorpcji i bioremediacji są fosfoniany, które stosuje się jako herbicydy blokując enzymy w szlaku szikimowym. Wyniki badań prezentowanych w literaturze wykazały, że organizmy heterotroficzne, takie jak grzyby i bakterie, mogą degradować wiązania C-P i wykorzystywać fosfor w szlakach metabolicznych [Benrook, 2016, Koskinen, 2016;]. Ponadto badania wykazały, że bakterie z rodziny *Synechococcus* oraz gatunku *E. coli* rozwijają się w środowisku, w którym fosfoniany były jedynym źródłem fosforu [Ruffolo, 2023]. Obok bakterii, również organizmy fototroficzne posiadają układ enzymatyczny umożliwiający degradację wiązania C-P i wykorzystują produkty reakcji chemicznych w swoich komórkach. Przykładem takich organizmów są cyjanobakterie, zdolne do degradacji tych herbicydów. Innym przykładem herbicydu, który może być skutecznie usuwany przez mikroorganizmy jest metolachlor. Chociaż toksyczność tego związku jest przedmiotem dyskusji, wiadomo, że może on akumulować w tkankach i prowadzić do uszkodzeń limfocytów. Badania przeprowadzone przez Liu i wsp. (2021) pokazały, jak modyfikacja biosorbentu wpływa na skuteczność usuwania zanieczyszczeń na przykładzie metolachloru. Badacze poddali pirolizie proszek z łupin orzecha włoskiego, a następnie powstały biowęgiel zmodyfikowali za pomocą kwasu fulwowego i cytrynowego. Wyniki wykazały, że biowęgiel modyfikowany kwasem fulwowym miał o 25 punktów procentowych wyższą efektywność biosorpcji niż biowęgiel modyfikowany kwasem cytrynowym, osiągając skuteczność 74% [Liu, 2021]. Innym przykładem jest karbofuran, substancja używana jako środek owadobójczy, który ma silne właściwości toksyczne wobec zwierząt i ludzi. Związek ten w początkowej dawce 4 µg/ml został usunięty przez heterotroficzną bakterię *Enterobacter* sp. ze skutecznością 80% w ciągu tygodnia [Umar Mustapha, 2020]. Podobny poziom efektywności biosorpcji (około 80%) wykazał grzyb *Aspergillus sydowii*, w przypadku parationu metylowego. Grzyb ten był inkubowany przez 30 dni w pożywce zawierającej 50 µg/ml testowanego związku [Soares, 2021].

- Pigmenty syntetyczne

Bacillus subtilis usuwa fiolet metylowy ze ścieków tekstylnych z 98% skutecznością przy stężeniu tego pigmentu 333 mg/l [Rostom, 2019]. Natomiast komórki żywe *Aspergillus fumigatus* w niewielkim stopniu adsorbowały czerwien kongo, podczas gdy komórki martwe wykazały wysoką skuteczność usuwania tego barwnika. Najwyższa efektywność biosorpcji wyniosła 82,23% po 180 minutach przy stężeniu 100 mg/l czerwieni kongo [Abdel-Ghany, 2019]. Zaś *Chlorella pyrenoidosa* z największą wydajnością usuwa organiczny pigment - rodaminę B, przy pH 8, w przedziale stężeń 20-500 mg/l. Efektywność biosorpcji w tym zakresie nie ulegała znaczącym zmianom [da Rosa, 2018]. Martwa biomasa *Arthrospira platensis* została natomiast wykorzystana jako biosorbent błękitu metylenowego, osiągając najwyższą zdolność sorpcyjną, wynoszącą 312,5 mg/g, przy pH 7,5 i temperaturze 298°K [Mitrogiannis, 2015].

- Inne zanieczyszczenia organiczne

Gatunek *Phormidium* sp. sorbował fenol w stężeniu 339,9 mg/l, a jego pojemność biosorpcyjna dla tego związku wyniosła 165,1 mg/g [Karatay, 2017]. Dane literaturowe wskazują, że gatunki bakterii z rodziny *Arthrobacter* i *Pseudomonas*, a także grzyby z rodziny *Aspergillus* i *Trichoderma* mogą sorbować i rozkładać węglowodory pochodzące z odpadów naftowych [Khandelwal, 2023]. W innych przypadkach badano możliwość usuwania wielopierścieniowych węglowodórów aromatycznych (WWA) z wykorzystaniem reakcji Fentona – procesu utleniania substancji w obecności Fe^{2+} i nadtlenu wodoru oraz mikroorganizmów. Badania wykazały, że połączenie tych dwóch systemów jest bardziej skuteczne w degradacji WWA niż stosowanie ich oddzielnie. Szczegółowe eksperymenty wykazały, że produkty reakcji Fentona mogą charakteryzować się lepszą rozpuszczalnością w wodzie i większą biodostępnością. Organizmy heterotroficzne rozkładają WWA głównie do H_2O i CO_2 , natomiast mikroalgi włączają te substancje do swojego metabolizmu i przekształcają je w proste związki organiczne, takie jak metan [Gou, 2022]. W innych badaniach wykazano, że grzyby z gatunku *Phanerochaete chrysosporium*, po trzydniowej inkubacji, biosorbowały piren i fenantren z efektywnością odpowiednio 52,21% i 19,71%. Badania te wykazały również, że ten gatunek grzybów po 37 dniach może biodegradować te dwie substancje ze skutecznością odpowiednio 49,21% i 60,62% [Chen, 2012]. Organizmy mogą również tworzyć konsorcja z mikroorganizmami. Przykładowo układ złożony z *Achromobacter xylosoxidans* i *Phragmites australis* usuwał z roztworu wodnego fenol z wysoką efektywnością [Ho, 2012].

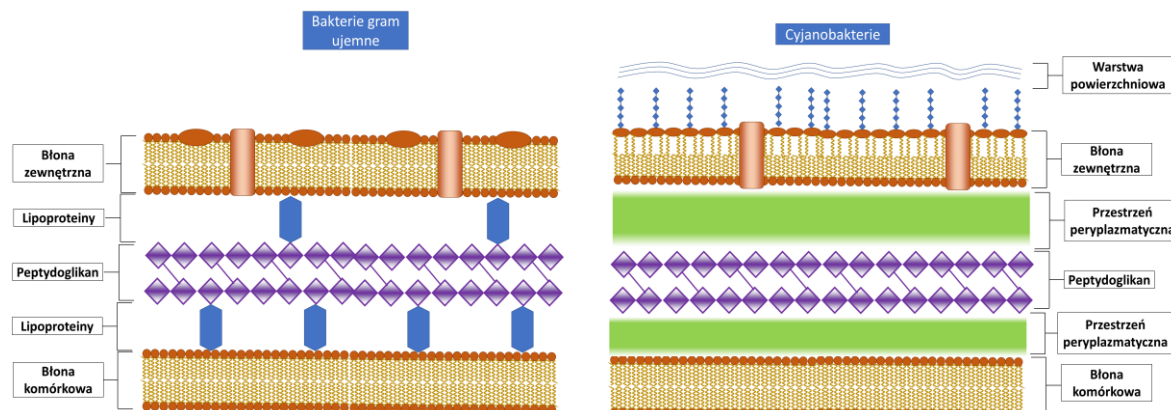
1.6. Cyjanobakterie – mikroorganizmy o wysokim potencjale biosorpcyjnym – charakterystyka i właściwości

Cyjanobakterie (sinice, niebiesko-zielone algi) to rozległa grupa fotoautotroficznych organizmów prokariotycznych, które wykazują cechy charakterystyczne zarówno dla bakterii (budowa komórki), jak i roślin (zdolność do fotosyntezy). Aktualne badania sugerują, że były to pierwsze organizmy fotosyntetyczne na Ziemi, które wyewoluowały około 3,5 miliarda lat temu. W literaturze naukowej podkreśla się również, iż sinice były protoplastami współczesnych chloroplastów roślinnych, zaadaptowanych poprzez endosymbiozę. Prawdopodobnie to dzięki tym mikroorganizmom doszło do tzw. katastrofy tlenowej, co skutkowało stopniowym wzrostem O_2 w ziemskiej atmosferze. Szacuje się, że nawet obecnie cyjanobakterie odpowiadają za około 1/3 produkowanego na Ziemi tlenu [Kasowska – Żok, 2014; Rezayian, 2016; Vincent, 2009]. Cyjanobakterie wytwarzają wiele substancji zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych, w tym białek, cukrów i tłuszczów, które charakteryzują się zróżnicowaną budową i funkcjonalnością. Dzięki temu mikroorganizmy te są obecne w niemal każdym ekosystemie na Ziemi. Zasiedlają nie tylko środowiska sprzyjające rozwojowi, jak słodkowodne zbiorniki czy lasy, ale także środowiska ekstremalne, takie jak wody Morza Martwego, lodowce czy też żyją na innych organizmach, na przykład leniwcach [Frenades, 1993; Kasowska – Żok, 2014; Nilsson, 2002; Rezayian, 2016]. Eksperymentalnie dowiedziono również, że komórki gatunku *Chroococcidiopsis thermalis* są w stanie przetrwać na powierzchni Marsa [Cumbers, 2014]. Cyjanobakterie mogą stanowić doskonały materiał do przyszłego rozwoju ludzkości, służąc jako źródło żywności nowej generacji, potencjalnych leków, czy nawet materiał do terraformowania planet [Çelekli, 2024]. Dzięki wymienionym właściwościom i osiągnięciom ewolucyjnym sinice pełnią kluczowe funkcje w większości ekosystemów.

W przypadku możliwego zastosowania cyjanobakterii jako biosorbentów, istotne są trzy elementy związane z budową i funkcjonowaniem tych organizmów, mianowicie budowa ściany komórkowej, obecność barwników fotosyntetycznych oraz produkcja zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych.

Ściana oraz błona komórkowa są kluczowymi elementami definiującymi komórkę jako strukturę oddzieloną od środowiska zewnętrznego. W kontekście biosorpcji istotna jest ich budowa, a tym samym zdolność do wymiany substancji między obszarami po obydwu stronach ściany. Pomimo zaliczania cyjanobakterii do grupy bakterii Gram-ujemnych, wykazano, że ich ściany posiadają odmienną budowę w porównaniu z bakteriami heterotroficznymi. Na przykład sinice z gatunku *Synechocystis* sp. charakteryzują się 20-krotnie mniejszą przepuszczalnością błony komórkowej niż ściany *Escherichia coli* [Lima, 2020]. Podobnie jak w przypadku bakterii Gram-ujemnych, cyjanobakterie posiadają dwie warstwy błony fosfolipidowej, przedzielone warstwą peptydoglikanów. Różnice pojawiają się jednak w budowie pomiędzy tymi warstwami (Rys.4). U bakterii Gram-ujemnych pomiędzy błonami występują lipoproteiny, natomiast u sinic przestrzeń pomiędzy warstwami wypełnia peryplazma zbudowana

w znaczącej mierze z peptydów. Dodatkowo zewnętrzna część cyjanobakterii pokryta jest warstwą glikoprotein, a w niektórych przypadkach także otoczką śluzową, które zwiększają stabilność osmotyczną i mechaniczną. Informacji na temat budowy ściany komórkowej cyjanobakterii jest w literaturze niewiele, dlatego też dokładne różnice nie są jeszcze dobrze poznane [Castenholz, 2015].



Rysunek 4. Porównanie budowy ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych i cyjanobakterii.

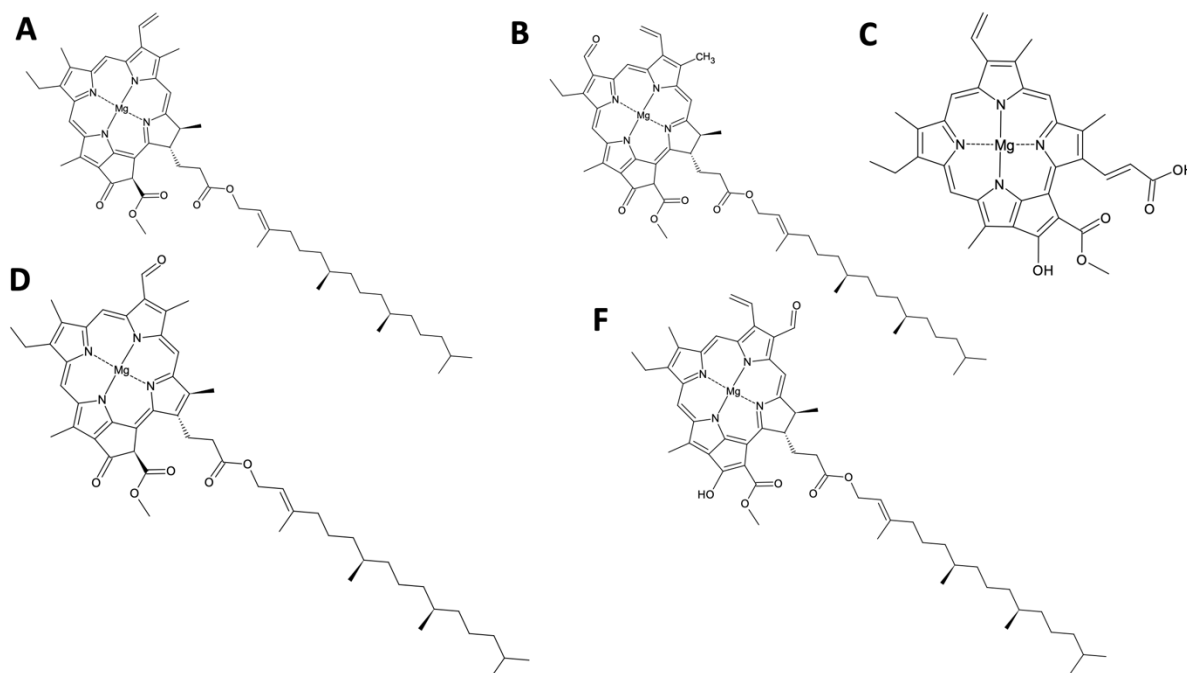
Różnice w budowie ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych i cyjanobakterii przedstawione na powyższym rysunku okazują się mieć kluczowe znaczenie w potencjalnych procesach biosorpcji. W rezultacie komórki bakterii heterotroficznych oraz cyjanobakterii mogą reagować w odmienny sposób na te same czynniki zewnętrzne.

Ważnym aspektem metabolizmu cyjanobakterii, związanym z ich ścianą komórkową oraz reakcją na czynniki środowiskowe są produkowane przez te mikroorganizmy zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe (EPS). Jest to niezwykle zróżnicowana grupa polimerów, składająca się z podstawowych lub zmodyfikowanych cukrów, lipidów, białek oraz kwasów nukleinowych, których masa może dochodzić nawet do miliona Daltonów [Laroche, 2022]. Substancje te pełnią szereg istotnych ról w życiu cyjanobakterii. W korzystnych warunkach środowiskowych EPS odpowiadają za agregację komórek, tworzenie mat, przyczepianie komórek do powierzchni oraz pełnią rolę buforu pomiędzy komórkami a środowiskiem zewnętrznym. Natomiast w niekorzystnych warunkach EPS mogą zatrzymywać wodę i niezbędne substancje odżywcze lub przeciwdziałać czynnikom stresowym. Przykładem takiego działania jest przechwytywanie i kompleksowanie jonów metali ciężkich przez kwas uronowy, białka chelatujące oraz enzymy, które są składnikami EPS. W zależności od gatunku, zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe są wytwarzane w każdych warunkach lub tylko pod wpływem działania czynników stresogennych. Ich budowa może być również różnicowana w zależności od sytuacji, w której znajdują się komórki [De Philippis, 2011; Pannard, 2016]. Produkcję EPS można podzielić na dwa etapy. W pierwszym etapie następuje synteza półproduktów we wnętrzu komórki, które są wydzielane na zewnętrzną powierzchnię ściany komórkowej. W drugim etapie, dzięki aparatowi enzymatycznemu, następuje polimeryzacja półproduktów do właściwych EPS i ich odpowiednia dystrybucja: uwalnianie do środowiska, łączenie z innymi komórkami

lub pozostawianie w otocze śluzowej ściany [Sun, 2020]. Tworzenie tak złożonych substancji w ukierunkowanych procesach wymaga od cyjanobakterii dużych ilości energii, którą jako fotoautotrofy pozyskują głównie z energii słonecznej. Dlatego w całym metabolizmie cyjanobakterii niezwykle ważną rolę odgrywa aparat fotosyntetyczny [Ho, 2017].

Barwniki fotosyntetyczne cyjanobakterii pełnią nie tylko kluczową rolę w pozyskiwaniu energii słonecznej, ale również są istotnymi elementami, które umożliwiają komórkom zachowanie homeostazy. Sinice posiadają rozbudowany system fotosyntezy oraz liczne mechanizmy przeciwdziałające szkodliwym czynnikom środowiskowym, takim jak zmiany pH, promieniowanie UV czy zasolenie [Latifi, 2009; Oren, 2015; Srivastava, 2010]. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę trzech najważniejszych grup pigmentów występujących w komórkach tych mikroorganizmów, które nie tylko odpowiadają za absorpcję promieniowania, ale również pełnią funkcje ochronne [Wada, 2013].

Podobnie jak u roślin, w aparacie fotosyntetycznym cyjanobakterii główną rolę odgrywają chlorofile. Są to podstawowe barwniki, absorbujące promieniowanie w zakresie światła widzialnego (430–453 nm i 642–664 nm). Chlorofile są zbudowane z tetrapiolowego pierścienia porfiryнового ze skoordynowanym centralnie atomem magnezu. W zależności od podstawników wyróżnia się różne rodzaje chlorofilów. Do najbardziej znanych i powszechnych, występujących zarówno u roślin oraz sinic, są chlorofile a i b (Rys.5).



Rysunek 5. Struktury chemiczne chlorofilu

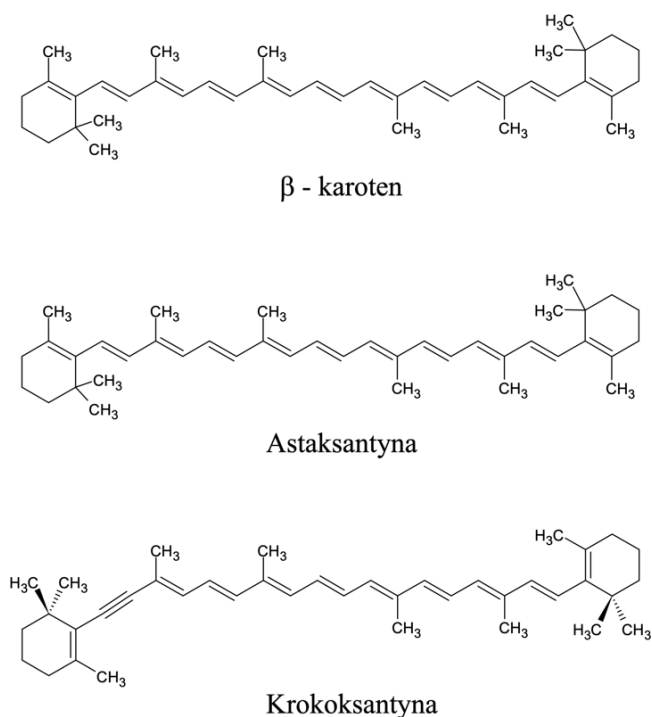
W niektórych grupach, szczególnie wśród mikroorganizmów fotosyntetycznych, wyróżnia się jeszcze chlorofile c, d oraz f. U niektórych gatunków sinic w komórkach dominuje chlorofil d oraz f [Tanaka, 2011]. W chlorofilach, pod wpływem działania fotonów, następuje wzbudzenie elektronu,

który jest następnie przekazywany do fotosystemów II i I. W wyniku kolejnych przemian chemicznych, energia świetlna jest przekształcana na energię chemiczną w postaci ATP i NADPH. Całkowita wydajność tej reakcji jest bardzo wysoka, wynosząc około 98%. Niewielkie straty energii występują w momencie absorpcji promieniowania, kiedy to układ oddaje energię, wywołując zjawisko fluorescencji (685 lub 760 nm). Jest to tzw. jasna faza fotosyntezy [Eggink, 2001; Rowe, 1995; Sinha, 2003].

Kolejną grupą barwników w komórkach sinic są związki należące do terpenoidów, czyli karotenoidy. Związki z tej grupy nie tylko poszerzają zakres absorbowanego promieniowania w zakresie światła widzialnego w zakresie 400 – 500 nm, ale również odpowiadają za ochronę przed promieniowaniem UV oraz stabilizację błon lipidowych [Lu, 2018; Parker, 1989; Vershinin, 1999]. Karotenoidy wykazują działanie przeciwutleniające, które opiera się na trzech głównych mechanizmach neutralizacji reaktywnych form tlenu: tworzeniu kompleksu z wolnym rodnikiem, transferu elektronów oraz absorpcji wodoru [Young, 2001]. Ze względu na budowę karotenoidy dzieli się na trzy podgrupy:

- karoteny – niezawierające w swojej strukturze atomów tlenu;
- ksantofile – zawierające w swojej budowie atomy tlenu w postaci grup organicznych (-OH; C=O);
- karotenoidy z wiązaniem acetylowym – zawierające w swojej strukturze przynajmniej jedno potrójne wiązanie pomiędzy atomami węgla.

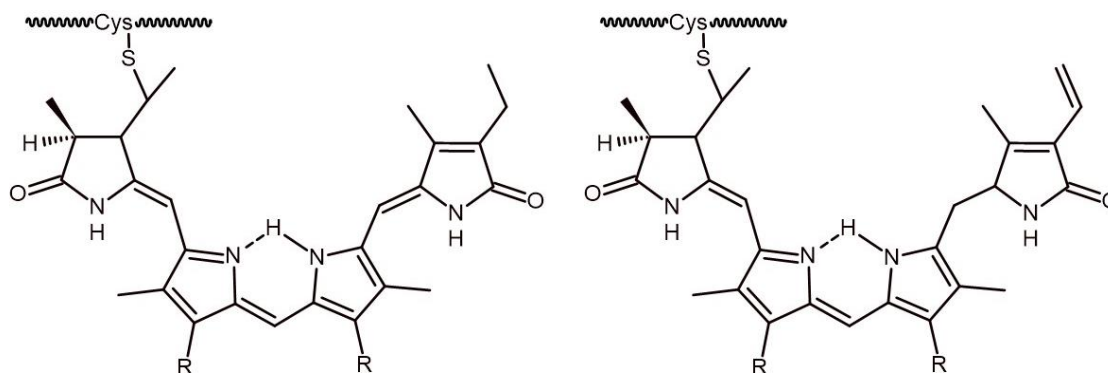
Ta ostatnia grupa jest charakterystyczną jedynie dla cyjanobakterii i niektórych gatunków mikroalg i nie występuje w pozostałych organizmach fotosyntetycznych (Rys.6) [Christaki, 2012; Orosa, 2000].



Rysunek 6. Struktury wybranych przedstawicieli poszczególnych grup karotenoidów.

Wykorzystanie tych dwóch grup pigmentów przez organizmy fotosyntetyczne ogranicza się do pewnego zakresu promieniowania światła widzialnego, pozostawiając lukę, w której promieniowanie, głównie z zakresu światła zielonego, nie jest efektywnie wykorzystywane w procesie fotosyntezy. Dlatego też sinice oraz niektóre mikroalgi biosyntezują trzeci rodzaj pigmentów fotosyntetycznych – fikobiliproteiny.

Fikobiliproteiny to barwne białka, w których za adsorpcję promieniowania odpowiadają fikobiliny – struktury organiczne na bazie otwartego pierścienia pirolowego (Rys.7).



Rysunek 7. Struktury dwóch najczęściej występujących fikobilin, z zaznaczaną cysteiną łączącą je z częścią białkową. Po lewej fikocyjanobilina, po prawej fikoerytrobilina.

Fikobiliny są kowalencyjnie związane z apoproteiną poprzez cysteinę. Do najpowszechniej występujących fikobiliprotein należą: fikocyjanina (PC), allofikocyjanina (APC) oraz fikoerytryna (PE). Białka te tworzą systemy antenowe, zwane fikobilisomami, które są zlokalizowane w PSII i poszerzają obszar absorbowanego promieniowania, w zakresie 460 – 670 nm [Hu, 2019]. Fikobiliproteiny pełnią również szereg ważnych funkcji w komórkach cyjanobakterii, w tym rolę fotoprotekcyjną, dzięki zdolności do stopniowego rozpraszania absorbowanej energii w momencie intensywnego naświetlania [Fernández-Rojas, 2014; Watanabe, 2014]. Są także bardzo skutecznymi antyoksydantami, co czyni je kluczowymi w obronie komórek przed czynnikami stresowymi. Zwalczają powstające wolne rodniki, umożliwiając szybszy powrót komórek do homeostazy [Pleonsil, 2013; Zhou, 2005].

Udowodniono również, że fikobiliproteiny w niektórych przypadkach są uwalniane z komórek i mają zdolność do tworzenia nanocząstek metali. Może to sugerować ich rolę w bezpośrednim zwalczaniu czynników stresowych, takich jak zanieczyszczenia środowiskowe, w tym jony metali. Fikobiliproteiny pełnią również rolę regulatorów ilości pierwiastków niezbędnych w procesach biologicznych, zwłaszcza azotu, poprzez ich gromadzenie lub uwalnianie wewnątrz komórki [El-Naggar, 2017].

Wszystkie trzy grupy pigmentów fotosyntetycznych sprawiają, że cyjanobakterie posiadają wyjątkową zdolność adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych. Barwniki te nie tylko zwiększają zdolność absorpcji promieniowania, często niedostępnego dla innych fotoautotrofów, ale również pełnią wiele innych funkcji w komórkach. Mają one zdolność do neutralizowania

reaktywnych form tlenu (ROS), co jest szczególnie istotne w sytuacjach stresowych dla komórek. Efektywność ich działania zależy od wielu czynników, takich jak rodzaj ROS, stężenie oraz położenie pigmentów w komórkach cyjanobakterii. Na przykład, zbyt wysokie stężenie tlenu lub jego reaktywnych form może prowadzić do nadmiernego utleniania samych barwników.

Pigmenty fotosyntetyczne mogą również pełnić rezerwuar niezbędnych dla cyjanobakterii pierwiastków chemicznych, które w zależności od warunków mogą być uwalniane lub gromadzone w komórkach. W niektórych przypadkach barwniki te mogą ulegać innym procesom. Na przykład, obecność niektórych stresorów może powodować uwalnianie fikobiliprotein poza komórkę [El-Naggar, 2017; Pleonsil, 2013; Zhou, 2005]. Liczne badania wskazują, że cyjanobakterie zawdzięczają swój sukces ewolucyjny i zdolności adaptacyjne właśnie tak złożonemu aparatowi fotosyntetycznemu. Dlatego badacze często wykorzystują pomiar stężenia tych substancji oraz ich przemian jako markery do określania wzrostu i zmian metabolicznych w komórkach cyjanobakterii [Drzyzga, 2018; Lenartowicz, 2017; Niemczyk, 2020].

2. Cel pracy

Cyjanobakterie są mikroorganizmami szeroko rozpowszechnionymi na Ziemi, zasiedlającymi różnorodne nisze ekologiczne. Ich zdolności adaptacyjne, specyficzna budowa komórkowa oraz produkcja złożonych substancji, takich jak barwniki i zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe (EPS) przyczyniają się do ich szerokiego występowania w biosferze. Zdolność cyjanobakterii do fotosyntezy wyróżnia je na tle innych bakterii i sprawia, że są one badane pod kątem potencjalnych zastosowań w nauce i przemyśle, m.in. jako biosorbenty.

Celem niniejszej pracy była ocena zdolności wybranych gatunków cyjanobakterii do biosorpcji i/lub biotransformacji wybranych farmaceutyków obecnych w medium hodowlanym oraz zbadanie wpływu tych związków na metabolizm sinic. W badaniach nad metabolizmem cyjanobakterii zastosowano technikę spektrofotometrii UV-Vis, umożliwiającą precyzyjny pomiar zmian stężenia barwników fotosyntetycznych w komórkach. Skuteczność procesów biosorpcji i bioremediacji monitorowano przy użyciu techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

Tezy pracy:

1. Cyjanobakterie wykazują zdolność do efektywnej biosorpcji wybranych farmaceutyków, co czyni je potencjalnymi biosorbentami, zdolnymi do oczyszczania środowiska z organicznych zanieczyszczeń.
2. Proces biosorpcji oraz wpływ farmaceutyków na metabolizm cyjanobakterii różni się w zależności od gatunku i rodzaju związków chemicznych, co można zoptymalizować w kontekście ich praktycznego zastosowania.
3. Farmaceutyki mogą wpływać na metabolizm cyjanobakterii, co można zaobserwować poprzez zmiany w zawartości chlorofilu, karotenoidów i fikobiliprotein oraz morfologii komórek.

Badania obejmowały następujące etapy:

- A) Optymalizację warunków rozdzielania i oznaczania wybranych ksenofarmaceutyków w badanych próbkach z użyciem chromatografii cieczowej z detektorem UV-VIS i spektrometrem mas.
- B) Analizę wpływu wytypowanych farmaceutyków na rozwój i metabolizm testowanych gatunków cyjanobakterii, w tym:
 - pomiar zawartości chlorofilu w komórkach i ocenę dynamiki wzrostu cyjanobakterii;
 - oznaczenie stężenia barwników fotosyntetycznych jako wskaźnika zmian metabolicznych;
 - analizę ilości i struktury komórek przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM);
- C) Ocenę efektywności biosorpcji farmaceutyków przez cyjanobakterie w różnych warunkach:
 - w układach z jednym farmaceutykiem oraz z mieszaniną testowanych związków;

- z pojedynczymi gatunkami cyjanobakterii oraz w ich konsorcjach;
- D) Ocenę skuteczności oczyszczania medium hodowlanego – badanie toksyczności wobec wybranych bezkręgowców i mikroalg
- E) Identyfikację i określenie struktury potencjalnych metabolitów powstających w wyniku biotransformacji badanych farmaceutyków przez testowane cyjanobakterie.

3. Metodologia pracy badawczej

Wszystkie badania zrealizowano w Instytucie Chemii Uniwersytetu Opolskiego.

3.1. Używana aparatura i odczynniki

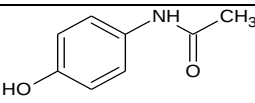
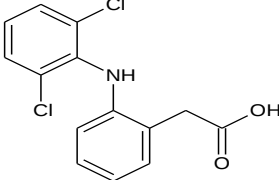
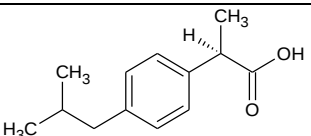
3.1.1. Aparatura

- ✓ Komora laminarna Airstream Esco Class II Biohazards Safty (ESCO Micro Pte. Ltd., Singapur, rok produkcji 2009) - do pracy w warunkach aseptycznych;
- ✓ Autoklaw KARALTAY LS-B50L (Beijing, China, rok produkcji 2013) – do sterylizacji szkła i pożywek;
- ✓ Spektrofotometr UV-2601 z firmy Rayleigh Instruments Limited (Essex, Anglia, rok produkcji 2014) – do oznaczania stężenia pigmentów fotosyntetycznych;
- ✓ Uniwersalny mikroskop badawczy Olympus CX41 zakupiony w firmie Olympus Polska Sp. z o.o. (Warszawa, Polska, rok produkcji 2003) wyposażony w aparat fotograficzny Olympus C-5050ZOOM (Nowy Jork, USA, rok produkcji 2003) – do fotografowania oraz analizy komórek i organizmów użytych w badaniach;
- ✓ Homogenizator ultradźwiękowy UP200HT (26 kHz, 200 W) z firmy Hielscher Ultrasonics GmbH (Teltow, Niemcy, rok produkcji 2013) – do rozbijania ścian komórkowych sinic;
- ✓ Koncentrator 7320020 RapidVap z firmy Labconco Corporation (Kansas City, USA, rok produkcji 2011) – do zateżenia ekstraktów w atmosferze azotu;
- ✓ Wysokosprawny chromatograf cieczowy, UltiMate 3000 z detektorem UV-Vis (190-800nm) z firmy Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA USA, rok produkcji 2011) – do analizy ekstraktów z płynów pochodowlanych, powierzchni i wnętrza komórek;
- ✓ Spektrometr mas micrOTOF – QII z jonizacją ESI z firmy Bruker Daltonik GmbH (Breme, Niemcy, rok produkcji 2011) - do analizy ekstraktów z płynów pochodowlanych, powierzchni i wnętrza komórek;
- ✓ Skaningowy mikroskop elektronowy z przystawką EDS, model TM 3000 z firmy Hitachi Global (Tokio, Japonia, rok produkcji 2010) – do analizy powierzchni komórek

3.1.2. Odczynniki

Testowane farmaceutyki (Tabela 1), odczynniki niezbędne do prowadzenia hodowli komórkowych i dodatki do fazy ruchomej: kwas mrówkowy i mrówczan zakupiono w firmie Merck Sp. z o.o. (Warszawa, Polska). Rozpuszczalniki o czystości LC-MS użyte do analiz zakupiono w firmie Krakchemia S.A (Kraków, Polska).

Tabela 1. Porównanie trzech testowanych ksenofarmaceutyków oraz ich kluczowych właściwości.

Nazwa	Struktura	Masa molowa [g/mol]	pKa	logP	Lit.
PARACETAMOL (PAR) (N-(4-hydroksyfenylo)acetamid)		151,17	9,38	0,46	Pubchem/Acetaminophen
DIKLOFENAK (DCF) (kwas o-N-(2,6-dichlorofenylo)aminofenylooctowy)		296,15	4,15	4,51	Pubchem/Diclofenac
IBUPROFEN (IBF) (kwas (RS)-2-[4-(2-metylopropylo)fenylo]propanowy)		206,29	4,91	3,97	Pubchem/Ibuprofen

3.2. Oznaczania wybranych ksenofarmaceutyków w badanych próbkach z użyciem chromatografii cieczowej z detektorem UV-VIS i spektrometrem mas.

Analizy LC-MS wykonywano za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego UltiMate 3000 wyposażonego w detektor spektrofotometryczny UV-Vis (190-800nm) i sprzężonego z detektorem mas micrOTOF – QII z jonizacją ESI. System LC zawierał automatyczny podajnik próbek, czterokanałowy układ pomp, termostat kolumny, system do odgazowywania próbki oraz podstawkę na rozpuszczalniki. W badaniach używano kolumny chromatograficznej: Accucore C18 (2,1 x 100 mm) oraz odpowiednich prekolumny, które zakupiono w firmie Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA) oraz kolumny Gemini NX-C18 (2,1 x 100 mm) w zestawie z prekolumnami, które zakupiono w firmie Phenomenex Phenomenex Ltd. (Cheshire, Wielka Brytania. Optymalizację warunków rozdzielania chromatograficznego opisano w rozdziale 4.1. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 0,3 ml/min. Kolumny chromatograficzne termostutowano w temperaturze 30°C. Detekcję badanych analitów prowadzono równolegle przy długości fali: 220 nm, 238 nm, 254 nm oraz 270 nm. Spektrometr mas pracował w trybie jonów dodatnich (paracetamol) i ujemnych (diklofenak i ibuprofen), uzyskiwanych na drodze jonizacji przez rozpylanie w polu elektrycznym (ESI). Zakres analizowanych mas wynosił 50 - 1000 Da. Identyfikację badanych analitów prowadzono w trybie MS/MS monitorując specyficzne przejścia jonu prekursora do jonu potomnego (Tabela 2). Do analizy ilościowej stosowano tryb monitorowania wybranych jonów (SIM, ang. *Selected Ion Monitoring*)

Tabela 2 Jony molekularne (m/z) oraz fragmentacyjne badanych farmaceutyków

ZWIĄZEK	Paracetamol (ESI ⁺)	Diklofenak (ESI ⁻)	Ibuprofen (ESI ⁻)
Jon molekularny	152,07	294,01	205,13
Jony fragmentacyjne	110,1/65,1	250,0/214,0	161,1/119,1

Do obsługi obu systemów zastosowano odpowiednio program Chromeleon 6.80 (LC) oraz Compass 1.3 micrOTOF control wersja 3.0 (MS). Całość zarządzana była za pomocą programu Hyphenation Star Application (HyStar) wersja 3.2. Do opracowywania wyników analiz LC-MS używano oprogramowania: HyStar PostProcessing i Data Analysis 4.0 SP5.

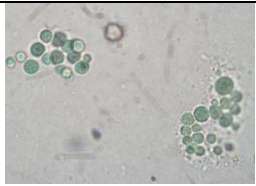
3.3. Procedura pracy z testowanymi mikroorganizmami.

3.3.1. Badane gatunki i hodowla cyjanobakterii.

Komórki sinic inkubowano w sterylnych kolbach Erlenmayera o pojemności 100 ml i 250 ml, odpowiednio dla gatunków słodkowodnych i halofilnych (słonowodnych), zamkniętych biokorkami umożliwiającymi wymianę gazową, jednocześnie nieprzepuszczającymi mikro- i makroorganizmów. Kolby trzymane w zamkniętym pomieszczeniu w temperaturze $25 \pm 1^\circ\text{C}$, przy oświetleniu 1050 luksów, z zastosowaniem fotoperiodu dzień/noc (16:8). Hodowle prowadzono w optymalnych dla sinic pożywkach: BG11 dla gatunków słodkowodnych oraz MSp dla gatunków halofilnych (skład pożywek przedstawiono w Tabelach S1 i S2, w Suplemencie). Wszystkie prace związane z hodowlami prowadzono warunkach aseptycznych pod komorą laminarną.

W niniejszej pracy zastosowano trzy gatunki sinic, których poszczególne parametry opisano w Tabeli 4. Gatunki te zostały pozyskane z kolekcji Katedry Farmacji i Chemii Ekologicznej Uniwersytetu Opolskiego.

Tabela 3 Zestawienie podstawowych informacji o testowanych gatunkach cyjanobakterii.

SKRÓT	NAZWA GATUNKU	UWAGI	ZDJĘCIE
CCALA 007	<i>Anabaena</i> sp.	słodkowodna	
CCALA 049	<i>Chroococcidiopsis thermalis</i>	słodkowodna	
Sp / PCC 9438	<i>Arthrospira platensis</i>	halofilna	

3.3.2. Hodowle zachowawcze i przygotowanie inokulum

Hodowle zachowawcze sinic prowadzono w optymalnej do ich rozwoju pożywce (Suplement, Tab. S1 i S2), w temperaturze $25 \pm 1^\circ\text{C}$, z zastosowaniem zmiennego oświetlenia (fotoperiod 16h:8h, światło:ciemność). Cyjanobakterie inkubowano w sterylnych kolbkach Erlenmayera 100 cm³ lub 250 cm³ (odpowiednio dla gatunków słodkowodnych i halofilnych), zamkniętych korkiem umożliwiającym wymianę gazową. Co trzy tygodnie komórki przeszczepiano przenosząc 10 cm³ zawiesiny trzytygodniowej hodowli do 30 cm³ lub 50 cm³ świeżej pożywki (odpowiednio dla gatunków słodkowodnych i halofilnych).

3.3.3. Przygotowanie i prowadzenie hodowli eksperymentalnych

Hodowle eksperymentalne prowadzono w takich samych warunkach oświetlenia i temperatury jak hodowle zachowawcze. Zmianą była modyfikacja pożywki, w której rozwijały się sinice, poprzez dodanie odpowiedniej ilości testowanego farmaceutyku, a w niektórych przypadkach także usunięcie związków zawierających węgiel. Ze względu na hydrofobowy charakter diklofenaku i ibuprofenu, obie te substancje przed dodaniem do pożywki rozpuszczano w acetonie, który nie miał istotnego wpływu na rozwój cyjanobakterii.

Inokulum komórek przygotowano poprzez odwirowanie trzytygodniowej hodowli zachowawczej (5min przy 5000 obr./min), a następnie zawieszenie komórek w pozostawionych 5 ml pożywki. Ilość inokulum niezbędne do hodowli wyznaczano w następujący sposób: Do odpowiedniej ilości medium hodowlanego, która wynosiła 30 ml dla gatunków słodkowodnych lub 50 ml dla gatunków halofilnych, dodano 200 µl zagęszczonych komórek. Następnie zawartość chlorofilu określano metodą opisaną w rozdziale 3.3.5. Wyjściowe stężenie chlorofilu dla wszystkich hodowli eksperymentalnych (z wyłączeniem konsorcjów sinic) ustalono na poziomie 1mg/l. Objętość inokulum niezbędnego do dodania obliczano według następującego wzoru:

$$V_{inokulum}[\text{ul}] = \frac{200 [\text{ul}] \cdot 1 \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right]}{C_{\text{Chlorofilu}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right]} \quad (1)$$

Każdy eksperyment przeprowadzano co najmniej w trzech powtórzeniach, a dla każdego zestawu przygotowywano próbę kontrolną.

- Badania wpływu pojedynczych substancji na poszczególne gatunki słodkowodnych sinic

Na tym etapie badań analizowano, jak poszczególne farmaceutyki wpływają na dwa testowane gatunki słodkowodnych cyjanobakterii. W pożywce BG11 rozpuszczano odpowiednie ilości paracetamolu, diklofenaku lub ibuprofenu, aby uzyskać końcowe stężenie tych substancji wynoszące 30; 100 i 300 µM.

- Badanie wpływu mieszanin testowanych farmaceutyków oraz wykorzystanie konsorcjów cyjanobakterii

W kolejnym etapie badań zdecydowano się na bardziej realistyczne odwzorowanie warunków środowiskowych. Ze względu na fakt, że wody są zanieczyszczane różnymi typami leków, postanowiono przetestować wpływ mieszanin tych substancji na testowane gatunki sinic. Przygotowano dwa rodzaje mieszanin o końcowych stężeniach 100 μM i 300 μM , zawierające w równych proporcjach molowych (1:1:1) paracetamol, diklofenak i ibuprofen.

Zbadano również możliwość zastosowania konsorcjów, czyli połączenia różnych gatunków sinic w jednej hodowli, w procesie biosorpcji. W tym celu do pożywek zawierających mieszaniny badanych substancji dodawano w różnych proporcjach (1:1) komórki gatunku *Anabaena* sp. i *Chroococcidiopsis thermalis*, tak aby wyjściowe stężenie chlorofilu wynosiło 1 mg/l (oznaczone jako 7/49/(1)) lub 2 mg/l (oznaczone jako 7/49/(2)).

- Hodowle prowadzone przy ograniczonej dostępności węgla

Mając na uwadze potencjalne wykorzystanie testowanych ksenofarmaceutyków jako źródła węgla, postanowiono zbadać, jak brak składników zawierających węgiel, pochodzących bezpośrednio z pożywki BG11, wpłynie na rozwój sinic oraz efektywność biosorpcji. W tym celu przygotowano hodowle dla wybranych układów eksperymentalnych, nie dodając do pożywki związków zawierających węgiel (Suplement, Tab. S3 i S4). W eksperymentach kontrolnych zastosowano zubożałą pożywkę bez dodatku leku, a jako punkt odniesienia do oceny wpływu braku związków węgla użyto pożywki o pełnym składzie.

- Badania z nietoksycznym, halofilnym gatunkiem – *Arthrospira platensis*

Arthrospira platensis jest jednym z najbardziej znanych gatunków cyjanobakterii, wykorzystywanym w wielu dziedzinach przemysłu. Ze względu na potwierdzoną nietoksyczność tego gatunku, również w tym przypadku przeprowadzono testy zdolności do biosorpcji. Do badań wybrano następujące układy eksperymentalne: pojedyncze związki - paracetamol, diklofenak i ibuprofen - w stężeniu 300 μM oraz mieszaniny o stężeniach 300 μM i 1000 μM . Pożywka została również zmodyfikowana poprzez zubożenie jej o związki węgla, przy czym w tym układzie przygotowano hodowle zawierające pojedyncze leki w stężeniu 300 μM .

3.3.4. Kontrola wzrostu i metabolizmu sinic

Rzrost cyjanobakterii monitorowano przez cały okres hodowli (21 dni) poprzez pomiary stężenia chlorofilu w komórkach (metoda opisana w rozdziale 3.3.5) co 3-4 dni. Przrost chlorofilu wyrażano następnie jako współczynnik wzrostu (ang. *growth rate*).

- Oznaczanie stężenia chlorofili w komórkach

Ilość chlorofilu w komórkach określano spektrofotometrycznie stosując zmodyfikowaną metodę Aarona. Z hodowli pobierano 1000 µl zawiesiny komórek do probówek typu Eppendorf, a następnie wirowano przez 5 min z prędkością 13 000 obr./min. W kolejnym kroku odbierano 900 µl supernatanta znad osadu komórek i dodawano 900 µl metanolu. Próbkę wytrząsano przez 30 sekund, po czym inkubowano w ciemności przez 10 minut. Proces wytrząsania i inkubacji w ciemności powtarzano dwukrotnie. Po tym czasie próbki ponownie wirowano przez 5 min (13 000 obr./min), a następnie wykonywano pomiary spektrofotometryczne klarownego supernatanta przy długościach fali 645 i 663 nm. Stężenie chlorofilu wyrażone w mg/l, obliczano na podstawie wzoru Aarona:

$$C_{\text{Chlorofilu}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] = 20,2 \cdot A_{645} + 8,02 \cdot A_{663} \quad (2)$$

Współczynnik wzrostu [%] cyjanobakterii określono na podstawie porównania stężeń chlorofilu w czasie. Z zebranych danych, dla krzywych wzrostu, obliczono współczynnik nachylenia. Następnie otrzymane wartości przeliczono na procent, przyjmując nachylenie krzywej wzrostu próby kontrolnej jako 100%. Współczynnik wzrostu umożliwia czytelne przedstawianie zmian w rozwoju sinic na przestrzeni całego trwania eksperymentu.

Zmiany metaboliczne cyjanobakterii określono na podstawie ilościowej analizy barwników fotosyntetycznych (chlorofile, karotenoidy i fikobiliproteiny) w ostatnim dniu hodowli (21 dzień) w porównaniu do próby kontrolnej. Stężenie chlorofilu określono na metodą opisaną powyżej, natomiast stężenie pozostałych barwników wyznaczono w następujący sposób:

- Stężenie karotenoidów

Ilościową zawartość karotenoidów w komórkach oznaczano spektrofotometrycznie. W tym celu pobrano 1000 µl zawiesiny komórek, odwirowano przez 5 min z prędkością 13 000 obr./min, po czym odrzucono 900 µl supernatant. Do pozostałego osadu dodano 900 µl dimetyloformamidu (DMF). Próbkę wytrząsano przez 30 sekund, a następnie inkubowano w ciemności przez 10 minut. Czynność powtarzano dwukrotnie. Po ekstrakcji próbki odwirowano (5min, 13 000 obr./min), a następnie dokonywano pomiarów spektrofotometrycznych przy długości fali 461 i 664 nm. Całkowite stężenie karotenoidów obliczono według następującego wzoru:

$$C_{\text{Karotenoidów}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{l}} \right] = (A_{461} - (0,046 \cdot A_{664})) \cdot 4 \quad (3)$$

- Stężenie fikobiliprotein

Stężenie fikobiliprotein oznaczano również za pomocą spektrofotometrii UV-VIS. W tym celu pobierano 1500 µl zawiesiny komórek z hodowli, które wirowano przez 10 min w temperaturze 4°C przy prędkości 13000 obr./min. Następnie usuwano cały supernatant, a do pozostałych komórek

dodawano 150 µl glicerolu i inkubowano je przez 24h w temperaturze -11°C. Po tym czasie dodawano 1350 µl wody, próbki wytrząsano, a następnie odwirowywano przez 5 min z prędkością 13000 obr./min. Absorbancję klarownego supernatanta mierzono przy trzech długościach fali: 562, 615 i 652 nm. Stężenie poszczególnych fikobiliprotein oraz ich całkowitą zawartość obliczano przy użyciu następujących wzorów:

Fikocyjanina(PC)

$$C_{PC} \left[\frac{mg}{l} \right] = \frac{A_{615} - (0,472 \cdot A_{652})}{5,34} \cdot 1000 \quad (4)$$

Allofikocyjanina (APC)

$$C_{APC} \left[\frac{mg}{l} \right] = \frac{A_{652} - (0,208 \cdot A_{615})}{5,09} \cdot 1000 \quad (5)$$

Fikoerytryna (PE)

$$C_{PE} \left[\frac{mg}{l} \right] = \frac{A_{562} - 2,41 \cdot [C_{PC}] - 0,849 \cdot [C_{APC}]}{9,62} \cdot 1000 \quad (6)$$

Całkowita zawartość fikobiliprotein (PBP)

$$C_{PBP} \left[\frac{mg}{l} \right] = C_{PC} + C_{APC} + C_{PE} \quad (7)$$

3.4. Przygotowanie próbek do analizy

3.4.1. Wydzielenie pozostałości ksenofarmaceutyków z płynów pochodowlanych

Płyn pochodowlany oddzielono od komórek poprzez wirowanie przez 5 minut przy prędkości 5 000 obr./min. Następnie przygotowywano równe objętości płynu pochodowlanego (10 cm³), które zamrożono i liofilizowano. W kolejnym etapie z osadu pozostałego po liofilizacji ekstrahowano badane anality za pomocą 6 cm³ octanu etylu. Próbki były naprzemiennie wytrząsane przez 15 sekund, a następnie pozostawiane na 5 min. Proces powtarzano czterokrotnie. Supernatant pobierano znad osadu, przenoszono do szklanych probówek i zatężano w strumieniu azotu. Pozostały po odparowaniu osad rozpuszczano w 1 cm³ mieszaniny woda: metanol (1:1_{v/v}, czystość LC-MS) i przesączało przez filtr strzykawkowy (PTFE 22 µm) do fiolek z ciemnego szkła. Tak przygotowane próbki poddawano analizie LC-MS.

3.4.2. Izolacja badanych leków z powierzchni komórek, po procesie biosorpcji

Pozostałe po odwirowaniu (rozdział 3.4.1) komórki przenoszono do probówek Eppendorfa o pojemności 2 cm³, dodawano 1cm³ octanu etylu i wytrząsano na vorteksie przez 1 minutę. Następnie próbki odwirowywano (13 000 obr./min), roztwór znad osadu przenoszono do szklanej probówki,

a do osadu dodawano świeżą porcję octanu etylu. Procedurę przemywania komórek powtarzano trzykrotnie. Połączone ekstrakty odparowywano w strumieniu azotu, rozpuszczano w mieszaninie woda/metanol, a po przefiltrowaniu przenoszono do fiolek z ciemnego szkła.

3.4.3. Izolacja testowanych leków z wnętrza komórek

Pozostałe po przepłukaniu komórki (zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.4.2) przenoszono do świeżej porcji 5 cm³ octanu etylu. Tak przygotowane próbki poddawano działaniu ultradźwięków (ręczny homogenizator ultradźwiękowy Hielscher UP200HT 26 kHz, 200 W) przez 1 minutę, z 30-sekundową przerwą (amplituda 70%). Proces ten powtarzano trzykrotnie. Następnie roztwór ekstraktu oddzielano od komórek poprzez wirowanie przez 5 minut przy prędkości 13 000 obr./min. Supernatant znad osadu poddawano następnie takiej samej procedurze przygotowania do analizy LC-MS, jak opisano w punktach 3.4.1 i 3.4.2.

3.5. Przygotowanie próbek i wykonanie analiz za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM)

W przypadku zastosowania konsorcjów cyjanobakterii, pomiar chlorofilu odzwierciedlał łączny rozwój komórek obu gatunków. Metoda ta nie pozwala jednak na rozróżnienie, czy zmieniają się proporcje ilości komórek poszczególnych gatunków. Aby to ustalić, po zakończeniu hodowli (po 21 dniach) komórki analizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Ze względu na specyfikę analizowanego materiału, próbki poddano odpowiedniej procedurze przygotowawczej. W tym celu odwirowywano (5 min, 13000 obr./min.) 1 cm³ zhomogenizowanej hodowli, usuwano cały supernatant, a osad komórek zawieszano w 1 cm³ 2% roztworu aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym, pozostawiając na 24 godziny w temperaturze 4°C. Po tym czasie, po uprzednim odwirowaniu, usuwano roztwór aldehydu i trzykrotnie przepłukiwano komórki porcjami 1 cm³ buforu fosforanowego. W kolejnym etapie próbki odwadniano, inkubując je w poszczególnych roztworach etanolu (60%, 70%, 80%) przez 30 minut. Następnie osad był liofilizowany. Po wysuszeniu komórki umieszczano na stoliku przeznaczonym do analizy SEM i trzykrotnie napyłano platyną, przy czym każde napylenie trwało 30 sekund. Po napyleniu, próbki umieszczano w skaningowym mikroskopie elektronowym i wykonywano analizy.

3.6. Badanie toksyczności wybranych układów płynów pohodowlanych wobec modelowych organizmów bezkręgowych i roślinnych

Do testów wybrano jeden gatunek z królestwa zwierząt - rozwielitkę (*Daphnia magna*) oraz dwóch przedstawicieli królestwa roślin - mikroalgi *Chlorella vulgaris* i *Haematococcus pluvialis*. Aby odgraniczyć ilość zmiennych zakłócających, takich jak produkcja toksyn przez niektóre sinice, w badaniach testowano tylko płyny pohodowlane halofilnej (słonowodnej) cyjanobakterii *Arthrospira platensis*, która nie wytwarza toksyn.

W tym celu hodowle po 21-dniowej inkubacji z różnymi układami eksperymentalnymi odwirowano z prędkością 5000 obr./min. przez 5 minut, aby oddzielić komórki od medium hodowlanego. Następnie oddzielony supernatant płynu pohodowlanego rozcieńczono w stosunku 1:4_{v/v} z wodą. Rozcieńczenie to miało na celu uniknięcie nadmiernego stresu u testowanych gatunków, ponieważ pożywka MSp zawiera bardzo wysokie stężenia soli nieorganicznych.

3.6.1. Hodowle bezkręgowca

Do testów na zwierzętach wybrano słodkowodnego skorupiaka *Daphnia magna* (rozwieltka), który jest jednym z modelowych organizmów zwierzęcych wykorzystywanych w badaniach toksyczności. Jego wybór wynika z łatwości obserwacji zmian zachodzących w jego rozwoju oraz braku prawnych ograniczeń w prowadzeniu badań na tym organizmie. Osobniki użyte w testach pozyskano ze sklepu zoologicznego, gdzie sprzedawane są jako żywa karma. Po zakupie rozwieltki odsączano z pożywki, w której były przechowywane, a następnie selekcionowano żywe osobniki. Odsączoną pożywkę rozcieńczano wodą destylowaną w stosunku 1:1 i przenoszono do zlewek, do których następnie umieszczano wyselekcjonowane, żywe osobniki. *Daphnie* karmiono co dwa dni sproszkowanym preparatem zawierającym liofilizowane komórki *A. plastensis* i liofilizowane drożdże piekarskie w stosunku 1:1_{w/w}. Zlewki z rozwieltkami inkubowano w temperaturze 25 ± 1°C w fotoperiodzie 16:8. Po tygodniowej aklimatyzacji, losowo wybierano po 50 osobników z hodowli zachowawczej i przenoszono do zlewek, w których znajdował się odpowiednio przygotowany płyn pohodowlany z cyjanobakterii. *Daphnie* inkubowano w tej pożywce przez 7 dni w takich samych warunkach jak hodowle zachowawcze, z takim samym cyklem karmienia. Eksperymenty prowadzono w trzech powtórzeniach. Po tygodniu zliczano ilość żywych osobników w każdym powtórzeniu i układzie. Wybranym osobnikom zmierzono również tętno, poprzez zliczanie uderzeń serca pod mikroskopem optycznym (powiększenie 40x). Dane przetworzono statystycznie. Dodatkowo wykonano zdjęcia mikroskopowe wybranych osobników.

3.6.2. Hodowle mikroalg

Do testów toksyczności na roślinach wybrano dwa gatunki mikroalg: *Chlorella vulgaris* i *Haematococcus pluvialis*. Oba gatunki zostały pozyskane z kolekcji organizmów Katedry Farmacji i Chemii Ekologicznej Uniwersytetu Opolskiego, która zakupiła oba organizmy w Kolekcja Kultur Organizmów Autotroficznych Instytutu Botaniki Czeskiej Akademii Nauk w Trzeboniu (CCALA). Mikroalgi hodowano w sterylnych kolbach Erlenmayera. Procedura zakładania hodowli i oznaczania stężenia chlorofilu w komórkach była identyczna z metodą stosowaną przy hodowlach cyjanobakterii, co zostało opisane w rozdziale 3.3.5. Komórki z hodowli zachowawczej odwirowywano, a następnie na podstawie pomiaru chlorofilu, ustalono ilość inokulum komórkowego potrzebną do uzyskania wyjściowego stężenia 1 mg/l w hodowlach eksperymentalnych. Następnie odpowiednią ilość komórek dodano do 50 ml mieszaniny płynu pohodowlanego i wody (1:4; v/v) i inkubowano w sterylnych

warunkach przez dwa tygodnie ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperiod 16:8), mierząc stężenie chlorofilu w komórkach, odpowiednio w dniu 4, 7, 10 i 14. Wszystkie próby wykonano w trzykrotnym powtórzeniu.

Tabela 4 Identyfikator (skrót), nazwa oraz zdjęcia mikroskopowe organizmów, na których testowano toksyczność płynów pochodzących z *A. platensis*.

Skrót	Nazwa gatunku	Zdjęcie mikroskopowe
DM	<i>Daphnia magna</i>	
Ch. V. H 1955	<i>Chlorella vulgaris</i>	
358 (Hp)	<i>Haematococcus pluvialis</i>	

4. Prezentacja i dyskusja wyników

4.1. Optymalizacja metody analitycznej oznaczania badanych farmaceutyków

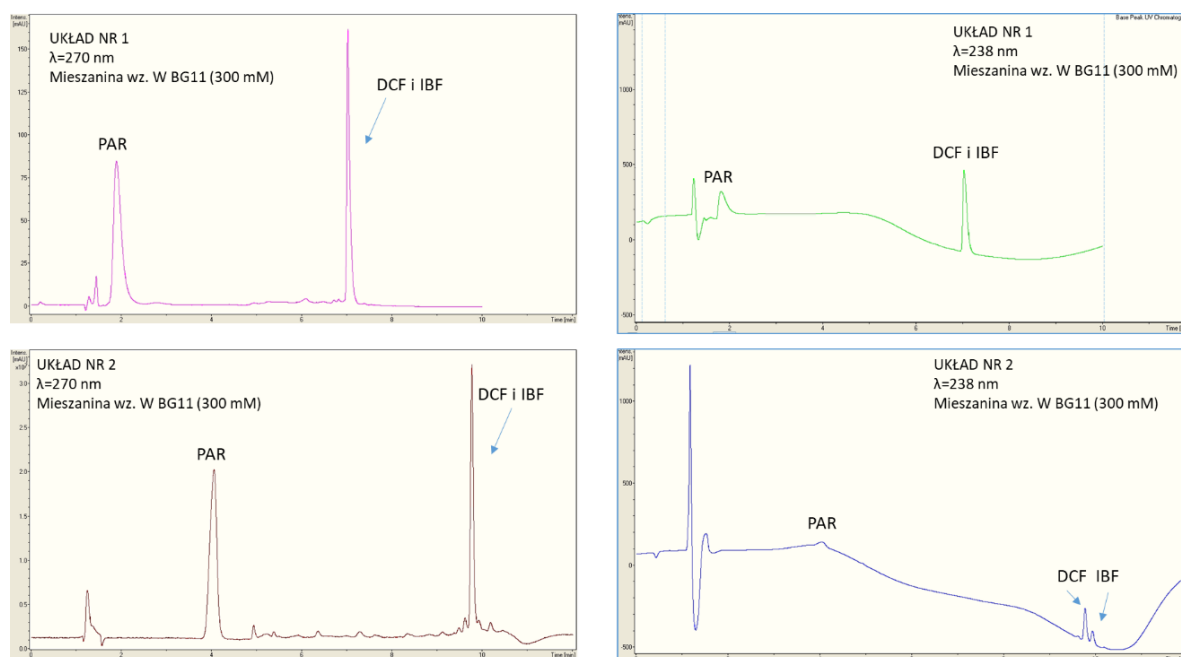
Jedną z metod oceny efektywności biosorpcji substancji jest analiza ich stężenia w danej matrycy po procesie oczyszczania oraz porównanie wyników z próbą kontrolną. W związku z tym, na początkowym etapie badań, opracowano metodę rozdzielania i detekcji testowanych leków: paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu. Biorąc pod uwagę fizykochemiczne właściwości badanych związków oraz matrycy, z której były ekstrahowane, zdecydowano się na zastosowanie techniki chromatografii cieczowej. Optymalizacja obejmowała kilka kluczowych kroków: wybór i ustalenie warunków detekcji, skład fazy ruchomej, prędkość przepływu oraz dobór odpowiedniego rozpuszczalnika dla analizowanych próbek. Szczegóły poszczególnych etapów opisano poniżej.

Każdy z oznaczanych związków zawierał wiązania podwójne, dzięki temu teoretycznie mógł być bezpośrednio wykrywany przez detektor UV, bez potrzeby derywatyzacji. Ponadto, dużym wyzwaniem była zróżnicowana polarność testowanych leków ($\log P$ od 0,46 do 4,51), co sprawiło, że próby zastosowania elucji izokratycznej nie przyniosły zamierzonych rezultatów. Przetestowano różne konfiguracje fazy ruchomej, wykorzystując acetonitryl (A), wodę (B) oraz metanol (C), z dodatkiem kwasu mrówkowego w stężeniu od 0,00% do 0,5 %, i/lub mrówczanu amonu (stężenie 0,0 -1,0 mM). Ostatecznie opracowano dwie procedury analityczne w trybie elucji gradientowej. Rozdzielanie analitów z wykorzystaniem Metody nr 1 odbywało się na kolumnie Accucore C18 (2,1 x 100 mm), natomiast w Metodzie nr 2 stosowano kolumnę Gemini NX-C18 (2,1 x 100 mm). Szczegóły dotyczące poszczególnych parametrów rozdzielania LC opisano w Tab. nr 5.

Tabela 5 Warunki rozdzielania chromatograficznego dla dwóch opracowanych metod analitycznych.

METODA 1 (Accucore C18 (2,1 x 100 mm), przepływ 0,3 ml/min)									
Czas [min]	0	1	3	6	8	10			
[%] Rozpuszczalnik A: MeCN	10	10	50	50	10	10			
[%] Rozpuszczalnik B: roztwór 0,1 mM HCOONH ₄ i 0,1% HCOOH w H ₂ O	80	80	0	0	80	80			
[%] Rozpuszczalnik C: MeOH	10	10	50	50	10	10			
METODA 2 (Gemini NX-C18 (2,1 x 100 mm), przepływ 0,3 ml/min)									
Czas [min]	0	2	3	4	5	6	7	8	12
[%] Rozpuszczalnik A: MeCN	3	25	25	30	30	50	50	3	3
[%] Rozpuszczalnik B: 0,2% HCOOH w H ₂ O	95	50	50	40	40	5	5	95	95
[%] Rozpuszczalnik C: MeOH	2	25	25	30	30	45	45	2	2

Poniżej na Rys. 8 przedstawiono przykładowe chromatogramy uzyskane z analizy mieszaniny oznaczanych analitów w medium hodowlanym BG11 przy zastosowaniu optymalnych warunków rozdzielania poszczególnych metod LC.

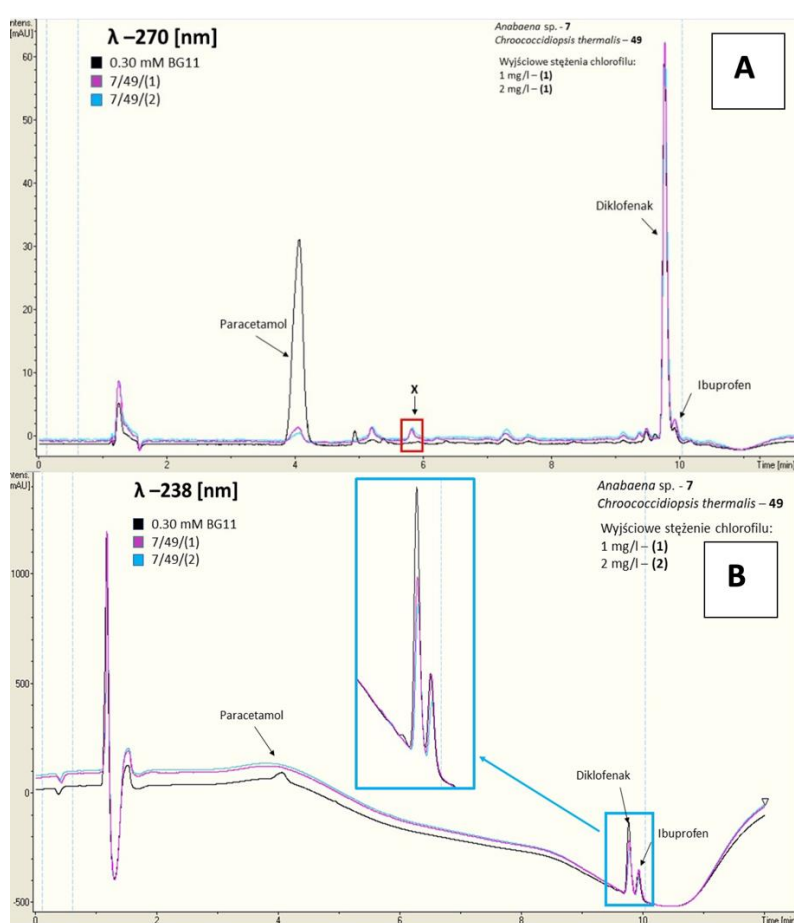


Rysunek 8 Zestawienie chromatogramów mieszaniny poszczególnych analitów przy zastosowaniu optymalnych warunków opracowanych metod LC. Stężenie analizowanych związków wynosiło 300 μ M. Matryca: BG11

Jak można zauważyć w przypadku Metody 1 i 2, paracetamol i diklofenak dawały silną odpowiedź przy długościach fali 270 nm, jednak wysoka intensywność pików dla diklofenaku maskowała pik pochodzący od ibuprofenu, co uniemożliwiało jego detekcję w mieszaninie. Dopiero przy długości fali 238 nm stosując układ nr 2 DCF i IBF były dobrze rozdzielone, jednak intensywność ich pików była niska, co utrudniało ich detekcję na poziomie śladowym. Dlatego w badaniach głównym detektorem był spektrometr masowy (Q-TOF), wspierany przez detektor UV w systemie on-line. Taki układ pozwalał na skuteczną identyfikację testowanych związków w złożonej matrycy biologicznej, jaką stanowią płyny pochowane cyjanobakterii. Mając na uwadze budowę chemiczną analizowanych farmaceutyków, paracetamol oznaczano w trybie jonów dodatnich (ESI+), zaś ibuprofen i diklofenak w trybie jonów ujemnych (ESI-). W przypadku próbek zawierających mieszaninę tych związków każda próbka była analizowana w obu trybach.

Przed omówieniem całosciowych wyników przeprowadzonych analiz, poniżej przedstawiono kilka przykładowych chromatogramów, aby zilustrować sposób zbierania danych do dalszych badań. Na Rys. 9 zaprezentowano nałożone na siebie chromatogramy z prób eksperymentalnych, w których konsorcja komórek cyjanobakterii były inkubowane z mieszaniną testowanych związków o finalnym stężeniu 300 μ M. W tym przypadku stosowano metodę nr 2. Krzywa elucji oznaczona kolorem czarnym przedstawia próbę kontrolną, czyli pożywkę BG11 z dodatkiem testowanych farmaceutyków, ale bez inkubacji z komórkami. Zarówno w przypadku tej próby, jak i dwóch pozostałych chromatogramów

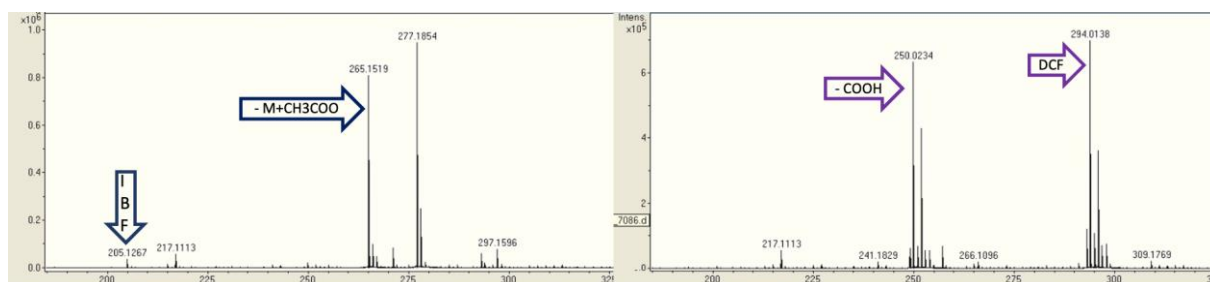
oznaczonych kolorem fioletowym (inkubacja z komórkami konsorcjum 1 mg/l) oraz niebieskim (inkubacja z komórkami konsorcjum 2 mg/l), zarejestrowanych przy długości fali 270 nm, widoczne są wyraźne dwa piki pochodzące od diklofenaku oraz paracetamolu. Dopiero detekcja przy długości fali $\lambda=238$ nm pozwala na skuteczne wykrycie ibuprofenu. Jakkolwiek poziom detekcji jest zdecydowanie gorszy w porównaniu do detekcji przy $\lambda=270$. Analizując zestawione chromatogramy widać znaczący ubytek paracetamolu z medium pochodowlanego. Zanik sygnału od paracetamolu był szczególnie wyraźny, co potwierdza zdolność obu badanych mikroorganizmów do biosorpcji tego związku z medium pochodowlanego. Ciekawym spostrzeżeniem było wykrycie nieznanej substancji w $t_r=5,8$ min, co może świadczyć o obecności albo metabolitów testowanych związków lub ewentualnych produktów metabolizmu sinic, powstających w odpowiedzi na działanie czynników stresowych,



Rysunek 9 Zestawienie chromatogramów z analizy ekstraktów 21-dniowych płynów pochodowlanych przy długości fali 270 nm (A) oraz 238 nm (B). Kolorem fioletowym oznaczono próbę z konsorcjum cyjanobakterii o wyjściowym stężeniu chlorofilu 1 mg/l, a kolorem niebieskim – o stężeniu 2 mg/l. Próbę kontrolną oznaczono kolorem czarnym. Czerwoną ramką zaznaczono sygnał pochodzący od nieznanej substancji.

Niezależnie od opracowanej metody rozdzielania testowanych leków w medium pochodowlanym i ich detekcji w zakresie promieniowania ultrafioletowego, aby uzyskać pełną pewność co do oznaczanych substancji, konieczne było zastosowanie detekcji przy pomocy techniki spektrometrii mas. W przypadku paracetamolu, jak wspomniano w części eksperymentalnej (rozdział 3.2), zastosowano jonizację dodatnią. W widmie masowym paracetamolu szczególnie widoczny był sygnał jonu

molekularnego m/z 152,07. Dla dwóch pozostałych związków spektrometr mas pracował w trybie jonizacji ujemnej, co umożliwiło ich dokładne rozróżnienie, nawet w przypadku nakładania się sygnałów w detektorze UV. W przypadku diklofenaku najbardziej intensywne sygnały pochodziły od jonu molekularnego m/z : 294,01 oraz jonu fragmentacyjnego, powstającego w wyniku utraty grupy karboksylowej (m/z 250,02). W przypadku ibuprofenu sygnał pochodzący od piku molekularnego (m/z 205,12) miał niską intensywność, natomiast wyraźnie widoczny był sygnał od adduktu tego jonu z resztami kwasowymi, pochodzącymi z buforu fazy ruchomej, który dominował na widmie masowym.



Rysunek 10 Widma masowe ibuprofenu (po lewej) i diklofenaku (po prawej) z zaznaczonymi jonami molekularnymi oraz fragmentacyjnymi lub właściwym adduktem

Przedstawione dane pokazują, że opracowana metoda nr 2 pozwalała zarówno na określenie ubytku testowanych substancji oraz umożliwiała potwierdzenie obecności innych związków, które mogą być potencjalnymi metabolitami testowanych substancji lub metabolitami cyjanobakterii, których produkcja wzrasta pod wpływem oddziaływania ksenofarmaceutyków (środowiskowych czynników stresogennych). Obie metody poddano procesowi walidacji biorąc pod uwagę istotne cechy metody w tym: liniowość, dokładność, precyzję, odtwarzalność oraz wpływ efektu matrycowego. Opracowana metoda charakteryzowała się odpowiednią liniowością dla oznaczeń analitycznych (współczynnik determinacji $>0,995$, dla wszystkich związków) w badanym zakresie stężeń oraz dobrą precyzją (0,7-10,0% RSD).

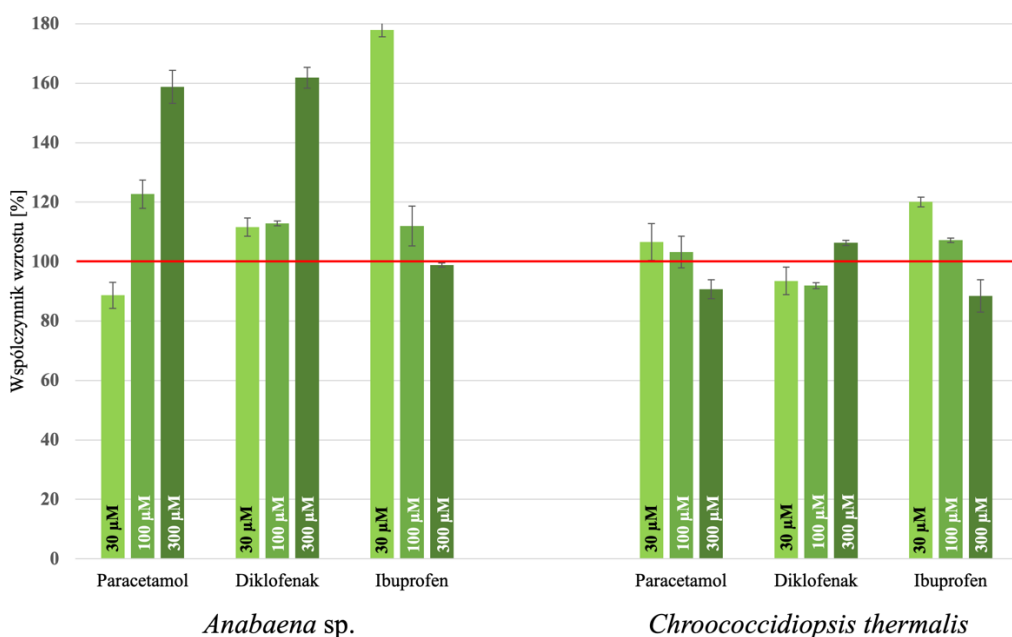
Korzystając z opracowanych metod analitycznych uzyskano zestaw danych, które porównując do prób odniesienia (pożywki z testowanym związkiem lub ich mieszaninami), użyto do wyliczenia procentowego ubytku badanych substancji z płynów pochodzących oraz ilości leków zaadsorbowanych na powierzchni komórek lub przetransportowanych do wnętrza komórki. Wyniki te, wraz z danymi dotyczącymi stężeń pigmentów, zestawiono i opisano w kolejnym podrozdziale.

4.2. Odpowiedź cyjanobakterii na obecność testowanych leków oraz ich zdolność do biosorpcji ksenofarmaceutyków.

Mając opracowaną metodę analityczną do oznaczania badanych leków w matrycy, którą stanowiły płyny pochodzące, rozpoczęto eksperymenty, w których badano wpływ tych farmaceutyków na wybrane gatunki cyjanobakterii, oceniając równolegle skuteczność ich usuwania z medium hodowlanego oraz zdolność adsorpcji na powierzchni komórek mikroorganizmów.

4.2.1. Wpływ testowanych substancji na wzrost wybranych gatunków cyjanobakterii

W badaniach nad wpływem testowanych farmaceutyków na rozwój sinic zaobserwowano znaczące różnice pomiędzy dwoma badanymi gatunkami (Rys. 11). *Anabaena* sp. wykazywała wyraźną reakcję na wszystkie trzy badane leki, z których większość powodowała przyspieszenie jej rozwoju. Szczególnie interesujące wyniki uzyskano przy najwyższych stężeniach paracetamolu i diklofenaku (300 μ M), gdzie zaobserwowano wzrost o około 60%. Natomiast ibuprofen w stężeniu 30 μ M wywołał silną stymulację wzrostu, sięgającą około 80%. Tę interesującą zależność można wyjaśnić tym, że w odpowiedzi na silniejszy czynnik stresowy komórki sinic uruchamiają dodatkowe mechanizmy obronne, co prowadzi do przyspieszenia tempa wzrostu hodowli. Najsilniejsze działanie wykazał ibuprofen, który znacząco stymulował wzrost *Anabaena* sp., ale tylko przy stężeniu 30 μ M. Z kolei w przypadku gatunku *Chroococcidiopsis thermalis* zaobserwowano jedynie niewielkie odchylenia w stosunku do próby kontrolnej, które nie przekraczały 20%. W zależności od eksperymentu, wzrost cyjanobakterii był nieznacznie przyspieszony lub spowolniony, co sugeruje, że zmiana stężenia testowanych substancji nie miała istotnego wpływu na rozwój tego gatunku.



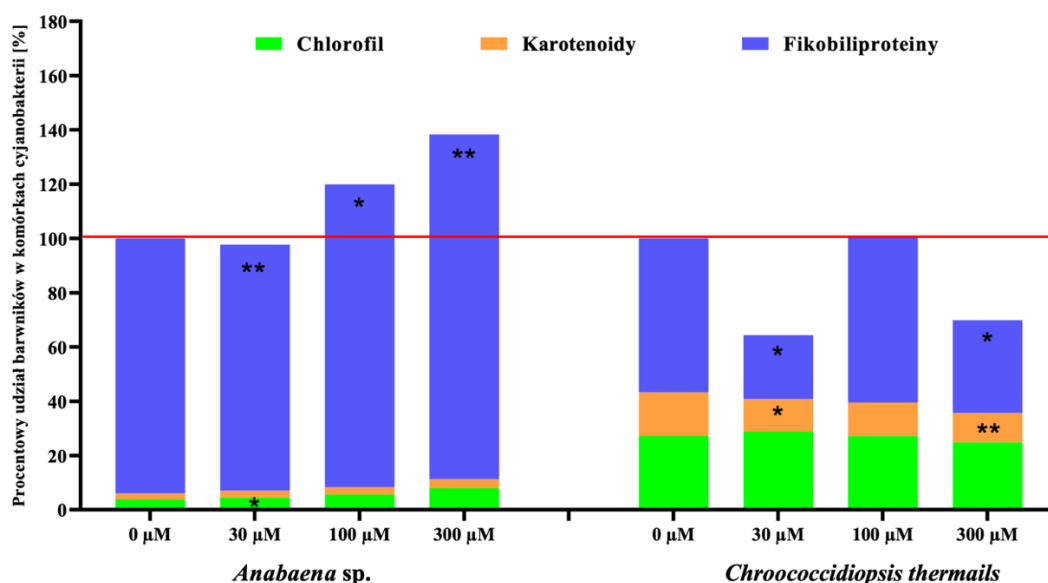
Rysunek 11 Współczynnik wzrostu dwóch badanych gatunków cyjanobakterii w odpowiedzi na rosnące stężenia trzech testowanych leków. Czerwona linia (100%) reprezentuje wzrost w próbie kontrolnej (n=3; RSD < 10%).

Różnice w reakcji obu gatunków wynikają z odmiennych sposobów radzenia sobie ze stresem. *Anabaena* sp. to gatunek, który występuje w toni wodnej, co zapewnia mu stabilne warunki sprzyjające rozwojowi. W obliczu stresu szybko reaguje, intensyfikując swój rozwój [Kumar, 1982; Nicolaisen, 2009; Sinha, 1996; Sneha, 2023]. Natomiast *Chroococcidiopsis thermalis* który żyje w wilgotnych środowiskach lądowych, często tylko okresowo zalewanych wodą (np. na pustyniach), wykształcił zdolność okresowego rozwoju w sprzyjających warunkach, a w niekorzystnych potrafi znacznie spowolnić lub nawet zatrzymać metabolizm [Aguiló-Nicolau, 2023; Baldanta, 2023; Fais, 2024].

Uzyskane wyniki potwierdzają, że choć oba gatunki reagują na testowane substancje jako czynniki stresowe, różnią się w sposobach radzenia sobie z tym stresem.

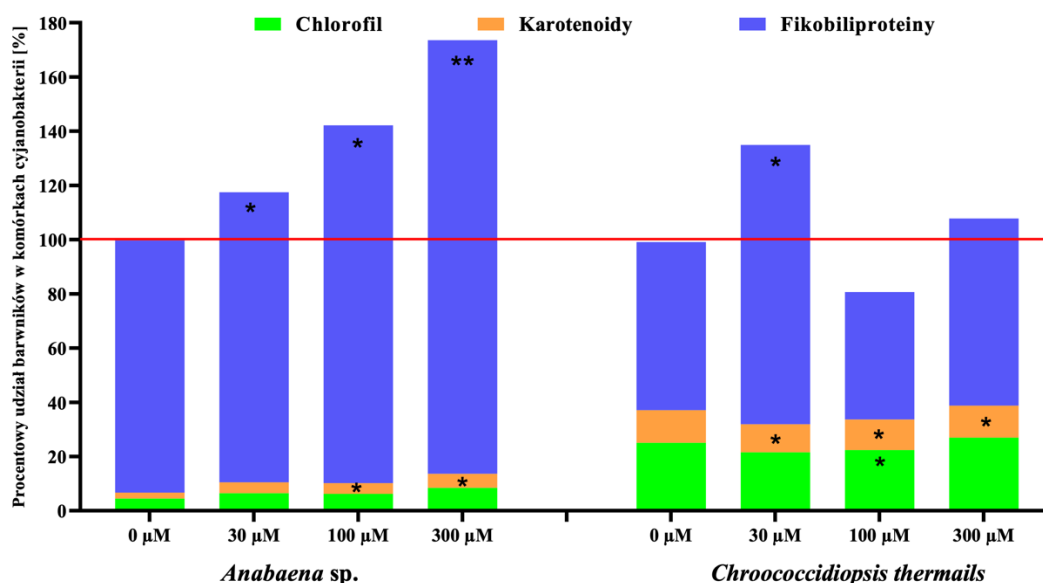
4.2.2. Zmiany metaboliczne w komórkach badanych organizmów wywołane działaniem pojedynczej substancji

Aby lepiej zrozumieć zmiany metaboliczne zachodzące w komórkach badanych gatunków cyjanobakterii, porównano stężenia poszczególnych barwników fotosyntetycznych. Wyniki tego porównania zostały zaprezentowane na poniższym wykresie (Rys. 12).



Rysunek 12 Zmiany metaboliczne w komórkach dwóch badanych słodkowodnych gatunków cyjanobakterii, przedstawione jako proporcje pigmentów fotosyntetycznych po 21 dniach ekspozycji na różne stężenia paracetamolu. Gwiazdki wskazują poziomy istotności statystycznej: $0,05 < p$; $* 0,0021 < p < 0,05$; $** p < 0,0021$, ($n=3$; $RSD < 10\%$).

W przypadku gatunku *Anabaena sp.*, zmiany stężenia pigmentów fotosyntetycznych, w szczególności fikobiliprotein, były pozytywnie skorelowane ze współczynnikiem wzrostu tych sinic w obecności paracetamolu. Wyjątkiem była próba ze stężeniem 30 µM, odnotowano statystycznie istotne ograniczenie produkcji barwnych białek. Odminną zależność zaobserwowano dla gatunku *Chroococcidiopsis thermalis*, gdzie jedynie stężenie 100 µM nie wykazały istotnych zmian w zawartości pigmentów. Natomiast przy pozostałych stężeniach paracetamolu zaobserwowano statystycznie istotny spadek zarówno karotenoidów, jak i fikobiliprotein. Nie odnotowano natomiast analogicznych zmian w stężeniu chlorofilu, co może sugerować, że ten barwnik nie odgrywa kluczowej roli w ochronie tego gatunku przed zanieczyszczeniami. Podobną zależność potwierdzono także w przypadku niektórych związków boronowych, które także testowano jako czynnik stresowy [Niemczyk, 2020].

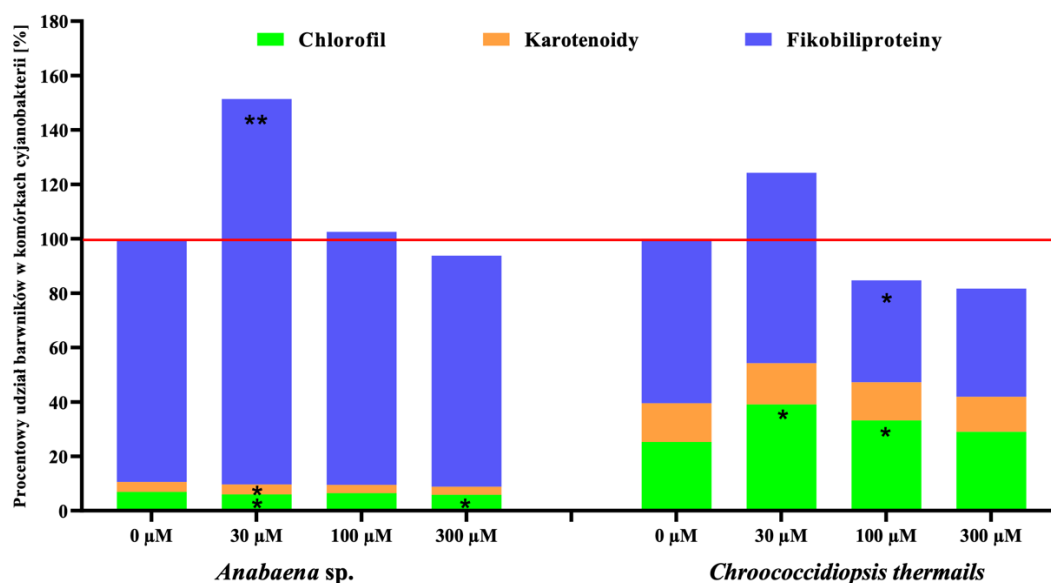


Rysunek 13 Zmiany metaboliczne w komórkach dwóch badanych słodkowodnych gatunków cyjanobakterii, wyrażone jako proporcje pigmentów fotosyntetycznych po 21 dniach ekspozycji na wybrane stężenia diklofenaku. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej, odpowiednio: 0,05 < p; * 0,0021 < p < 0,05; ** p < 0,0021, (n=3; RSD < 10%).

Diklofenak wywierał znacznie silniejszy wpływ na biosyntezę pigmentów fotosyntetycznych w komórkach sinic, w porównaniu do paracetamolu (Rys. 13). W przypadku *Anabaena sp.* już przy najniższym stężeniu (30 µM) zaobserwowano stymulację biosyntezy fikobiliprotein, a przy wyższych stężeniach (100 i 300 µM) doszło również do statystycznie istotnego wzrostu produkcji karotenoidów. Z kolei w komórkach *Chroococcidiopsis thermalis* spadek pigmentów fotosyntetycznych stwierdzono tylko przy stężeniu 100 µM, natomiast w pozostałych próbach nie odnotowano zmian w porównaniu do kontroli. Zaledwie w dwóch stężeniach wykazano statystycznie istotny wzrost produkcji barwników.

Na podstawie tych obserwacji można wnioskować, że chociaż diklofenak nie wpłynął znacząco na ogólny rozwój sinic, w porównaniu do paracetamolu, to znacząco zmieniał proporcje pigmentów fotosyntetycznych w komórkach obu badanych gatunków.

W przypadku ibuprofenu zaobserwowano wyraźną zależność między jego stężeniem, a metabolizmem obu testowanych gatunków cyjanobakterii (Rys. 14). W komórkach badanych mikroorganizmów nastąpił wzrost biosyntezy pigmentów przy najniższym stężeniu (30 µM), natomiast przy wyższych stężeniach zaobserwowano spadek ilości barwników. Szczególnie interesujące wyniki uzyskano w przypadku *Chroococcidiopsis thermalis*, gdzie najniższe stężenie ibuprofenu stymulowało biosyntezę fikobiliprotein, co jest wynikiem odmiennym w porównaniu do innych testowanych leków. Prawdopodobnie może to być związane z rolą tych białek jako istotnych czynników przeciwdziałających stresowi. Wskazuje również na to fakt, że spośród trzech badanych związków ibuprofen wykazywał najsilniejsze działanie toksyczne na badane gatunki.



Rysunek 14 Metaboliczne zmiany w komórkach dwóch testowanych słodkowodnych gatunków cyjanobakterii, wyrażone jako proporcje pigmentów fotosyntetycznych po 21 dniach ekspozycji na różne stężenia ibuprofenu. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej, odpowiednio: $0,05 < p$; * $0,0021 < p < 0,05$; ** $p < 0,0021$, ($n=3$; $RSD < 10\%$).

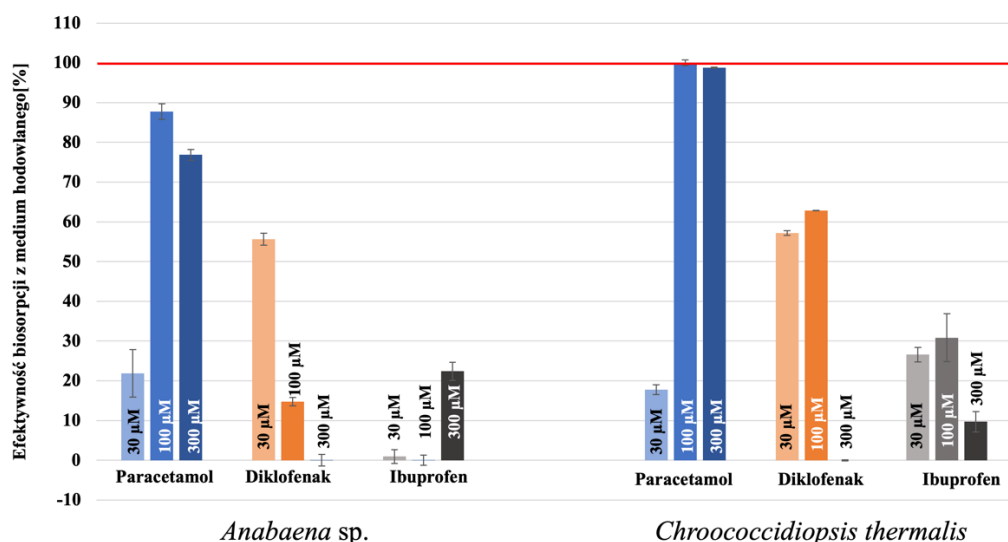
Podsumowując można stwierdzić, że wszystkie testowane ksenofarmaceutyki wywierały istotny wpływ na metabolizm badanych gatunków cyjanobakterii. Na szczególną uwagę zasługują zmiany metaboliczne zaobserwowane u *Chroococcidiopsis thermalis*, gdzie wzrost barwników był mniej wyraźny, natomiast spadek udziału chlorofilu i karotenoidów, w niektórych przypadkach znaczący. Prezentowane wyniki dowodzą również jak istotną rolę w przeciwdziałaniu czynnikom stresowym odgrywają fikobiliproteiny, gdyż ich biosynteza była znacząca u obu gatunków, a szczególnie u *Anabaena sp.*.

4.2.3. Skuteczność biosorpcji poszczególnych ksenofarmaceutyków

4.2.3.1. Usuwanie leków z medium hodowlanego

Głównym celem niniejszego projektu była ocena skuteczności usuwania paracetamolu, diklofenaku oraz ibuprofenu z pożywek hodowlanych komórek *Anabaena sp.* i *Chroococcidiopsis thermalis*. W tym celu ekstrakty z medium hodowlanego i powierzchni komórek, pobrane po 21 dniach hodowli – analizowano za pomocą techniki LC-MS/MS. Próbkę kontrolną przygotowano w pożywce BG11 z określonymi stężeniami farmaceutyków. Na Rys.15 zaprezentowano skuteczność usuwania (biosorpcji) trzech testowanych farmaceutyków (paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu) przez oba testowane gatunki słodkowodnych cyjanobakterii. Otrzymane wyniki wykazały, że paracetamol był najskuteczniej usuwanym farmaceutykiem, zwłaszcza przez *Chroococcidiopsis thermalis*, który to gatunek wykazywał prawie 100% efektywność biosorpcji przy wszystkich testowanych stężeniach. *Anabaena sp.* również wykazywała wysoką efektywność biosorpcji paracetamolu, szczególnie przy wyższych stężeniach (100 µM i 300 µM). Koncentrując się jednak na szczegółach, szczególnie interesującym wydaje się być wynik dla stężenia 30 µM. Można przypuszczać, że w tej ilości

paracetamol wykazuje już pewne działania toksyczne wobec badanych sinic. Niemniej jednak, nie jest on jeszcze w stanie uruchomić odpowiednich mechanizmów obronnych w komórkach, które mogłyby przeciwdziałać jego wpływowi. Wnioski te potwierdzają wcześniejsze wyniki badań dotyczących wpływu paracetamolu na rozwój i metabolizm testowanych gatunków sinic. W przypadku *Anabaena* sp. zaobserwowano przecież nieznaczne spowolnienie wzrostu (rozdz. 4.2.1), podczas gdy gatunek *Chroococcidiopsis thermalis* nie wykazywał istotnych różnic w rozwoju. Również w zakresie zmian metabolicznych stężenie 30 μ M paracetamolu miało toksyczny wpływ. W komórkach *Anabaena* sp. zaobserwowano niewielkie, lecz statystycznie istotne zahamowanie biosyntezy fikobiliprotein i chlorofilu, natomiast w przypadku *Ch. thermalis* synteza pigmentów była najniższa dla stężenia 30 μ M w porównaniu do innych badanych stężeń paracetamolu (30; 100 i 300 μ M) po 21 dniach hodowli. Na podstawie powyższych obserwacji można stwierdzić, że najniższe stężenie paracetamolu (30 μ M) wykazuje toksyczne działanie na oba słodkowodne gatunki cyjanobakterii, co prowadzi do znacznego spadku efektywności biosorpcji tego związku z medium hodowlanego.



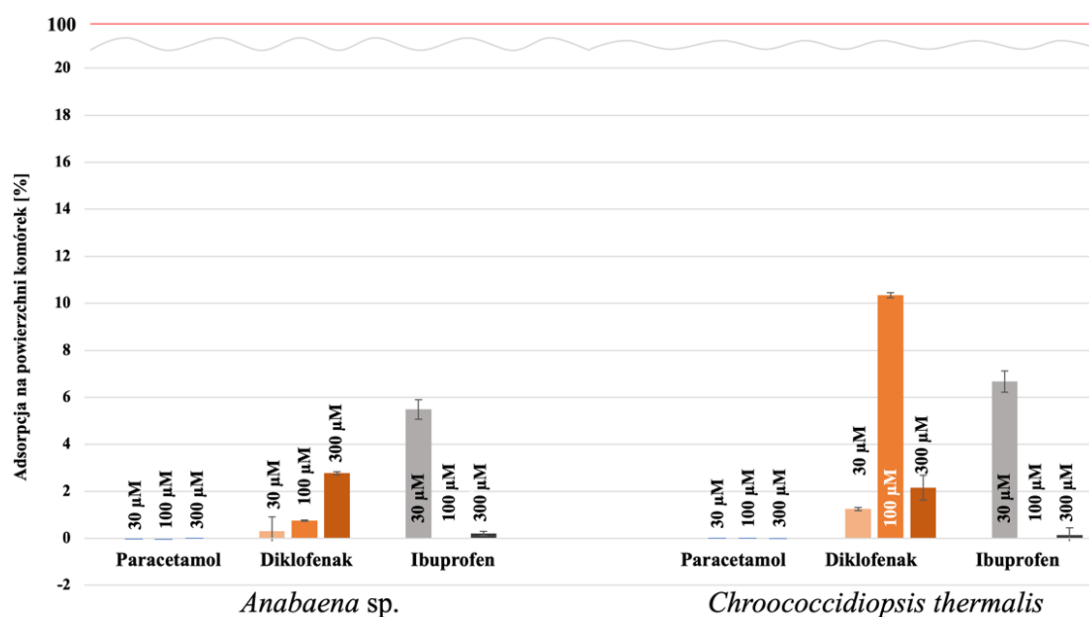
Rysunek 15 Efektywność biosorpcji poszczególnych ksenofarmaceutyków z medium pohodowlanego po 21 dniach hodowli. Czerwoną linią (100%) wskazuje całkowite usunięcie leku (n=9; RSD < 10%).

Kolejnym testowanym związkiem był diklofenak, który w przeciwieństwie do paracetamolu, jest związkiem hydrofobowy. W przypadku *Anabaena* sp. zaobserwowano również zależność efektywności biosorpcji od stężenia leku – efektywność malała wraz ze wzrostem stężenia ksenofarmaceutyku. Przy najwyższym z testowanych stężeń, efektywność usuwania diklofenaku nie przekraczała 5%. Podobne wyniki uzyskano w przypadku *Ch. Thermalis*. W odniesieniu do niższych stężeń *Chroococcidiopsis thermalis* usuwał diklofenak na podobnym poziomie, wynoszącym około 60%. Wyniki te są szczególnie interesujące w kontekście wpływu diklofenaku na rozwój i metabolizm komórek. Na uwagę zasługuje zwłaszcza *Chroococcidiopsis thermalis*, który to gatunek wykazywała umiarkowaną zdolność do biosorpcji diklofenaku, przy jednocześnie minimalnym wpływie tego związku na rozwój i metabolizm komórek w porównaniu do *Anabaena* sp.

Bardzo ciekawy efekt zaobserwowano w przypadku biosorpcji ostatniego z testowanych związków - ibuprofenu. Obydwa badane gatunki usuwały go w bardzo niskim stopniu nie przekraczającym 30%. Dodatkowo gatunek *Anabaena* sp. usuwał ten związek efektywnie dopiero przy najwyższym stężeniu (300 μ M) natomiast w przypadku *Chroococcidiopsis thermalis* skuteczność biosorpcji była lepsza, kiedy stężenie testowanego leku było niższe. W eksperymentach z *Anabaena* sp. zauważono, że dla stężeń, w których efektywność usuwania była najniższa, stymulacja wzrostu była najwyższa. Natomiast przy stężeniach, gdzie efektywność biosorpcji ibuprofenu była największa, rozwój komórek był znacząco zahamowany, co może sugerować silne działanie toksyczne ibuprofenu na *Anabaena* sp. W przypadku *Chroococcidiopsis thermalis*, jak wykazano wcześniej, gatunek ten zachowywał bardziej stabilne tendencje w obecności każdego z testowanych związków, zarówno pod względem zmian metabolicznych, jak i rozwoju. Dlatego też nie można jednoznacznie powiązać efektywności biosorpcji ibuprofenu z rozwojem i zmianami metabolicznymi w tym gatunku.

4.2.3.2. Adsorpcja leków na powierzchni komórek testowanych cyjanobakterii

W niniejszej pracy podkreślano już wielokrotnie, że przewaga zastosowania biosorbentów aktywnych, takich jak sinice, jest nie tylko ich zdolność do redukcji stężenia toksycznych związków, ale także możliwość ich metabolizowania przez komórki. Dlatego, po udowodnieniu, że obie słodkowodne gatunki sinic są w stanie usuwać części leków ze środowiska, w badaniach skupiono się na ocenie zdolności adsorpcji paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu przez dwa gatunki słodkowodnych cyjanobakterii: *Anabaena* sp. i *Chroococcidiopsis thermalis*. Wyniki przedstawiono na poniższym wykresie (Rys. 16) jako procent oznaczonych leków na powierzchni komórek stosowanych mikroorganizmów, w odniesieniu do początkowego stężenia leku w pożywce.



Rysunek 16 Efektywność adsorpcji poszczególnych testowanych substancji na powierzchni komórek cyjanobakterii. Linia falowaną rozgraniczono zmianę skali (n=9; RSD < 10%).

Paracetamol nie został zidentyfikowany w żadnym z analizowanych ekstraktów otrzymanych w etapie izolacji badanych leków z powierzchni komórek, po zakończeniu procesu biosorpcji. Bardzo niską adsorpcję na powierzchni komórek zaobserwowano również w przypadku ibuprofenu – jego ilości na powierzchni komórek wynosiła zaledwie 6%, przy inkubacji w pożywce zawierającej 30 μM tego ksenofarmaceutyku. Spośród trzech testowanych leków najlepiej adsorbowanym na powierzchni komórek testowanych gatunków cyjanobakterii był diklofenak, który został zidentyfikowany i oznaczony przy niemal każdym z badanych stężeń. Mimo że adsorpcja diklofenaku była wyraźniejsza niż pozostałych leków, wyniki te mogą sugerować ograniczoną zdolność cyjanobakterii do efektywnej adsorpcji tych związków na powierzchni komórek. Ale skoro sinice potrafią skutecznie usuwać leki z płynu hodowlanego, ale nie wykazują wyraźnej adsorpcji tych związków na powierzchni komórek, może to świadczyć o tym, że sinice są w stanie metabolizować te substancje. Brak lub niska adsorpcja na powierzchni może wskazywać na szybkie przetwarzanie i eliminację ksenobiotyków wewnątrz komórek, zamiast ich gromadzenia na powierzchni. Taka zdolność metabolizowania leków przez sinice mogłaby być ważną wskazówką do dalszych badań nad ich potencjałem w bioremediacji, co sugeruje, że mechanizmy związane z degradacją lub przekształceniem tych związków mogą zachodzić wewnątrz komórek.

Podsumowując, wyniki opisane w tym rozdziale mają kluczowe znaczenie, gdyż wykazano, że wszystkie trzy testowane farmaceutyki wywierają różny wpływ na metabolizm obu badanych gatunków słodkowodnych sinic, a ze względu na ich odmienną fizjologię, reakcje te nie są identyczne. *Anabaena* sp. wykazywał znacznie większą wrażliwość pod względem rozwoju i metabolizmu pod wpływem testowanych związków, co objawiało się przyspieszonym wzrostem oraz zwiększoną produkcją barwników fotosyntetycznych. Gatunek ten charakteryzował się także wysoką efektywnością usuwania (biosorpcji) paracetamolu i diklofenaku, przy jednoczesnej niskiej adsorpcji tych związków na powierzchni komórek. *Chroococcidiopsis thermalis* również wykazywał nieco wyższą skuteczność usuwania testowanych leków, ale nie tak wyraźne zmiany w metabolizmie. Potwierdzono także, że podobnie jak w badaniach na bakteriach heterotroficznych opisanych w literaturze, związki hydrofilowe, takie jak paracetamol, są preferencyjnie usuwane z medium hodowlanego, w porównaniu do hydrofobowych diklofenaku i ibuprofenu [Hasan, 2021; Żur, 2018].

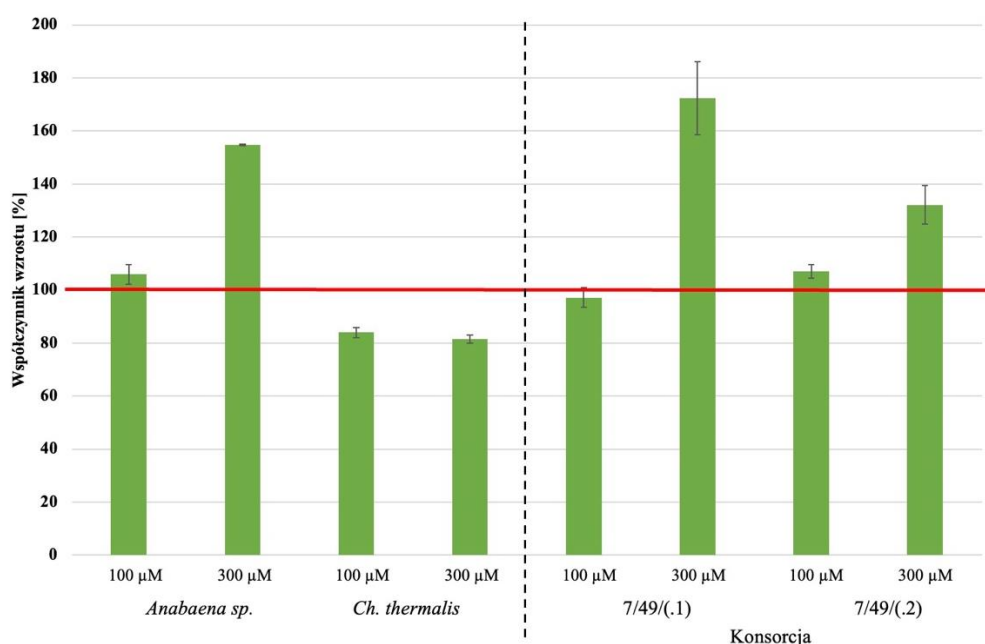
4.3. Ocena efektywności usuwania farmaceutyków przez cyjanobakterie w różnych warunkach (mieszaniny leków, konsorcja cyjanobakterii, pożywka pozbawiona w związki węgla)

Wyniki otrzymane z hodowli pojedynczych gatunków cyjanobakterii z każdym z oddzielna testowanym lekiem potwierdziły, że wykazują one wysoką wrażliwość oraz dobrą zdolność do ich usuwania z medium hodowlanego. Co istotne, w środowisku naturalny, farmaceutyki zwykle występują w postaci mieszanin, a nie pojedynczo. Dlatego w kolejnym etapie badań zdecydowano się dodać do hodowli mieszaninę badanych związków w końcowych stężeniach 100 oraz 300 μM , przy

równomolowym stosunku poszczególnych leków (1:1:1). W kolejnych eksperymentach sprawdzono także, czy możliwe jest połączenie zalet obydwu organizmów, aby lepiej wykorzystać ich właściwości biosorpcyjne. Do badań z konsorcjami w hodowlach zastosowano dwa wyjściowe stężenia chlorofilu. Pierwsze wynosiło sumarycznie 1mg/l, czyli tyle ile w przypadku eksperymentów, w których testowano pojedyncze gatunków. Drugie wynosiło 2mg/l, po 1 mg/l dla każdego gatunku. W każdym przypadku proporcje inokulum *Anabaena* sp. i *Chroococcidiopsis thermalis* wynosiły 1:1 (v:v).

4.3.1. Rozwój pojedynczych gatunków i ich konsorcjów w obecności mieszanin testowanych leków

Dane przedstawione na poniższym rysunku (Rys. 17) wskazują, że zastosowanie mieszaniny testowanych związków (paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu), w stężeniach 100 i 300 μM nie stanowiło dla badanych gatunków sinic istotnego ograniczenia w ich rozwoju. Zahamowanie wzrostu do około 80% w porównaniu do kontroli zaobserwowano u gatunku *Chroococcidiopsis thermalis*, przy obu testowanych stężeniach. Natomiast w przypadku *Anabaena* sp. przy wyższym stężeniu mieszaniny leków zaobserwowano wyraźną stymulację wzrostu.



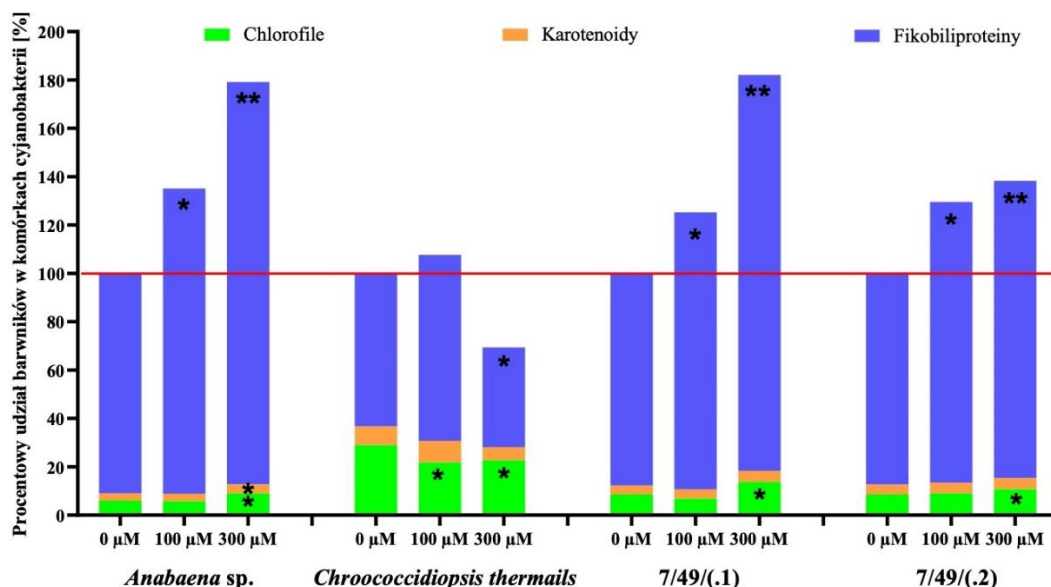
Rysunek 17 Rozwój pojedynczych gatunków słodkowodnych cyjanobakterii i ich konsorcjów w obecności mieszanin testowanych leków, (n=3; RSD < 10%)

Analogiczne wyniki uzyskano w przypadku zastosowania układów hodowlanych złożonych z konsorcjów testowanych słodkowodnych cyjanobakterii. Analizując powyższy wykres, można zauważyć, że komórki w konsorcjach wykazywały wyższą odporność na działanie mieszaniny ksenofarmaceutyków niż pojedyncze gatunki testowanych cyjanobakterii. Żadne z konsorcjów nie wykazywało zahamowania rozwoju. W dwóch przypadkach odnotowano umiarkowany wzrost. Co ciekawe spośród wszystkich badanych układów intensywniejszy rozwój obserwowano przy wyższym stężeniu badanych substancji, a nie przy niższym. W rezultacie, wyniki te wskazują na silniejszą

odpowieź cyjanobakterii, wyrażoną przyspieszeniem wzrostu, w obecności wyższych stężeń testowanych leków (300 μM). Ponadto, potwierdzają one wcześniejsze wyniki dotyczące pojedynczych leków, że wyższe stężenia ksenofarmaceutyków intensyfikują wzrost komórek. Mechanizm ten jest reakcją obronną cyjanobakterii, które przyspieszają swój rozwój w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiskowe.

4.3.2. Metaboliczne zmiany w komórkach pojedynczych gatunków i konsorcjów sinic w odpowiedzi na mieszaniny testowanych leków

Podobnie jak w przypadku pojedynczych związków, w eksperymentach z użyciem mieszanin testowanych leków także analizowano zmiany metaboliczne, analizując wzajemne relacje zawartości poszczególnych pigmentów fotosyntetycznych w ostatnim dniu hodowli. W przypadku konsorcjów sinic określono całkowitą zawartość barwników w całej masie komórkowej. Wyniki tych badań przedstawiono na Rys.18.



Rysunek 18 Zmiany metaboliczne w komórkach *Anabaena sp.* i *Chroococcidiopsis thermalis* inkubowanych w mieszaninach testowanych leków, testowanych w układach z pojedynczym mikroorganizmem oraz w odpowiednich konsorcjach. Gwiazdki wskazują progi istotności statystycznej, odpowiednio: $0,05 < p$; * $0,0021 < p < 0,05$; ** $p < 0,0021$ ($n=3$; $\text{RSD} < 10\%$).

Zastosowanie mieszanin leków miało znaczący wpływ na metabolizm badanych sinic, zarówno pojedynczych gatunków, jak i ich konsorcjów. W większości przypadków, obserwowano wzrost biosyntezy fikobiliprotein, co było szczególnie widoczne dla gatunku *Anabaena sp.* oraz testowanych konsorcjów cyjanobakterii. Co ciekawe, dane wskazują, że zwiększenie zawartości tych specyficznych białek nie koreluje z przyrostem liczby komórek sinic (tzw. współczynnik wzrostu, Rys.19). Sugeruje to, że organizmy te mają zwiększone zapotrzebowanie na substancje ochronne, takie jak fikobiliproteiny, w odpowiedzi na czynniki stresowe. W badanych warunkach sinice promują produkcję fikobiliprotein, co odbywa się kosztem rozwoju. Przy niższych stężeniach testowanych leków wzrost liczby komórek był nieznacznie niższy w porównaniu do próby kontrolnej. W niemal wszystkich

przypadkach, z wyjątkiem *Chroococcidiopsis thermalis*, odnotowano statystycznie istotny przyrost fikobiliprotein w komórkach. Najbardziej zauważalny wzrost występował w układach z gatunkiem *Anabaena* sp., podczas gdy w przypadku *Chroococcidiopsis thermalis* zaobserwowano spadek ich zawartości.

Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że czynniki stresowe (w postaci pojedynczych leków) prowadziły również do wzrostu biosyntezy fikobiliprotein w *Anabaena* sp., a do ich zmniejszenia w *Chroococcidiopsis thermalis*. Zwiększenie stężenia fikobiliprotein jest zrozumiałe, biorąc pod uwagę ich funkcje ochronne w zmiennych warunków środowiskowych. Porównując wyniki konsorcjów do tych z pojedynczymi gatunkami, można przypuszczać, że to głównie *Anabaena* sp. odpowiada za zwiększoną produkcję tych białek w układach dwugatunkowych. Informacja ta jest istotna, ponieważ wskazuje na potencjał sinic nie tylko w oczyszczaniu środowiska z leków, ale także w wykorzystaniu ich biomasy do pozyskania cennych substancji chemicznych, takich jak fikobiliprotein.

4.3.3. Efektywność biosorpcji ksenofarmaceutyków z mieszaniny przez poszczególne gatunki sinic oraz ich konsorcja

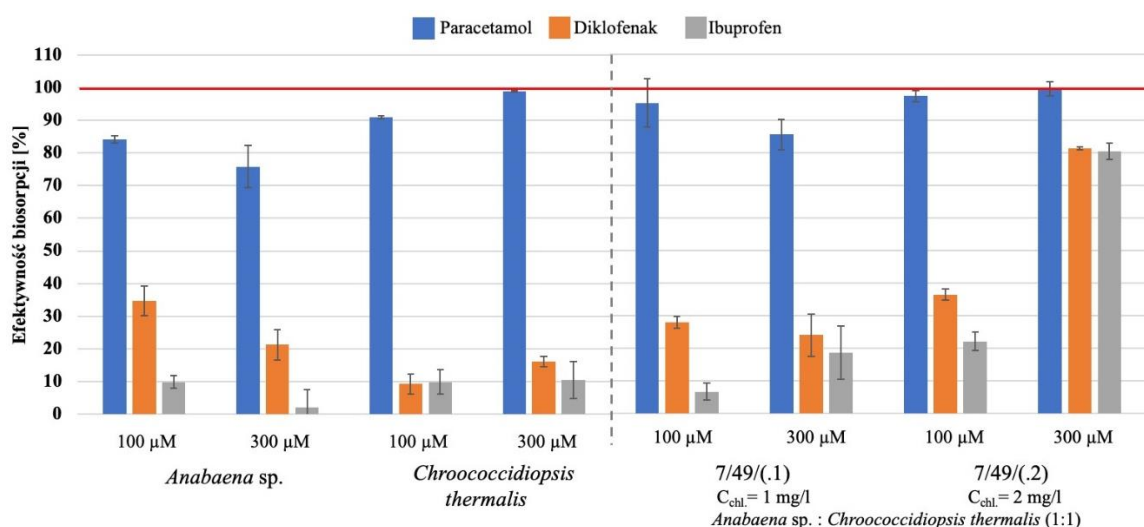
4.3.3.1. Usuwanie farmaceutyków z hodowli zawierających mieszaniny

Podobnie jak w przypadku pojedynczych leków, analiza wpływu mieszanin związków na badane gatunki sinic potwierdziła wcześniejsze obserwacje (Rys. 15). Gatunki *Anabaena* sp. i *Chroococcidiopsis thermalis* wykazały najwyższą efektywność w absorpcji paracetamolu z mieszaniny, przy czym *Chroococcidiopsis thermalis* osiągał lepsze wyniki, wynoszące od 90% do 100%. Zwiększona biosorpcja może wynikać z pozytywnego wpływu paracetamolu na rozwój badanych gatunków sinic, co potwierdzają wcześniejsze badania. W przypadku diklofenaku efektywność biosorpcji była również porównywalna z wynikami uzyskanymi przy inkubacji z pojedynczym związkiem. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku ibuprofenu – w testach, w których obecny był tylko IBF jego biosorpcja była najmniej efektywna i w wielu przypadkach nie zachodziła wcale.

Zastosowanie konsorcjów cyjanobakterii w większości przypadków (z wyjątkiem stężenia 100 μ M) wykazało lepszą efektywność w usuwaniu testowanych substancji, z medium hodowlanego, w porównaniu do pojedynczych gatunków. Mimo wyraźnie lepszych wyników dla układów dwugatunkowych, można zauważyć podobieństwo do danych przedstawionych w rozdziale (4.2.3.1.). Paracetamol był usuwany w największym stopniu, a sinice dobrze biosorbowały diklofenak, natomiast ibuprofen okazał się najbardziej problematyczny.

Inne wyniki uzyskano jednak w układach konsorcjów z większą liczbą komórek (na początku hodowli wynoszącą 2 mg/l chlorofilu), inkubowanych z mieszaniną paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu w stężeniu 300 μ M. Przy 100% efektywności biosorpcji paracetamolu osiągnięto również

około 80% skuteczności w usuwaniu pozostałych dwóch leków. Ten wynik znacząco różni się od innych obserwowanych danych, nawet uwzględniając niższe stężenia w konsorcjach. Dlatego, z uwagi na nietypowe zachowanie sinic, eksperyment ten powtórzono, uzyskując podobne rezultaty – ponad 70% efektywności biosorpcji diklofenaku i ibuprofenu przy całkowitym usunięciu paracetamolu. Dane na wykresie są uśrednione z obu eksperymentów. Taki efekt może wynikać z działania dwóch czynników, na które wcześniej zwracano uwagę. Pierwszym z nich jest zwiększone stężenie komórek biorących udział w biosorpcji, a drugim – wyraźna stymulacja produkcji fikobiliprotein, co sugeruje, że mikroorganizmy mobilizują się w odpowiedzi na stres. W rezultacie, uzyskujemy znacznie lepszą zdolność tych sinic do usuwania ksenofarmaceutyków.



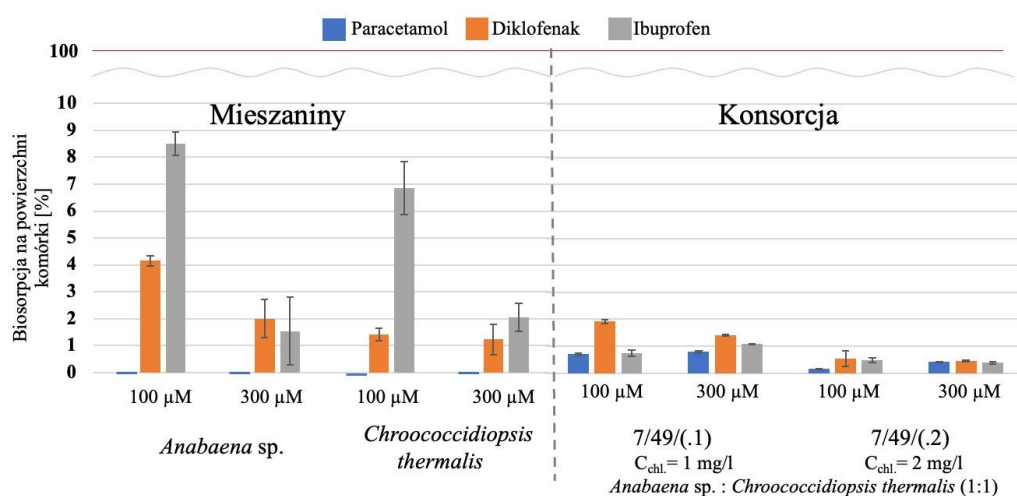
Rysunek 19 Efektywność usuwania poszczególnych ksenofarmaceutyków z ich mieszaniny przez pojedyncze gatunki sinic oraz ich konsorcja (n=9; RSD < 10%)

4.3.3.2. Adsorpcja poszczególnych leków na powierzchni komórek

W przypadku zastosowania mieszanin badanych substancji zauważamy podobne tendencje jak w przypadku pojedynczych związków (Rys. 16), dotyczące biosorpcji na powierzchni komórek (Rys. 20). Paracetamol nie adsorbował na powierzchniach komórek żadnego z badanych gatunków cyjanobakterii. Natomiast diklofenak i ibuprofen były adsorbowane na zewnętrznej części komórek, przy czym były to ilości nieznaczne. W przypadku konsorcjów testowanych gatunków sinic ilość oznaczonych substancji na powierzchni była jeszcze niższa w porównaniu do pojedynczych układów eksperymentalnych. Otrzymane wyniki sugerują, że zastosowanie mieszanin badanych substancji prowadzi do podobnych tendencji w biosorpcji jak w przypadku pojedynczych związków, co może wskazywać na specyficzne właściwości tych substancji oraz na mechanizmy interakcji z komórkami sinic. Brak adsorpcji paracetamolu na powierzchniach komórek wszystkich badanych gatunków może sugerować, że jest on szybko metabolizowany lub usuwany z systemu, co ogranicza jego obecność na powierzchni komórek. Z kolei to, że diklofenak i ibuprofen były adsorbowane na powierzchni

komórek może wynikać z ich hydrofobowych właściwości. Związki o charakterze hydrofobowym mają tendencję do gromadzenia się na powierzchniach komórek, co może ułatwiać ich adsorpcję.

W tych eksperymentach potwierdzono, że to nie bezpośrednia adsorpcja na powierzchni komórek jest kluczowym czynnikiem determinującym sorpcję badanych leków. Mimo że diklofenak i ibuprofen były adsorbowane na zewnętrznej części komórek, to ich obecność była niewielka, a przecież leki te skutecznie były usuwane z medium hodowlanego. Sugeruje to, że inne mechanizmy, takie jak na przykład metabolizm wewnątrz komórek, mogą mieć większy wpływ na usuwanie ksenofarmaceutyków niż sama adsorpcja.



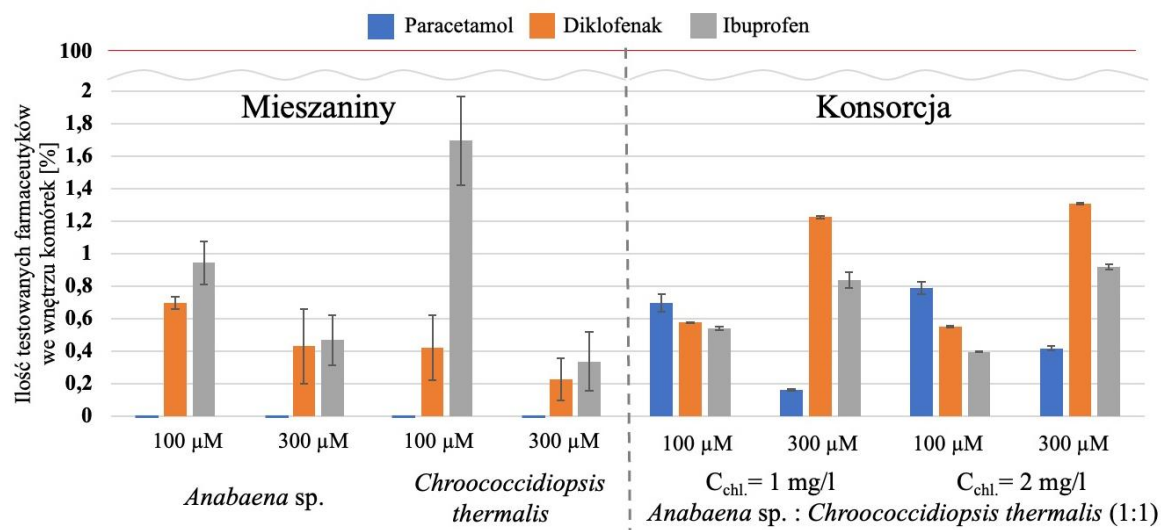
Rysunek 20 Adsorpcja na powierzchni komórek poszczególnych składników mieszanin ksenofarmaceutyków. Wyniki przedstawiono zarówno dla pojedynczych gatunków, jak i ich konsorcjów (n=9; RSD < 10%).

4.3.3.3 Dyfuzja i transport aktywny badanych leków do wnętrza komórek

Ze względu na ubytek testowanych ksenofarmaceutyków z medium hodowlanego oraz ich niskie stężenie na powierzchni komórek, postanowiono w kolejnym etapie niniejszego projektu zbadać, czy i w jakiej ilości testowane leki przedostają się do wnętrza komórek. Podobnie jak w innych przypadkach uzyskane wyniki porównano do prób odniesienia (pożywka z badaną substancją, bez dodatku komórek) i przeliczono na procent (%) wyjściowego stężenia związków w pożywce. Do badań wybrano gatunki słodkowodne inkubowane w mieszaninie testowanych leków oraz odpowiednie konsorcja sinic. Wyniki przedstawiono na poniższym Rys. 21. Jak można zauważyć, wszystkie trzy testowane ksenofarmaceutyki oznaczono we wnętrzu komórek w minimalnej ilości. Podobnie jak w przypadku adsorpcji na powierzchni, wśród identyfikowanych związków wewnątrz komórek obecne są leki hydrofobowe, takie jak diklofenak i ibuprofen. W przypadku eksperymentów, w których używano konsorcjów cyjanobakterii ilości oznaczonych zawartości leków były również bardzo małe.

Biorąc pod uwagę wyniki eksperymentów, które pokazują, że zarówno na powierzchni komórek, jak i wewnątrz nich gromadzone są niewielkie ilości testowanych substancji, można

stwierdzić, że aktywna biosorpcja prowadzi do biotransformacji ksenofarmaceutyków przez cyjanobakterie. Dodatkowo, istnieją dowody na to, że niektóre gatunki sinic mogą w warunkach stresowych przejawiać heterotroficzny metabolizm, co może sugerować, że ksenofarmaceutyki są włączane w ich szlaki metaboliczne.



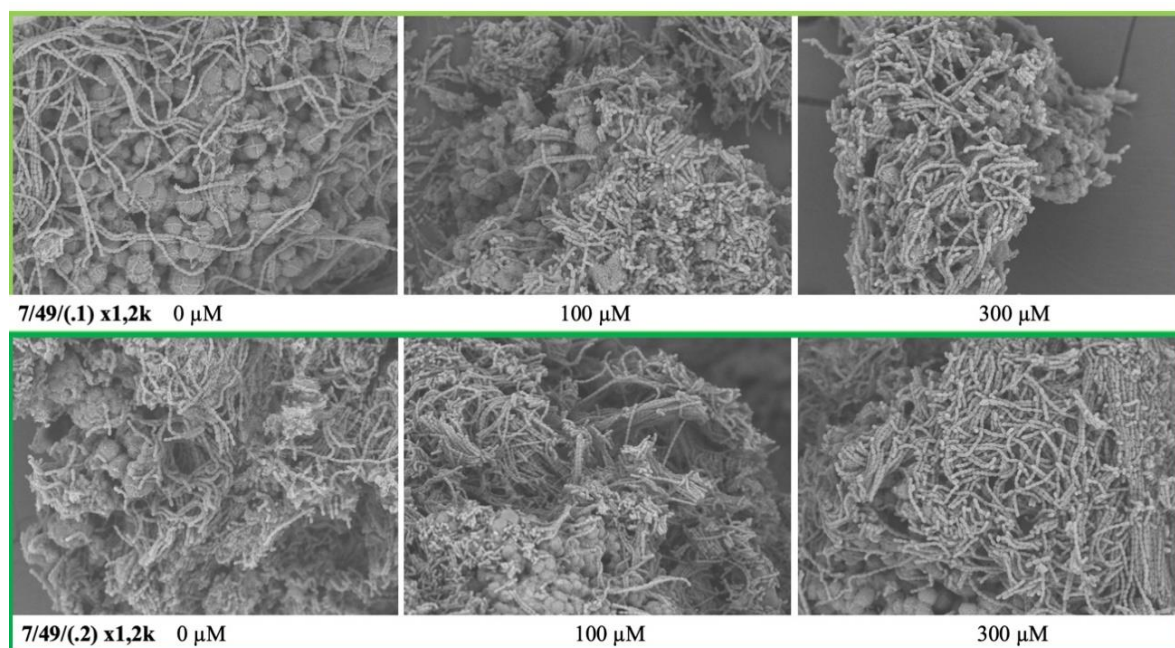
Rysunek 21 Stężenie poszczególnych leków we wnętrzu komórek w porównaniu do próby odniesienia (n=9; RSD < 10%).

4.3.4. Analizy powierzchni komórek testowanych cyjanobakterii w układach dwugatunkowych z wykorzystaniem techniki SEM

Pomiar chlorofilu i innych barwników fotosyntetycznych w konsorcjach odzwierciedlał ogólny rozwój hodowli cyjanobakterii, a nie poszczególnych gatunków. To ograniczało możliwość ustalenia, czy poszczególne gatunki rozwijały się w równym stopniu, czy któryś z nich dominował. Aby ocenić zmiany w liczbie komórek różnych gatunków w konsorcjum oraz ich wzajemne oddziaływanie, postanowiono przeprowadzić analizy mikroskopowe. Próbkę do analizy oraz procedurę oznaczania zrealizowano zgodnie z opisem przedstawionym w rozdziale 3.5. „Badania z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM)”. Obserwowane komórki pochodziły z dnia zakończenia hodowli (21. dzień). Wyniki przedstawiono na poniższym Rys. 22.

W przypadku konsorcjum z mniejszą liczbą komórek (wyjściowe stężenie chlorofilu = 1 mg/l) w próbie kontrolnej można zauważyć, że komórki gatunku *Chroococcidiopsis thermalis* są zgrupowane, a na ich powierzchni znajdują się komórki *Anabaena sp.* W próbach eksperymentalnych sytuacja wygląda jednak inaczej. Zarówno przy stężeniu 100 μM, jak i 300 μM testowanych mieszanin, komórki wykazują tendencję do większej agregacji. Komórki *Anabaena sp.* wciąż tworzą zewnętrzną warstwę, pod którą znajdują się zgrupowania komórek *Ch. thermalis*. Ponadto, w odróżnieniu od

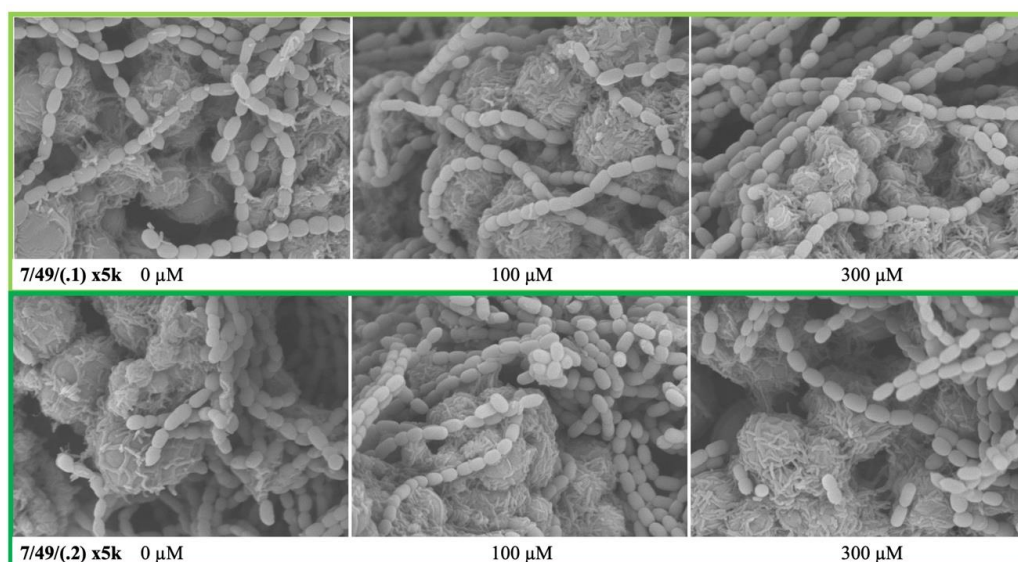
próby kontrolnej, w próbach eksperymentalnych zaobserwowano znaczną liczbę komórek *Anabaena* sp., a charakterystyczne łańcuchy tych komórek były krótsze niż w próbie kontrolnej.



Rysunek 22 Zdjęcia SEM konsorcjów badanych cyjanobakterii po 21 dniach hodowli. Obrazy w powiększeniu 1200 razy.

Zauważono również, że niektóre komórki *Anabaena* sp. wnikają w struktury pomiędzy komórkami *Chroococcidiopsis thermalis*. W próbie kontrolnej z dwukrotnie większym stężeniem chlorofilu (2 mg/l) również widoczna jest dominacja *Anabaena* sp., której komórki gromadzą się na *Ch. thermalis*. W eksperymentach nadal obserwujemy tendencję do dominacji *Anabaena* sp. w konsorcjum. Co ciekawe, przy wyższym stężeniu (300 μ M) zachowały się długie struktury łańcuchów komórek tego gatunku oraz jego znacząca dominacja.

Aby lepiej zinterpretować relacje między poszczególnymi gatunkami, wykonano zdjęcia w powiększeniu 5000 razy. Uzyskane obrazy potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia o większej integracji komórek obu gatunków w hodowlach eksperymentalnych (Rys. 23). W przypadku stężenia mieszaniny 100 μ M, przy niższej wyjściowej liczbie komórek (1 mg/l), różnice są szczególnie widoczne. W porównaniu do zdjęć z hodowli kontrolnej, łańcuchy *Anabaena* sp. oplatają okrągłe komórki *Chroococcidiopsis thermalis*. Warto zwrócić uwagę na zmiany na powierzchni komórek tego gatunku, które ujawniają się w większym powiększeniu. W próbach kontrolnych widać deformacje na okrągłych komórkach, które znacznie różnią się od zdrowych. Natomiast w eksperymentalnych próbach zniekształcenia te obejmują całe komórki, a w niektórych przypadkach oplatają także komórki *Anabaena* sp.



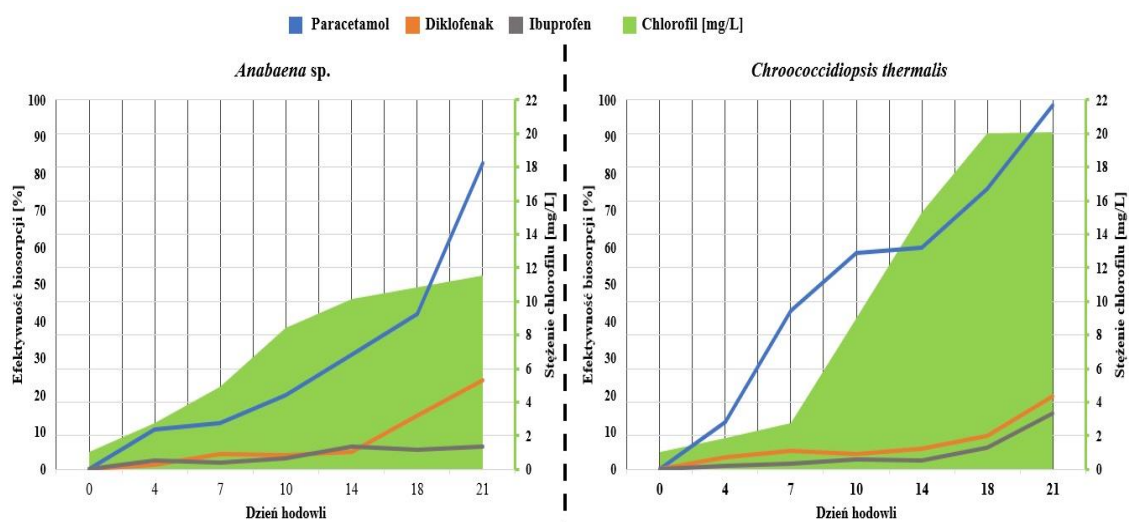
Rysunek 23 Zdjęcia SEM konsorcjów badanych cyjanobakterii po upływie 21 dni. obrazy w powiększeniu 5000 razy.

Na podstawie charakterystyki *Chroococcidiopsis thermalis*, zwłaszcza jego zdolności do ograniczenia wegetacji w trudnych warunkach oraz tendencji do tworzenia mat przydennych, można przypuszczać, że zauważone struktury to substancje wytwarzane przez ten gatunek w celu ochrony komórek i utrzymania ich w grupie. Na podstawie powyższych zdjęć można przypuszczać, że komórki *Ch. thermalis* nie tylko zmieniają swój metabolizm poprzez regulację biosyntezowanych pigmentów fotosyntetycznych, ale na przykład wytwarzają substancje zewnątrzkomórkowe.

4.3.5. Dynamika usuwania testowanych związków z ich mieszaniny

Ze względu na interesujące wyniki dotyczące biosorpcji poszczególnych leków w układach z ich mieszaninami, zdecydowano się na zbadanie dynamiki usuwania tych substancji, czyli ich ubytku w trakcie hodowli. Próbkę pobierano kolejno w 4, 7, 10, 14, 18 i 21 dniu hodowli, podobnie jak w przypadku oznaczania stężenia chlorofilu. Oznaczanie stężenia poszczególnych pigmentów oraz przetwarzanie danych przeprowadzono w analogiczny sposób jak przy badaniu biosorpcji na końcu eksperymentu. Wyniki dotyczące poszczególnych związków w mieszaninie, w kontekście inkubacji z pojedynczymi gatunkami, przedstawiono na poniższym Rys. 24. Otrzymane wyniki pokazują, że paracetamol ma najwyższą efektywność usuwania, co można zaobserwować już od pierwszych dni hodowli w obu badanych gatunkach. Jednak istnieją różnice w dynamice jego usuwania. *Anabaena* sp. wykazuje liniowy wzrost biosorpcji paracetamolu do osiemnastego dnia, a następnie następuje intensyfikacja procesu usuwania leku w ostatnich trzech dniach hodowli. W przypadku diklofenaku zauważono podobny trend, ale z mniejszą efektywnością.

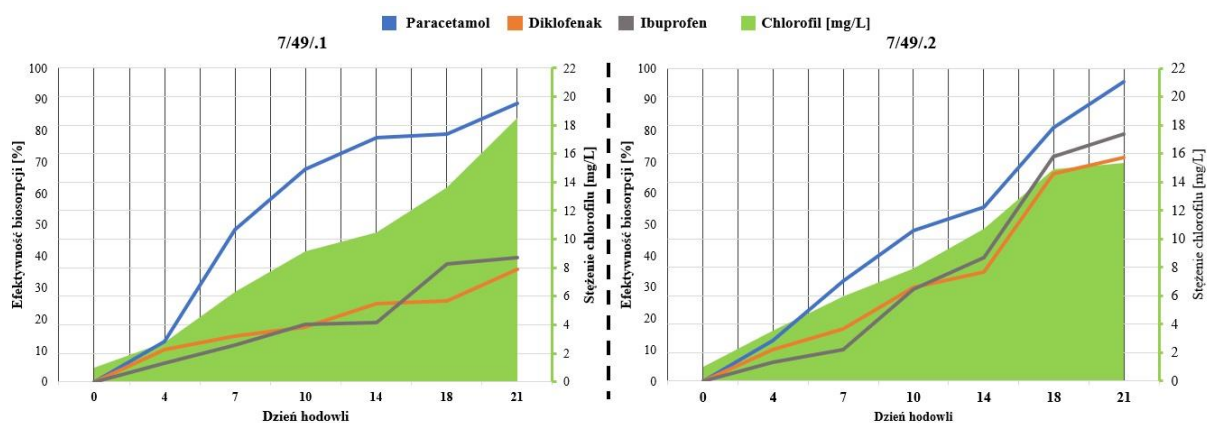
W tym miejscu, można stwierdzić, że *Anabaena* sp. potrzebuje około 18 dni, aby dostosować swój metabolizm do nowych warunków, a po tym czasie skutecznie usuwa zarówno diklofenak, jak i paracetamol. Z kolei ibuprofen był usuwany w minimalnym stopniu przez praktycznie cały czas trwania hodowli.



Rysunek 24 Efektywność biosorpcji testowanych związków z medium hodowlanego w czasie. Zielony kolor ilustruje przyrost poszczególnych gatunków w ciągu 21 dni (n=9; RSD < 10%).

W odniesieniu do *Chroococcidiopsis thermalis*, paracetamol był biosorbowany w sposób analogiczny do wzrostu komórek. Gatunek ten wykazywał wysoką efektywność w usuwaniu paracetamolu. Do dziesiątego dnia hodowli usunięte zostało około 60% leku, następnie przez 5 kolejnych dni ubytek pozostawał na stałym poziomie. Dopiero około dnia szesnastego nastąpił wzrost efektywności biosorpcji, co doprowadziło do prawie całkowitego usunięcia paracetamolu w 21 dniu hodowli. Jeśli chodzi o diklofenak i ibuprofen, dynamika biosorpcji była na podobnym poziomie dla obu związków. Oba leki zaczęły być usuwane intensywniej dopiero od osiemnastego dnia, co sugeruje, że *Chroococcidiopsis thermalis* potrzebował czasu na przystosowanie się do obecności tych substancji w medium hodowlanym (Rys. 24).

W przypadku zastosowania konsorcjów badanych gatunków cyjanobakterii zaobserwowano inną tendencję w biosorpcji testowanych ksenofarmaceutyków (Rys. 25). Konsorcja z niższą początkową liczbą komórek (stężenie chlorofilu wynoszące 1 mg/l) efektywniejsze były w usuwaniu paracetamolu przez pierwsze 14 dni, po czym dalszy wzrost efektywności usuwania był minimalny. W odniesieniu do diklofenaku i ibuprofenu efektywność biosorpcji była znacznie wyższa w przypadku konsorcjów niż pojedynczych gatunków. Ponadto, dynamika biosorpcji tych związków w trakcie hodowli sugeruje, że były one usuwane w sposób liniowy od samego początku. To znacząca różnica w porównaniu do pojedynczych gatunków, gdzie diklofenak i ibuprofen zaczęły być nieznacznie usuwane z medium hodowlanego dopiero po 14 dniach. Jakkolwiek, w przypadku konsorcjum 7/49/(.2) nie można było jednoznacznie określić, który z testowanych związków był bardziej preferowany do usuwania przez badane sinice.



Rysunek 25 Efektywność biosorpcji w czasie z medium hodowlanego testowanych związków. Kolorem zielonym zobrazowano przyrost konsorcjów w czasie 21 dni, (n=9; RSD < 10%).

Co interesujące, konsorcjum cyjanobakterii o początkowym stężeniu chlorofilu wynoszącym 2 mg/l wykazało zdolność do biosorpcji paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu z efektywnością przekraczającą 80% przy wyjściowym stężeniu 300 μ M. Ten wynik znacząco przewyższa rezultaty uzyskane w innych eksperymentach, zwłaszcza dla dwóch hydrofobowych związków: diklofenaku i ibuprofenu. Analiza dynamiki usuwania pozwala zidentyfikować momenty, w których pojawiają się różnice w efektywności biosorpcji poszczególnych leków, ale są one nieznaczne. Już od czwartego dnia hodowli obserwujemy biosorpcję wszystkich testowanych substancji. Podobnie jak w poprzednich badaniach, paracetamol jest preferowany w etapie usuwania go z medium hodowlanego. Ciekawym zjawiskiem jest też to, że cyjanobakterie, mimo nieco mniejszej efektywności biosorpcji obserwowanej dla diklofenaku i ibuprofenu, utrzymują podobny przebieg tego procesu jak w przypadku paracetamolu.

Podsumowując, w przypadku konsorcjów z większą liczbą komórek (2 mg/l) nie zauważono różnic czasowych w dynamice biosorpcji paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu, a jedynie nieznaczne różnice w jego efektywności. Badanie dynamiki usuwania przez cyjanobakterie leków z medium hodowlanego ujawniło, że te organizmy wykazują różną efektywność biosorpcji w różnych etapach rozwoju komórek (Rys. 24 i 25). W przypadku pojedynczych gatunków preferowany jest bardziej hydrofilowy paracetamol, który, zgodnie z literaturą, może być włączany do szlaków metabolicznych i wykorzystywany jako źródło niezbędnych pierwiastków chemicznych. Kiedy metabolizm cyjanobakterii przystosowuje się do zmienionych warunków oraz stresujących czynników, początkowo usuwają one mniej toksyczne substancje, takie jak paracetamol. Po tym etapie komórki zaczynają powoli metabolizować pozostałe stresory. Jest to ciekawe, ponieważ zarówno *Anabaena* sp., która wykazywała większą aktywność w przeciwdziałaniu stresom poprzez zwiększoną produkcję fikobiliprotein, jak i *Chroococcidiopsis thermalis*, która w trudnych warunkach spowalnia swój metabolizm, różnie radzą sobie z tymi substancjami. Ponadto, zastosowanie konsorcjów, jak wykazano wcześniej, jest lepszym podejściem do wykorzystania cyjanobakterii jako biosorbentów niż użycie pojedynczych gatunków. Zbadanie dynamiki usuwania ksenofarmaceutyków z mieszaniny przez

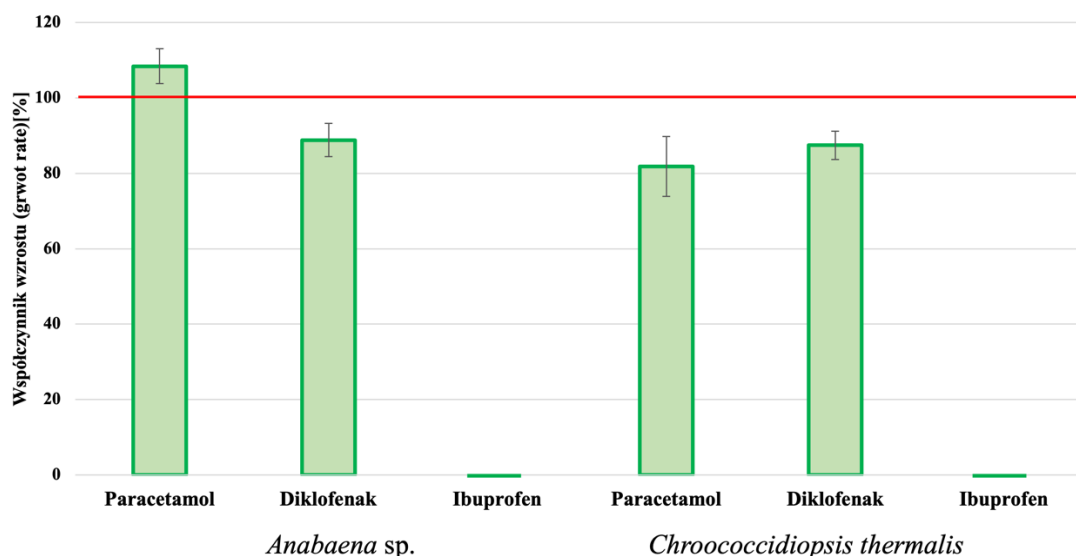
te mikroorganizmy dostarczyło nowych danych dla konsorcjów o wyższym początkowym stężeniu chlorofilu (2 mg/l). Uzyskane wyniki pokazują, że biosorpcja trzech testowanych substancji postępuje w przybliżonym tempie od pierwszych dni hodowli, a nie tak jak w przypadku innych badanych układów, gdzie usunięcie mniej szkodliwego czynnika (paracetamolu) miało miejsce wcześniej. Może to sugerować pewną współpracę między cyjanobakteriami, mającą na celu przeciwdziałanie i niwelowanie czynników stresogennych. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono również znikomą ilość testowanych związków na powierzchni oraz we wnętrzu komórek. Na tej podstawie można wnioskować, że odmienne strategie radzenia sobie z czynnikami stresowymi przez konsorcja cyjanobakterii mogą korzystnie wpływać na ich zdolność do neutralizacji substancji toksycznych oraz ich wykorzystanie w procesach metabolicznych.

4.3.6. Hodowla cyjanobakterii w pożywkach pozbawionych węgla jako źródła pożywienia

Aby lepiej zrozumieć czy testowane związki lub czy zawarte w nich pierwiastki są włączane do szlaków metabolicznych zdecydowano się na przeprowadzenie dla wybranych układów, hodowli w pożywce w którym jedynym źródłem węgla były testowane związki. Jako próbę odniesienia w tych układach użyto komórki hodowane w pożywce bez dodatku badanych substancji oraz bez dodatku soli zawierających węgiel. Aby sprawdzić czy sam dodatek węgla do pożywki ma istotny wpływ na rozwój cyjanobakterii prowadzono również równoległe hodowle w pełnej pożywce.

4.3.6.1. Rozwój testowanych gatunków sinic w obecności badanych związków w pożywce pozbawionej węgla.

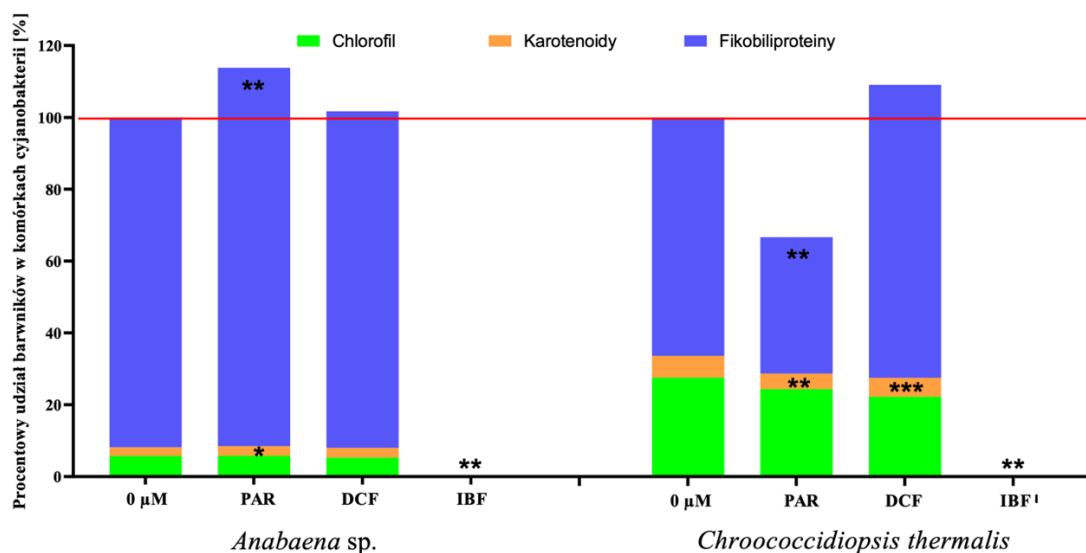
Na początku zbadano jednak, jak brak związków węgla w pożywce wpływa na rozwój badanych gatunków sinic, porównując próbki kontrolne zawierające substancje węglowe z próbkami, w których tych substancji nie było. W przypadku *Anabaena* sp. stwierdzono ponad dwukrotny wzrost. Tzw. *growth rate* (GR) wyniósł aż 225,60% w porównaniu do kontroli w pełnej pożywce), podczas gdy *Chroococcidiopsis thermalis* wykazywał spowolnienie rozwoju o około 25% (GR = 74,99%) (Rys. 26). Z tego powodu podjęto decyzję, aby wszystkie uzyskane wyniki, w których wyeliminowano obecność składnika węglowego pochodzącego bezpośrednio z pożywki, porównywać tylko z kontrolą inkubowaną w pożywce bez dodatku związków węgla. Takie podejście umożliwiało obiektywną ocenę wpływu testowanych leków na rozwój sinic. Eksperymenty przeprowadzono dla poszczególnych gatunków mikroorganizmów oraz ksenofarmaceutyków w stężeniu 300 μ M.



Rysunek 26 Współczynnik wzrostu testowanych gatunków sinic w obecności badanych związków w pożywce pozbawionej węgla. Czerwona linia wskazuje poziom wzrostu w próbie kontrolnej bez dodatku węgla (n=3; RSD < 10%).

Eksperymenty, w których testowane leki były jedynym źródłem węgla w pożywce, miały znaczący wpływ na rozwój badanych cyjanobakterii. Tylko gatunek *Anabaena sp.* wykazał nieznaczne korzyści w obecności paracetamolu, podczas gdy w pozostałych układach obserwowano zahamowanie wzrostu. Największą toksyczność wykazał ibuprofen, który prowadził do całkowitego zatrzymania hodowli. Po dwóch tygodniach w tych układach oba gatunki sinic uległy całkowitemu obumarciu. Porównując te wyniki z danymi uzyskanymi w pożywce pełnej (Rys. 11), można zauważyć destrukcyjny wpływ braku węgla na *Anabaena sp.*. Dwa pierwsze związki znacznie hamowały rozwój w porównaniu do hodowli w pełnej pożywce, a ibuprofen prowadził do całkowitego zahamowania wzrostu. W przypadku *Chroococcidiopsis thermalis* paracetamol i diklofenak nie wywarły silnego wpływu na rozwój, zarówno w porównaniu do próby kontrolnej, jak i hodowli w pełnej pożywce. Jednakże zauważalne było pewne zahamowanie wzrostu w próbach z paracetamolem i diklofenakiem w pełnej pożywce (Rys. 11). W następnym etapie badano, jak ta nagła zmiana warunków wpływa na metabolizm cyjanobakterii.

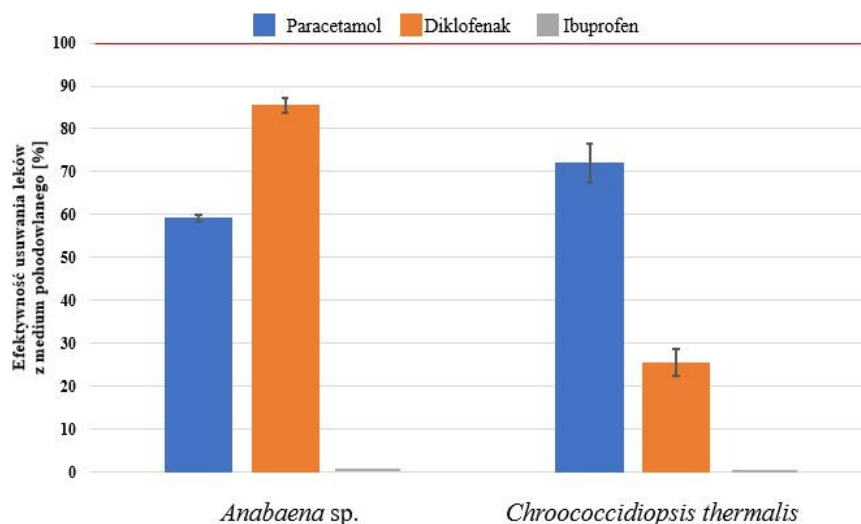
Zmiany metaboliczne w komórkach *Anabaena sp.* są wyraźnie związane z ich wzrostem (Rys. 27). W przypadku paracetamolu zaobserwowano znaczący wzrost biosyntezy fikobiliprotein i karotenoidów, choć nie osiągnął on poziomu z hodowli w pełnej pożywce. W obecności diklofenaku nie stwierdzono istotnych zmian w stężeniu pigmentów fotosyntetycznych, co sugeruje, że komórki te utrzymują równowagę metaboliczną kosztem wzrostu. Nie przedstawiono wyników dla ibuprofenu, ponieważ w czternastym dniu hodowli obie linie komórkowe całkowicie obumarły. W przypadku *Chroococcidiopsis thermalis* zauważono znaczące zahamowanie produkcji karotenoidów przy obu badanych związkach, a paracetamol wpływał także na biosyntezę fikobiliprotein. W tej sytuacji uzyskane wyniki dowodzą, że *Ch. thermalis* może zmieniać swój metabolizm, aby skupić się na produkcji chlorofilu, co prowadzi do zmniejszenia ilości fikobiliprotein w porównaniu do hodowli w pełnej pożywce. W warunkach pożywki pozbawionej węgla nie zauważono znaczącego wzrostu chlorofilu ani spadku fikobiliprotein, co sugeruje, że gatunek ten utrzymuje produkcję tych pigmentów na stabilnym poziomie.



Rysunek 27 Proporcje barwników fotosyntetycznych w komórkach cyjanobakterii inkubowanych w pożywce pozbawionej związków węgla. Gwiazdki wskazują na istotne statystycznie zmiany w stężeniu pigmentów 0,05 < p; * 0,0021 < p < 0,05; ** p < 0,0021 (n=3; RSD < 10%).

4.3.6.2. Biosorpcja testowanych związków w pożywce pozbawionej węgla.

Kluczowym aspektem analizy wpływu zubożenia pożywki na biosorpcję testowanych związków, szczególnie tych bogatych w organiczne formy węgla, było zaobserwowanie zmian w procesach biosorpcji (Rys. 28). W przypadku gatunku *Anabaena sp.* wykazano interesującą zależność w zubożonej pożywce. Paracetamol był biosorbowany w znacznie mniejszym stopniu niż w pełnej pożywce – różnica wynosiła około 35 punktów procentowych. Natomiast najbardziej zaskakującym wynikiem był wyraźny wzrost usuwania diklofenaku, którego biosorpcja po 21 dniach osiągnęła aż 85%. To o tyle interesujące, że w pełnej pożywce przy stężeniu 300 μM diklofenak nie był w ogóle biosorbowany. Dodatkowo, ciekawym zjawiskiem było porównanie efektywności biosorpcji diklofenaku z tempem wzrostu komórek. W pełnej pożywce rozwój *Anabaena sp.* był znacznie szybszy, mimo że nie zachodziła biosorpcja diklofenaku. W zubożonej pożywce natomiast rozwój komórek był delikatnie zahamowany, ale diklofenak był efektywnie usuwany z medium. Te obserwacje sugerują, że diklofenak mógł pełnić rolę kluczowego źródła węgla dla komórek. Wskazuje to także na wysoką selektywność gatunku *Anabaena sp.* w pozyskiwaniu odpowiednich substancji chemicznych niezbędnych do wzrostu.



Rysunek 28 Efektywność biosorpcji badanych substancji w zubożonym medium hodowlanym zawierającym związki węgla (n=9; RSD < 10%).

Kiedy w pożywce znajdował się łatwo dostępny węgiel, komórki traktowały diklofenak jako czynnik stresowy, który zwiększał ich aktywność, co prowadziło do intensywniejszego rozwoju i produkcji fikobiliprotein (Rys.13). Jednak diklofenak nie był wykorzystywany jako źródło węgla. W sytuacji braku związków węgla komórki zwalniały rozwój, jednocześnie eliminując diklofenak, co sugeruje, że mogły włączyć go do procesów metabolicznych. Na tej podstawie można stwierdzić, że *Anabaena* sp. potrafi wykorzystywać zarówno węgiel organiczny, jak i nieorganiczny, w zależności od dostępnych zasobów, chociaż korzystanie z węgla organicznego wymaga większego nakładu energii.

Literatura potwierdza, że sinice mogą zmieniać sposób odżywiania, przechodząc z mechanizmu fotoautotroficznego na heterotroficzny, gdy jest to konieczne [Meireles dos Santos, 2017; Stebegg, 2023]. Dodatkowo, cyjanobakterie mają zdolność magazynowania niezbędnych pierwiastków, takich jak węgiel, wodór, tlen czy fosfor, w postaci wewnątrzkomórkowych związków. Gdy brakuje ich w środowisku, te substancje są rozkładane i wykorzystywane w metabolizmie. Fikobiliproteiny pełnią funkcję magazynu dla węgla, wodoru i tlenu. Co więcej, cyjanobakterie wypracowały interesujący sposób gromadzenia fosforu, który jest kluczowy dla wielu procesów biologicznych, takich jak tworzenie materiału genetycznego, transport energii i synteza białek. Fosfor krąży w biosferze w zamkniętym obiegu, co sprawia, że jego dostępność jest niezwykle ważna dla organizmów. Cyjanobakterie magazynują bowiem część fosforu, tworząc naturalne fosfoniany (C-P). W przypadku obumarcia komórki, uwolniony fosfor staje się dostępny tylko dla niewielu organizmów, w tym sinic, które są zdolne do rozkładania wiązań fosfonowych. Sugeruje to, że niektóre gatunki sinic wykształciły specjalne szlaki metaboliczne pozwalające na rozkład złożonych związków organicznych do prostszych form organicznych lub nieorganicznych [Nilsson, 2002; Rezayian, 2016; Vincent, 2009].

Analizując otrzymane wyniki, zauważono, że drugi testowany gatunek sinic również wykazał obniżoną zdolność do biosorpcji paracetamolu przy najwyższym stężeniu (300 μM) – około 30 punktów procentowych w porównaniu do hodowli w pełnej pożywce. Ciekawe wyniki pojawiły się także w przypadku diklofenaku. Biosorpcja tego związku przez *Ch. thermalis* była mniej efektywna niż u *Anabaena* sp., wynosząc zaledwie około 25%. Niemniej jednak, w porównaniu do pełnej pożywki, gdzie biosorpcja diklofenaku w dawce początkowej 300 μM nie zachodziła, ten wynik wskazuje na wyższą efektywność w zubożonym medium. To sugeruje, że *Ch. thermalis* najprawdopodobniej również potrafi, choć w mniejszym stopniu niż *Anabaena* sp., wykorzystywać diklofenak jako źródło węgla.

W następnym kroku zbadano stopień adsorpcji badanych ksenofarmaceutyków na komórkach. Na powierzchni komórek wykryto jedynie nieznaczne ilości testowanych substancji (<5%) i dotyczyło to jedynie paracetamolu i diklofenaku. Dlatego, ze względu na niewielkie różnice i ogólnie tę samą tendencję, czyli brak adsorpcji, wyniki te nie zostały przedstawione na wykresie.

4.3.7. Usuwanie badanych ksenofarmaceutyków przez gatunek *Arthrospira platensis*

W literaturze podawane są informacje o wytwarzaniu toksyn przez dwa testowane gatunki słodkowodnych cyjanobakterii, *Anabaena* sp. i *Chroococcidiopsis thermalis*. Jest to cecha charakterystyczna dla wielu gatunków sinic, które wytwarzają różne toksyny celem obrony oraz eliminowania potencjalnych konkurentów w środowisku. W literaturze jest wiele przykładów na zatrucia toksynami sinicowymi zarówno zwierząt domowych, hodowlanych oraz występujących w środowiskach wodnych [Van Apeldoorn, 2007; Thawabteh, 2023]. Również powszechne stało się, także w Polsce, wydawanie ostrzeżeń o zakwitach sinicowych zarówno w zamkniętych zbiornikach wodnych oraz w morzach, powodowane intensywnym rozwojem cyjanobakterii szczególnie w okresach letnich [Jóźwiak, 2008; Konik, 2023; Śliwińska-Wilczewska, 2019]. Drugim rozważanym aspektem była toksyczność potencjalnych metabolitów testowanych leków. W poprzednich podrozdziałach pracy udowodniono, że związki te są biosorbowane z medium hodowlanego jednak nie wykryto ich znaczącej ilości na powierzchniach oraz we wnętrzu komórki. Można zatem wnioskować, że muszą one być biotransformowane do form mniej aktywnych lub też rozkładane i wykorzystywane jako dodatkowe źródło pierwiastków chemicznych. W literaturze wskazuje się, że paracetamol może być rozkładany przez niektóre mikroorganizmy, nawet do związków najprostszych takich jak woda i dwutlenek węgla. Inne prace wskazują, iż diklofenak jest często utleniany [Domaradzka, 2015; Guzik, 2019].

W publikacjach naukowych wskazuje się, że niektóre gatunki cyjanobakterii, w tym testowane *Anabaena* sp. i *Ch. thermalis*, mogą produkować różnego rodzaju toksyny. W prowadzonych badaniach pomimo zastosowaniu techniki LC-MS, nie udało się zidentyfikować najczęściej produkowanych przez sinice toksyn w medium pohodowlanym. Nie można jednak wykluczyć, że są one wytwarzane przez

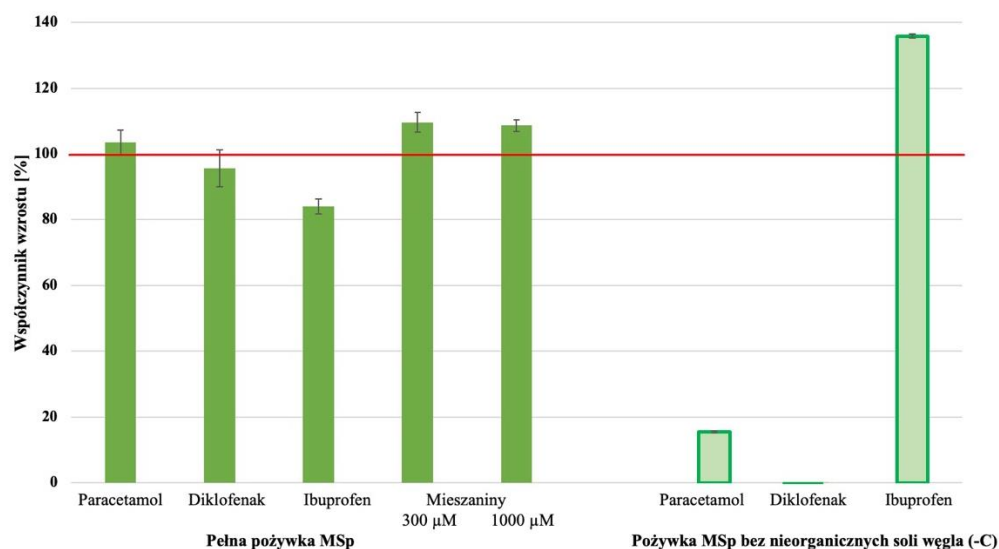
komórki w bardzo małych ilościach, a tym samym jednoznacznie stwierdzić ich obecności w badanych próbkach. Zważywszy na te niepewności postanowiono przetestować, dla wybranych układów eksperymentalnych, trzeci gatunku cyjanobakterii, który nie wytwarza toksyn. Do przedstawionych poniżej badań wytypowano halofilną sinicę *Arthrospira platensis*. Gatunek ten, nazywany powszechnie *Spirulina*, tworzy nitkowate struktury. Cyjanobakteria ta w dzisiejszych czasach jest szeroko stosowana jako suplement diety, zarówno dla ludzi jak i dla zwierząt. Jest też bardzo dobrym źródłem fikobiliprotein.

4.3.7.1. Wpływ testowanych ksenofarmaceutyków na rozwój i metabolizm *A. platensis*

Badania literaturowe pokazują, że gatunki halofilne wykazują większą odporność na czynniki stresowe niż gatunki słodkowodne [Drzyga, 2018; Forlani, 2008; Niemczyk 2020]. Dlatego do eksperymentów wybrano następujące układy:

- ➔ hodowla w pełnej pożywce z dodatkiem pojedynczych leków o stężeniu 300 μM
- ➔ hodowla w pełnej pożywce z dodatkiem mieszaniny leków o stężeniu 300 μM i 1000 μM
- ➔ hodowla w pożywce pozbawionej związków węgla w obecności pojedynczych leków (stężenie 300 μM).

Wyniki przedstawiono na poniższym rysunku (Rys. 29).

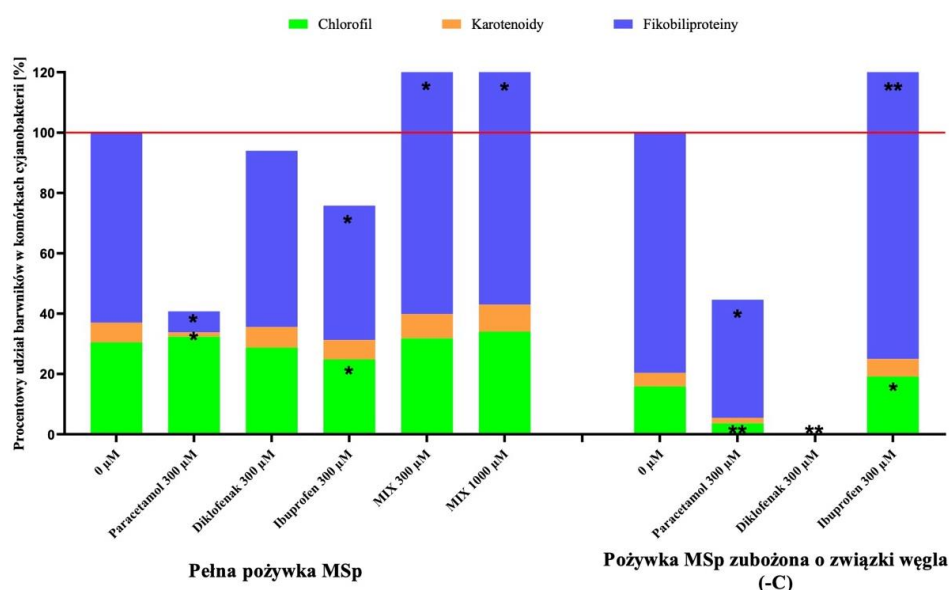


Rysunek 29 Współczynnik wzrostu *Arthrospira platensis* po 21 dniach inkubacji w medium z dodatkiem pojedynczych testowanych ksenofarmaceutyków i ich mieszanin, oraz w układzie z pożywką pozbawioną obecności węgla (n=3; RSD < 10%).

Jak można zauważyć obecność ksenofarmaceutyków w pełnej pożywce, nie wpływa w sposób znaczący na rozwój testowanego gatunku. W tym przypadku *A. platensis* wykazuje stabilny wzrost przy minimalnym wpływie paracetamolu i diklofenaku, i tylko ibuprofen nieznacznie hamuje rozwój tego mikroorganizmu. Co ciekawe, w przypadku obecności w pożywce wszystkich leków, mieszanina badanych związków nawet lekko stymuluje wzrost, co oznacza, że *A. platensis* radzi sobie dobrze,

gdy dostępny jest węgiel, niezależnie od obecności ksenofarmaceutyków. Sytuacja jednak zmienia się znacząco, kiedy w pożywce brakuje węgla, podstawowego pierwiastka, który jest niezbędny mikroorganizmom do budowy biomasy i przeprowadzania procesów metabolicznych. Na wykresie widać, że przy braku węgla paracetamol ogranicza wzrost poniżej 20%, a diklofenak jest ekstremalnie toksyczny, powodując całkowitą śmierć komórek. Co ciekawe, ibuprofen w pożywce bez węgla działa stymulująco na rozwój, powodując wzrost o około 40%. To sugeruje, że w warunkach braku węgla *A. platensis* może wykorzystać ibuprofen jako alternatywne źródło energii lub węgla, co jest nietypowe i interesujące, i stanowi obszar do dalszych badań.

W kolejnym kroku ocenie badano jak te same warunki hodowli wpływają na poziom barwników fotosyntetycznych, a uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 30. Jak można zauważyć, w pełnej pożywce (MSP) kontrolna grupa komórek wykazuje zrównoważony udział chlorofilu, karotenoidów oraz fikobiliprotein, co wskazuje na stabilny wzrost i prawidłową produkcję barwników. W przypadku paracetamolu (300 μ M) zaobserwowano jednak znaczący spadek poziomu dwóch pomocniczych pigmentów jakim są karotenoidy i fikobiliproteiny. Co ciekawe jego obecność nie wpływa znacząco na biosyntezę chlorofilu w komórkach. Zmiany zawartości poszczególnych barwników widać również w przypadku pozostałych hodowli. Przykładowo, obecność IBF w pełnej pożywce zmniejsza zarówno ilość obecnych w komórce fikobiliprotein jak i chlorofilu. Co ciekawe, w przypadku mieszanin ksenofarmaceutyków (300 μ M i 1000 μ M) zaobserwowano mniejszy wpływ toksyczny, a poziom fikobiliprotein utrzymuje się na wyższym poziomie niż przy działaniu pojedynczych związków. Jest to zgodne z oczekiwaniami, zarówno na podstawie wcześniejszych wyników przedstawionych w tej pracy. W literaturze wskazano, że *Arthrospira platensis*, podobnie jak *Anabaena* sp., w odpowiedzi na stresowe czynniki często reaguje zwiększoną biosyntezą fikobiliprotein.

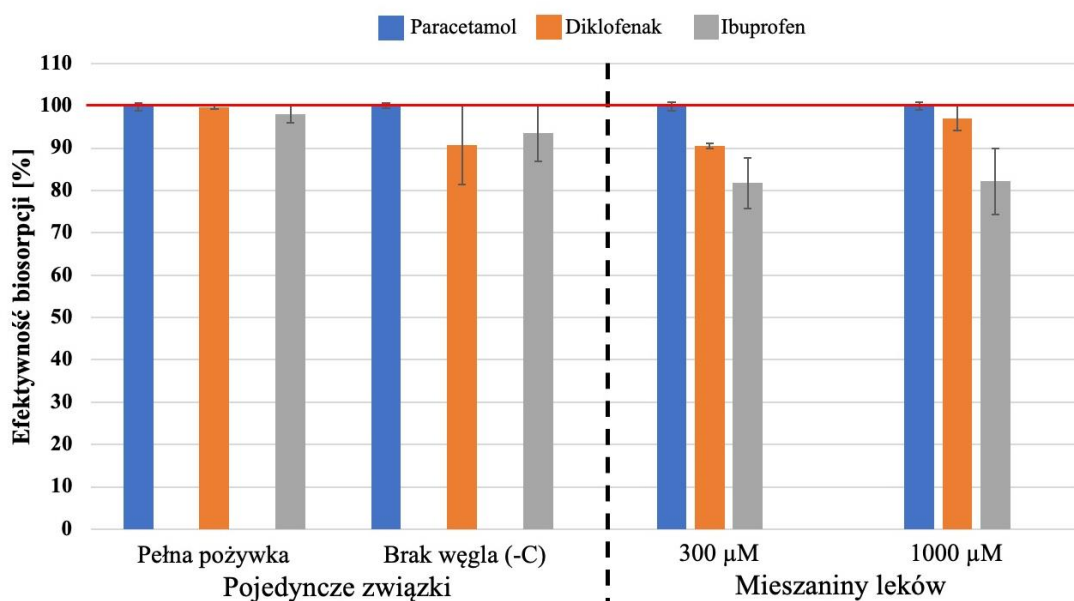


Rysunek 30 Metaboliczne zmiany w komórkach *Arthrospira platensis* w 21. dniu hodowli z dodatkiem testowanych ksenofarmaceutyków. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * $0,0021 < p < 0,05$; ** $p < 0,0021$, ($n=3$; RSD < 10%).

W warunkach diety zubożonej o związki węgla (-C) wpływ testowanych substancji jest bardziej wyraźny. Brak węgla znacząco obniżył poziom chlorofilu i fikobiliprotein nawet w kontroli, co wskazuje na kluczową rolę węgla w procesach fotosyntetycznych. Paracetamol (300 μ M) dodatkowo pogłębił spadek produkcji barwników, natomiast diklofenak (300 μ M) okazał się wyjątkowo toksyczny, powodując śmierć komórek w tych warunkach. W warunkach diety zubożonej z dodatkiem diklofenaku, nie udało się oznaczyć pomocniczych barwników fotosyntetycznych w ostatnim dniu inkubacji ze względu na śmierć komórek. Zaskakujący jest jednak efekt ibuprofenu (300 μ M), który w pożywce bez węgla stymulował produkcję fikobiliprotein, zaobserwowany przyrost był znaczący. Fikobiliproteiny mogły pełnić rolę ochronną, co wyjaśniałoby ich zwiększoną produkcję, ale niezwykle jest jednak to, że tak intensywna synteza tych barwników miała miejsce w pożywce pozbawionej związków węgla. Badania sugerują, że fikobiliproteiny pełnią nie tylko funkcję pomocniczą w procesie fotosyntezy i działają jako przeciwutleniacze, ale mogą także służyć jako magazyn pierwiastków, które są kluczowe dla przetrwania sinic. Możliwe, że w tym przypadku zaobserwowano, jak komórki wykorzystują fikobiliproteiny do gromadzenia węgla, co mogło być odpowiedzią na stres wywołany obecnością ibuprofenu lub próbą zminimalizowania jego toksycznego działania.

4.3.7.2. Efektywność biosorpcji testowanych ksenofarmaceutyków z medium hodowlanego przez *A. platensis*

Najciekawsze wyniki uzyskano podczas badań nad zdolnością *Arthrospira platensis* do usuwania testowanych leków z medium hodowlanego (Rys. 31). W każdej z prób efektywność biosorpcji była bardzo wysoka, co potwierdza skuteczność tego mikroorganizmu w tego rodzaju zastosowaniach. W odróżnieniu jednak od gatunków słodkowodnych, nie można dostrzec wyraźnej zależności pomiędzy rozwojem komórek i zmianami metabolicznymi a wydajnością usuwania leków. Co ciekawe, usunięcie związków węgla z diety nie miało znaczącego wpływu na efektywność biosorpcji, a przeciwnie znacząco hamowało rozwój sinicy w układach z paracetamolem i diklofenakiem. Hodowla z diklofenakiem przeciwnie obumierała po 21 dniach, a mimo to w tym czasie DCF ubywało z diety w znacznym stopniu. Może to oznaczać, że diklofenak nie działał bezpośrednio toksycznie na komórki *A. platensis*, lecz proces jego usuwania lub powstałe metabolity okazały się dla komórek zabójcze. Niemniej jednak, zanim hodowla całkowicie obumarła, komórki zdążyły usunąć znaczną część diklofenaku.



Rysunek 31 Efektywność biosorpcji testowanych leków przez gatunek *Arthrospira platensis* w 21 dniu hodowli (n=9; RSD < 10%).)

Również duży potencjał sorpcyjny wykazuje *Arthrospira platensis*, kiedy do pełnej pożywki wprowadzono mieszaniny testowanych leków. Na przykład, dla stężenia 300 µM efektywność biosorpcji paracetamolu i diklofenaku utrzymuje się na wysokim poziomie, zbliżonym do 100%. Nieco słabiej gatunek ten radzi sobie z IBF, ale mimo to wyniki skuteczności usuwania z medium hodowlanego tego ksenofarmaceutyku są nadal satysfakcjonujące (ok. 80%).

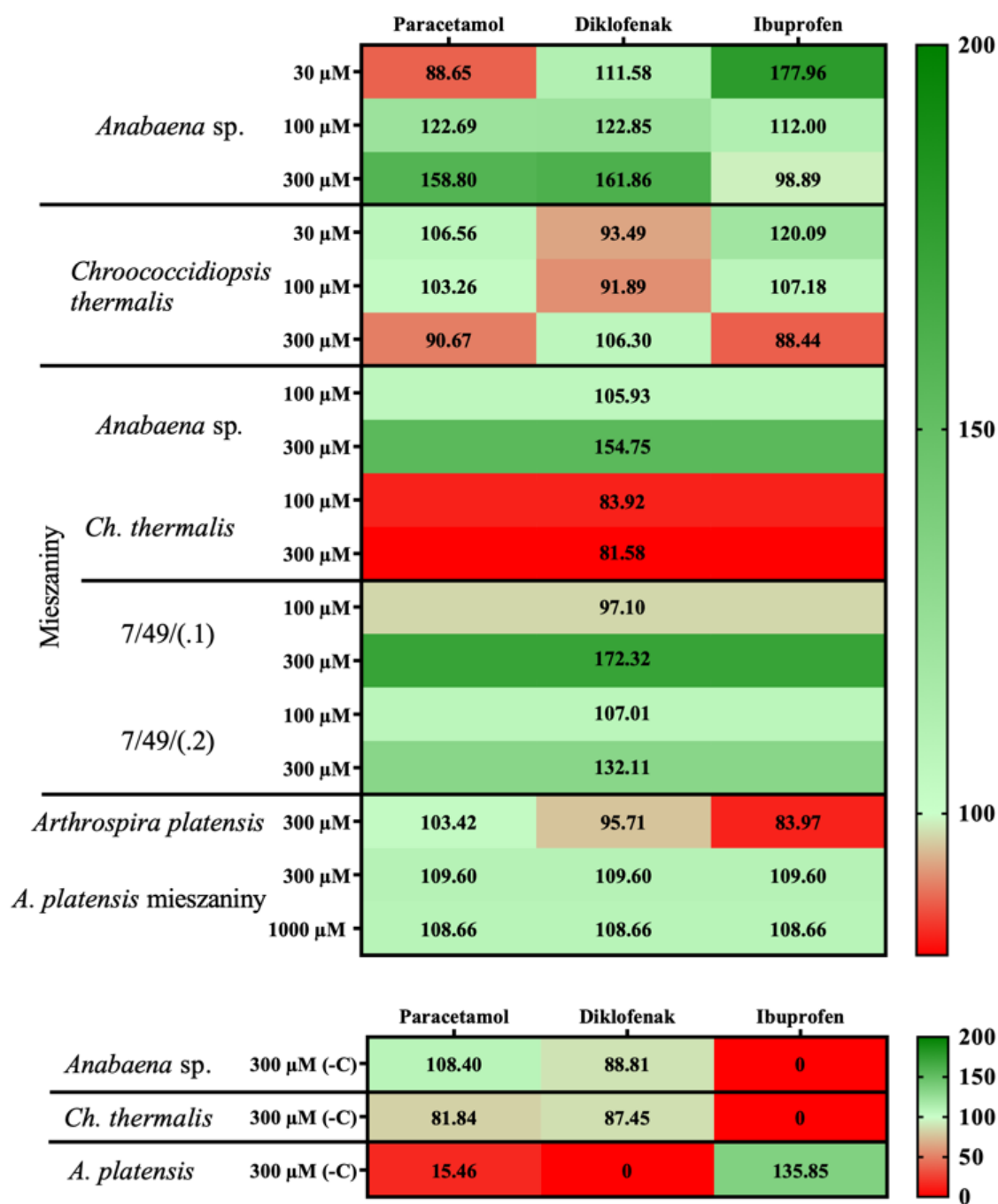
Interesującym wynikiem w przypadku mieszanin badanych związków była równie wysoka skuteczność radzenia sobie z obecnymi w hodowli lekami, których stężenie na początku wynosiło aż 1000 µM. W przypadku *Arthrospira platensis* można stosować wyższe stężenia leków w warunkach laboratoryjnych, ponieważ jest to gatunek halofilny, czyli przystosowany do życia w środowiskach słonowodnych. Gatunki halofilne, takie jak *A. platensis*, charakteryzują się większą odpornością na stresory środowiskowe, w tym na zmiany zasolenia, dostępność składników odżywczych, a także na działanie toksycznych substancji, takich jak ksenofarmaceutyki. W porównaniu do gatunków słodkowodnych, które żyją w bardziej stabilnych środowiskach, gatunki halofilne wykształciły mechanizmy obronne, które pozwalają im lepiej radzić sobie z trudniejszymi warunkami. Mechanizmy te mogą obejmować bardziej efektywne systemy detoksykacji, zwiększoną odporność błon komórkowych na uszkodzenia oraz zdolność do szybszej regeneracji. Właśnie te cechy sprawiają, że *A. platensis* jest w stanie przetrwać i efektywnie działać w obecności wyższych stężeń leków niż gatunki słodkowodne. Tym bardziej uzyskany wynik jednoznacznie potwierdza, że *A. platensis* dużo lepiej radzi sobie z usuwaniem tych farmaceutyków ze środowiska, w którym bytuje. Dla porównania badane wcześniej gatunki słodkowodne w miarę skutecznie radziły sobie z usuwaniem paracetamolu, natomiast w przypadku DFC i IBF skuteczność biosorpcji nie przekraczała 20-30%. Paracetamol, diklofenak i ibuprofen, podobnie jak miało to miejsce w przypadku gatunków słodkowodnych, były adsorbowane na powierzchni komórek *A. platensis* w niewielkim stopniu (<4%). Wskazuje to,

że niezależnie od rodzaju cyjanobakterii, halofilne lub słodkowodne, badane ksenofarmaceutyki nie wiążą się trwale z ścianami komórkowymi cyjanobakterii. Wskazuje to również, podobnie jak miało to miejsce w przypadku gatunków słodkowodnych, na zdolność gatunku *A. platensis* do biotransformacji badanych substancji. Z tego względu nie zaprezentowano danych dotyczących adsorpcji badanych ksenofarmaceutyków na powierzchni komórek testowanej halofilnej cyjanobakterii.

Podsumowując, wyniki te pokazują, że *A. platensis* wykazuje wysoką efektywność w usuwaniu wszystkich testowanych leków, niezależnie od warunków hodowli i stężenia leków. Nieco gorzej gatunek ten radzi sobie z IBF. Widać istotne różnice między gatunkami słodkowodnymi, a słonowodnymi, takimi jak *Arthrospira platensis*. Gatunki halofilne wykazują większą odporność na stresory środowiskowe i wyższe stężenia testowanych leków, co przekłada się na ich wyższą efektywność biosorpcji. W przeciwieństwie do gatunków słodkowodnych, *A. platensis* może efektywnie usuwać leki, nawet w trudniejszych warunkach, kiedy stężenie ksenobiotyków jest zdecydowanie wyższe, co podkreśla różnice w mechanizmach przystosowawczych obu typów organizmów.

4.3.8. Podsumowanie zdolności biosorpcji testowanych leków przez cyjanobakterie

Aby podsumować rozdziały 4.2 i 4.3. dotyczące zdolności cyjanobakterii do biosorpcji testowanych leków oraz ich wpływu na rozwój badanych sinic, przygotowano zestawienie wyników w formie map ciepła (ang. *heatmap*). Jest to graficzna metoda prezentacji danych, która pozwala na wizualizację dużej liczby zmiennych lub wyników w formie kolorowych bloków, gdzie kolor reprezentuje wartość danej zmiennej. Im intensywniejszy kolor, tym wyższa lub niższa jest wartość, w zależności od przyjętej skali kolorystycznej. Ponadto, dzięki kolorystycznemu odwzorowaniu danych mapa ciepła pozwala na szybkie wykrycie trendów, różnic lub anomalii. Na pierwszym wykresie uwzględniono zestawienie wartości współczynnika wzrostu, wyrażonego w procentach względem kontroli (100%), dla testowanych gatunków cyjanobakterii w różnych układów eksperymentalnych (Rys. 32). Mapa ciepła ukazuje wyniki w procentach względem kontroli, gdzie 100% oznacza brak wpływu na wzrost (wartość kontrolna), wartości powyżej 100% wskazują na wzrost stymulowany, a poniżej 100% – na hamowanie wzrostu. Zestawienie obejmuje hodowle z pojedynczymi związkami i ich mieszaninami, hodowle w których jedynym źródłem węgla był testowany farmaceutyk, oraz układy zawierające konsorcja cyjanobakterii słodkowodnych. Na podstawie przedstawionej mapy ciepła (*heatmap*) można zinterpretować wpływ trzech testowanych leków: paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu na wzrost trzech różnych gatunków cyjanobakterii, takich jak *Anabaena sp.*, *Chroococcidiopsis thermalis* i *Arthrospira platensis*.

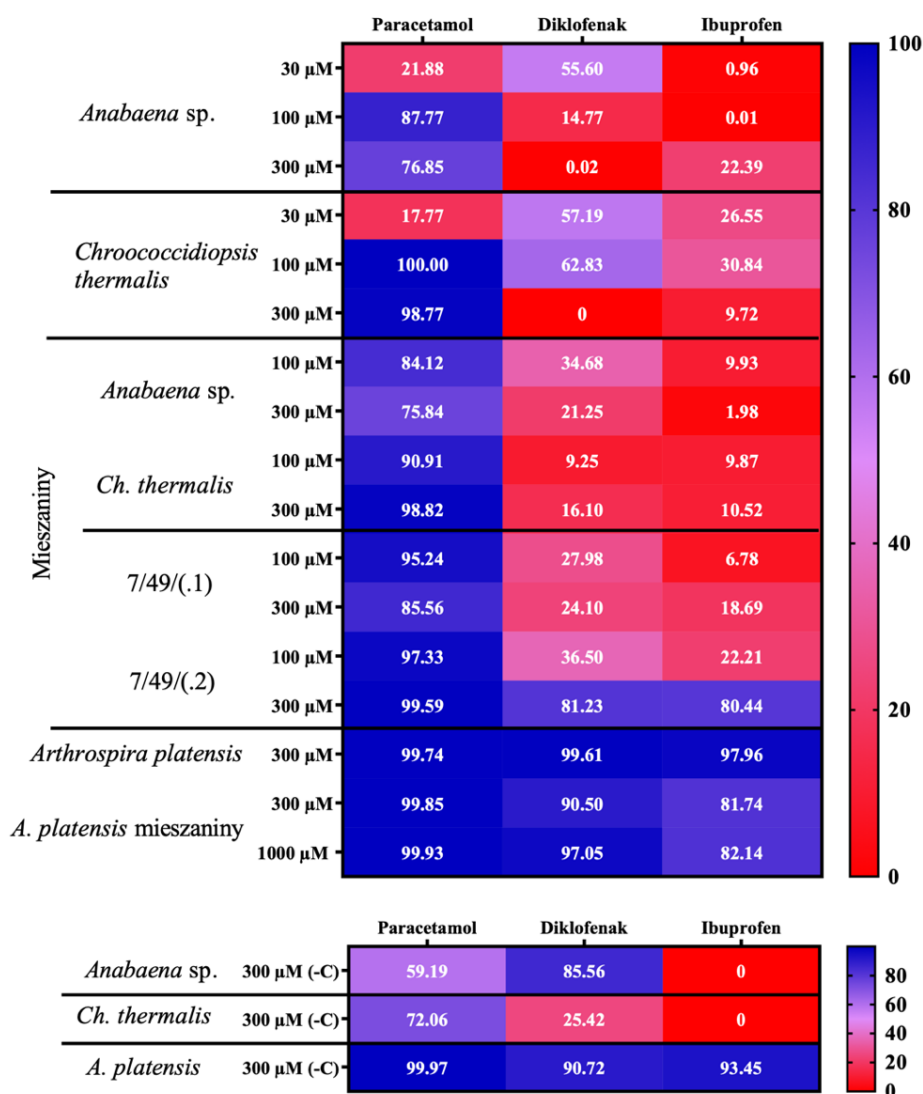


Rysunek 32 Porównanie wartości współczynnika wzrostu testowanych gatunków cyjanobakterii, przedstawionego w procentach względem kontroli (100%), w kontekście wszystkich badanych układów eksperymentalnych.

W warunkach pełnej pożywki, większość gatunków sinic wykazywała stabilny wzrost, z wyjątkowo dobrą efektywnością. W przypadku gatunku *Anabaena* sp, wzrost stężenia DCF i PAR w pożywce stymulował tę cyjanobakterie do rozwoju i namnażania komórek. Natomiast IBF wywoływał dokładnie odwrotny efekt. Co ciekawe, mniej wrażliwy na obecność ksenofarmaceutyków w medium hodowlanym był drugi gatunek sinic słodkowodnych *Chroococcidiopsis thermalis*. Tylko PAR i IBF nieznacznie hamowały wzrost komórek wraz ze wzrostem stężenia poszczególnych leków. Ale kiedy w pożywce znajdowały się wszystko trzy leki, *Chroococcidiopsis thermalis* gorzej się rozwijał, podczas gdy *Anabaena* sp. wręcz przeciwnie radził sobie zdecydowanie lepiej. Ta sama sytuacja dotyczyła *Arthrospira platensis*. Ten słonowodny gatunek wydawał się być niewrażliwy na działanie obecnych w pożywce ksenofarmaceutyków. Taka reakcja sugeruje wyjątkowe adaptacje tego gatunku w obecności stresorów środowiskowych. Co ciekawe, tzw. układy dwugatunkowe (konsorcja) również radziły sobie dużo lepiej z obecnością testowanych ksenofarmaceutyków w medium hodowlanym. Uzyskane wyniki potwierdziły jednoznacznie, że wraz ze wzrostem stężenia leków obserwowano wzrost intensywności rozwoju badanych mikroorganizmów, kiedy znajdowały się one w tym samym układzie hodowlanym. Również w warunkach z ograniczonym dostępem węgla, okazało się, że zarówno PAR i DCF umożliwiają dość skuteczny rozwój gatunków słodkowodnych. Jedynie IBF skutkował tym, że rozwój sinic *Anabaena* sp. i *Chroococcidiopsis thermalis* był zahamowany całkowicie, a komórki obumierały. Ku zaskoczeniu odmienną sytuację obserwowano dla układów, w których wykorzystywano gatunek słonowodny. Dla *Arthrospira platensis* zarówno PAR jak i DCF działał toksycznie, zaś IBF okazał się być doskonałym stymulatorem wzrostu. Za pomocą map ciepła porównano również dane dotyczące stężenia karotenoidów i fikobiliprotein w komórkach. Dane zamieszczono w suplemencie (Rysunek S1 i S2).

Aby ułatwić porównanie skuteczności biosorpcji testowanych leków przez używane do badań cyjanobakterie poniżej również posłużono się zestawieniem w formie map ciepła (Rys. 33). Z analizy wyników przedstawionych na mapie ciepła można wyciągnąć istotne wnioski dotyczące zdolności cyjanobakterii do sorpcji trzech testowanych leków: paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu. Każdy z tych związków wykazuje różne poziomy sorpcji w zależności od gatunku cyjanobakterii, stężenia leku i warunków pożywki. Paracetamol, będący jednym z najczęściej stosowanych leków przeciwbólowych, jest eliminowany z medium hodowlanego przez wszystkie testowane gatunki cyjanobakterii z bardzo wysoką skutecznością. W każdym układzie, niezależnie od stężenia, zarówno *Anabaena* sp., *Chroococcidiopsis thermalis*, jak i *Arthrospira platensis* wykazują często niemal 100% skuteczności sorpcji tego leku. Oznacza to, że paracetamol jest łatwo usuwany z medium hodowlanego przez cyjanobakterie, nawet w trudnych warunkach, takich jak brak węgla w pożywce. Jego wysoka rozpuszczalność w wodzie i polarny charakter mogą tłumaczyć te wyniki. Natomiast popularne niesteroidowe leki przeciwzapalne już tak chętnie nie są usuwane z pożywki przez cyjanobakterie słodkowodne.

Przy dużych stężeniach ksenofarmaceutyków zarówno *Chroococcidiopsis thermalis* jak i *Anabaena sp.*, słabiej radziły sobie z biosorpcją tych dwóch leków. Przy czym największe wyzwanie stanowił ibuprofen. Dla odmiany gatunek słonowodny *Arthrospira platensis* radził sobie ze wszystkimi farmaceutykami praktycznie doskonale. Zarówno paracetamol, diklofenak, jak i ibuprofen były skutecznie usuwane z medium hodowlanego, osiągając niemal 100% efektywności sorpcji we wszystkich stężeniach. Nawet w trudnych warunkach pożywki z ograniczonym dostępem węgla, *A. platensis* utrzymywał wysoką skuteczność, co świadczy o jego wyjątkowej adaptacji i zdolności do przetrwania oraz funkcjonowania w obecności różnych ksenofarmaceutyków. Szczególnie wyróżnia się jego zdolność do sorpcji ibuprofenu, który był najmniej efektywnie usuwany przez inne gatunki.



Rysunek 33 Zestawienie wartości efektywności biosorpcji poszczególnych ksenofarmaceutyków, wyrażonego w procentach w porównaniu do próby odniesienia – pożywka z testowanym związkiem bez obecności komórek sinic. Po lewej stronie wykresu zamieszczono stężenia poszczególnych związków lub końcowe stężenia poszczególnych mieszanin.

4.4. Badanie toksyczności

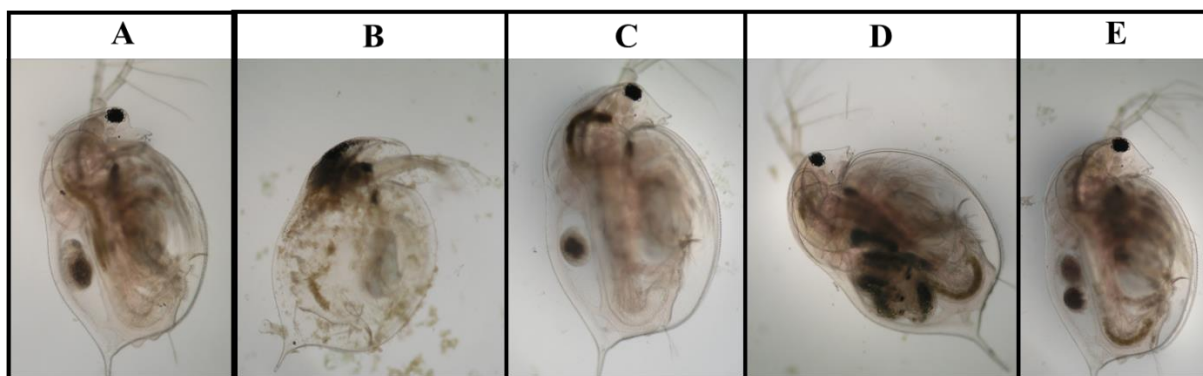
W tym rozdziale przedstawiono wyniki badań dotyczących toksyczności płynów pohodowlanych pochodzących z hodowli *Arthrospira platensis* z dodatkiem wybranych farmaceutyków. Do testów wykorzystano jeden gatunek zwierząt – bezkręgowca *Daphnia magna* oraz dwa gatunki mikroalg – *Chlorella vulgaris* i *Haematococcus pluvialis*. Hodowle z tymi organizmami zostały przygotowane zgodnie z opisem zawartym części eksperymentalnej (rozdział 3.6.) Celem badań było sprawdzenie czy interakcja leków z sinicami w procesie biosorpcji prowadzi do powstawania szkodliwych metabolitów, które mogłyby wpływać negatywnie na inne organizmy wodne. Aby wyeliminować wpływ innych czynników mogących zakłócać ocenę toksyczności, testowano organizmy na płynach pohodowlanych *A. platensis* – gatunku cyjanobakterii, który nie wytwarza toksyn. Wyniki badań odnosiły się wyłącznie do próby kontrolnej, czyli płynów pohodowlanych bez dodatku testowanych substancji. W dalszej części tekstu używane określenia: Paracetamol, Diklofenak, Ibuprofen oraz Mieszanina, odnoszą się do płynów pohodowlanych zawierających te związki. W przypadku mieszaniny, początkowe stężenie wszystkich testowanych substancji wynosiło 300 μ M.

4.4.1. Rozwielitka – *Daphnia Magna*

Jako przedstawiciela królestwa zwierząt wybrano bezkręgowca rozwielitkę *Daphnia magna*, małego skorupiaka, osiągającego od 1 mm do 6 mm długości. Należy ona do rodziny *Daphniidae* i występuje w wodach słodkich niemal we wszystkich strefach klimatycznych. Czasami potrafi także tolerować wody o nieco wyższym zasoleniu. Rozwielitki żywią się, filtrując wodę z drobnych cząstek organicznych oraz mikroorganizmów. Ich ciało pokrywa przezroczysty pancerz chitynowy, co umożliwia łatwe obserwowanie, pod mikroskopem, różnych procesów fizjologicznych, takich jak bicie serca czy rozwój jaj w worku lęgowym [De Coen, 2001; Heckmann, 2018; Tkaczyk, 2021]. Dzięki swojej dużej wrażliwości na zmiany w środowisku, *Daphnia magna* jest często używana w badaniach toksyczności i ocenie czystości wód.

Naukowcy mogą oceniać toksyczność poprzez monitorowanie różnych wskaźników, takich jak zmiany w pulsie, ruchliwości, liczbie nowo narodzonych osobników, czy poprzez porównanie liczby żywych i martwych organizmów. Ze względu na szerokie występowanie tego gatunku i jego nieskomplikowaną budowę, rozwielitki są doskonałym organizmem modelowym do badań nad toksycznością w środowiskach wodnych. Ponadto, badania z udziałem rozwielitek nie wymagają specjalnych pozwoleń.

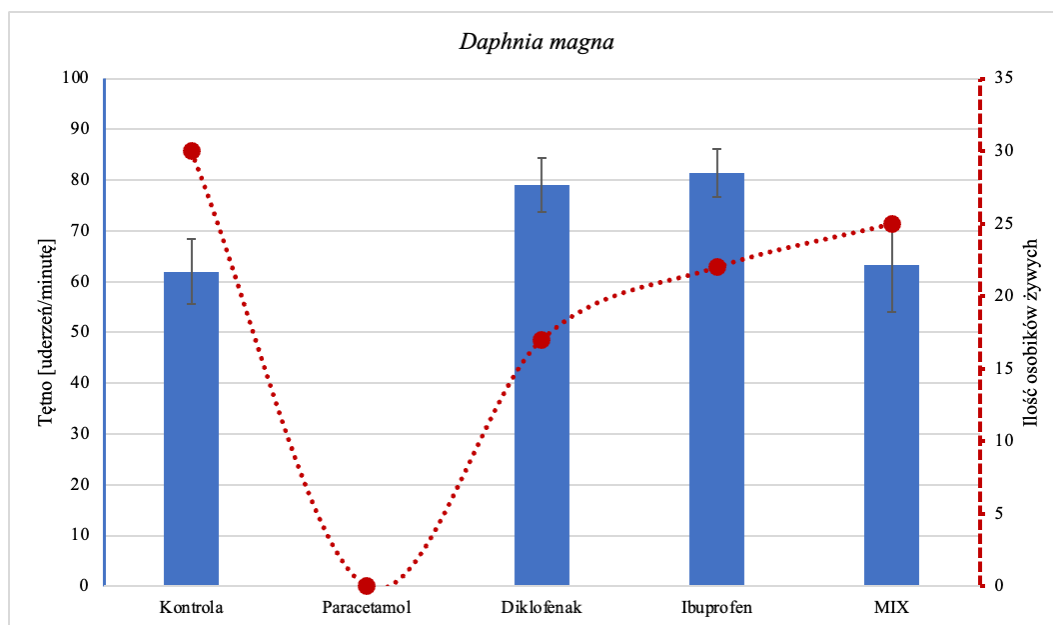
W pierwszym etapie badania przeanalizowano morfologię rozwielitek, które inkubowano w płynach pohodowlanych (Rys. 34). Z każdego układu eksperymentalnego wybrano trzy żywe osobniki i obserwowano je pod mikroskopem optycznym. Zdjęcia rozwielitek dla poszczególnych układów przedstawiono poniżej. W przypadku płynów pohodowlanych zawierających paracetamol, z powodu braku żywych osobników, sfotografowano jedną z martwych rozwielitek.



Rysunek 34 Mikroskopowe zdjęcia rozwielitek (*Daphnia magna*) wykonane przy 100-krotnym powiększeniu. Litery nad zdjęciami odpowiadają osobnikom inkubowanym w różnych płynach pochodowlanych: A – kontrola, B – paracetamol, C – diklofenak, D – ibuprofen, E – mieszanina.

Na zdjęciach widać (Rys. 38), że inkubacja rozwielitek w płynach pochodowlanych nie spowodowała znaczących zmian morfologicznych u większości osobników. Wyjątek stanowiły rozwielitki inkubowane w płynach po biosorpcji paracetamolu, gdzie wszystkie osobniki zginęły. Na zdjęciu widać martwą rozwielitkę z częściowo zdegradowanymi organami wewnętrznymi oraz zachowanym chitynowym pancerzem. W pozostałych próbach nie zaobserwowano istotnych zmian w fizjologii rozwielitek.

Poniżej na wykresie słupkowym zobrazowano średnie tętno badanych osobników, natomiast wykres punktowy pokazuje średnią liczbę przeżywających rozwielitek (rys. 35).



Rysunek 35 Wpływ płynów pochodowlanych pochodzących z hodowli *Arthrospira platensis* z dodatkiem wybranych farmaceutyków na liczebność żywych osobników *Daphnia magna* oraz tętno bicia ich serca (n=3., RSD <10%).

Wyniki przedstawione na powyższym wykresie wskazują, że tylko płyn pochodowlany z dodatkiem paracetamolu powodował całkowitą śmierć testowanych organizmów. Warto podkreślić, że paracetamol był najlepiej biosorbowanym związkiem spośród wszystkich badanych leków. Jednym z możliwych

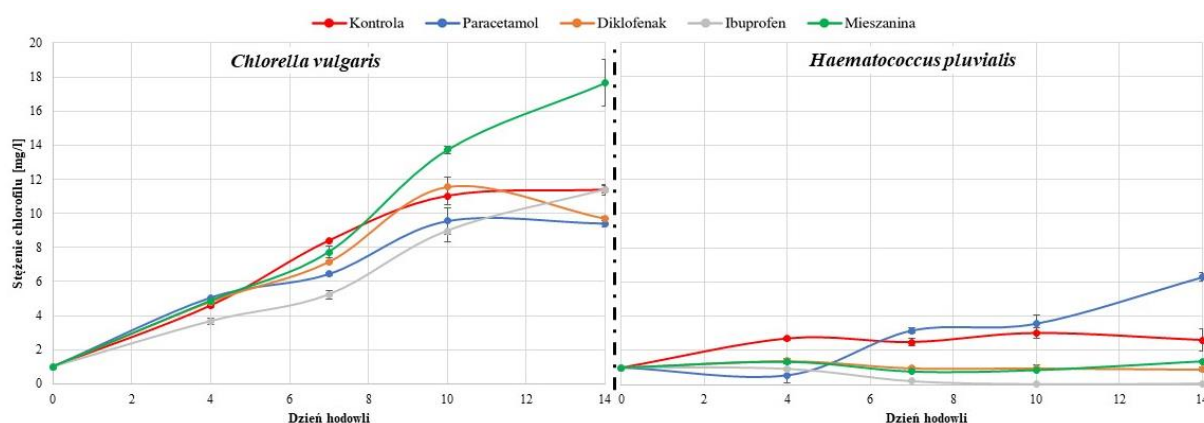
powodów tego efektu może być jeden z metabolitów paracetamolu - N-Acetylo-p-benzochinonoimina (NAPQI) [Thijssen, 2004; Ghaffar, 2014]. Związek ten jest pochodną paracetamolu, która powstaje w reakcji tego leku z enzymami grupy cytochromów P450 (E.C. 1.14.) [Robert, 2010]. Przedstawiciele tych katalitycznych białek są obecni niemal w większości organizmów, w tym również u sinic. Działanie toksyczne NAPQI polega na inhibicji enzymów szlaku metabolicznego witaminy K oraz topoizomera DNA (E.C. 5.6.2.1), które katalizują zmiany w topografii DNA [Bender, 2004]. W wyniku biosorpcji i biotransformacji paracetamolu przez cyjanobakterie, może dochodzić do przekształcania paracetamolu w toksyczne metabolity, które mają szkodliwy wpływ na inne organizmy wodne. W pozostałych przypadkach płyny pochodzące uzyskane z eksperymentów wykazywały nieco wyższą toksyczność w porównaniu do próby kontrolnej. Przejawiało się to większą liczbą martwych rozwiłitek oraz podwyższonym tętnem u tych, które przeżyły. Co ciekawe, płyny z mieszaniną testowanych związków okazały się najmniej toksyczne. Zaskakujący jest fakt, że pojedyncze związki były bardziej toksyczne niż ich kombinacja. Szczególnie ważne jest to w kontekście płynów pochodzących, w których stosowano na początku paracetamol, które wykazały najwyższą toksyczność. Może to wynikać z różnych procesów metabolicznych zachodzących w *A. platensis* pod wpływem mieszaniny związków, co zresztą potwierdzają różnice widoczne w proporcjach pigmentów oznaczonych w komórkach, bezpośrednio po zakończeniu hodowli (Rys. 30).

4.4.2. Mikroalgi – *Chlorella vulgaris* i *Haematococcus pluvialis*

Do testów toksyczności płynów pochodzących wobec organizmów roślinnych wybrano dwóch przedstawicieli mikroalg, które zamieszkują środowiska wodne i wodno-łądowe. Choć mikroalgi mogą na pierwszy rzut oka przypominać sinice (i czasami są z nimi mylone), jako rośliny różnią się od nich znacznie. Ich reakcje na stresory bywają zupełnie inne niż u sinic, co zostało udowodnione w badaniach [Churro, 2010; de Farias Silva, 2019; Le, 2023; Kupriyanova, 2023]. Dlatego, w tej części pracy przedstawiono wpływ płynów pochodzących, które powstały po procesie biosorpcji leków przez cyjanobakterie *Arthrospira platensis*, na roślinne organizmy testowe *Chlorella vulgaris* i *Haematococcus pluvialis*.

Na poniższym wykresie (Rys. 36) przedstawiono rozwój dwóch testowanych gatunków mikroalg w płynach pochodzących uzyskanych po procesie biosorpcji leków przez cyjanobakterie *A. platensis* (Rys. 31). Wzrost mikroalg został przedstawiony jako stężenie chlorofilu w komórkach, mierzone w trakcie 14-dniowej inkubacji. Kolory w legendzie odpowiadają różnym płynom pochodzącym, w których testowano biosorpcję leków w stężeniu 300 µM: paracetamol (niebieski), diklofenak (pomarańczowy), ibuprofen (szary) oraz mieszanina trzech leków o łącznym stężeniu 300 µM (oznaczona kolorem zielony). Wyniki porównano z próbą kontrolną (oznaczoną kolorem czerwony), czyli płynem pochodzącym, w którym na żadnym etapie nie znajdowały się testowane

związki.



Rysunek 36 Rozwój dwóch gatunków mikroalg w płynach pohodowlanych *A. platensis* – stężenie chlorofilu w czasie 14-dniowej inkubacji (n=3., RSD <10%)

Testy wykazały około 20% spowolnienie wzrostu komórek *Ch. vulgaris* w drugim tygodniu inkubacji w płynach pohodowlanych z pojedynczymi związkami. Inaczej sytuacja wyglądała w przypadku płynów pohodowlanych w których stosowano mieszaniną leków. W tym przypadku komórki znacznie przyspieszyły rozwój, co było szczególnie widoczne w drugim tygodniu hodowli. Z kolei dla drugiego testowanego gatunku, *Haematococcus pluvialis*, zaobserwowano inny efekt. Zarówno w próbie kontrolnej, jak i w płynach pohodowlanych z diklofenakiem oraz mieszaniną leków, rozwój komórek był stabilny od 4. dnia inkubacji, choć zauważono jego toksyczne działanie. Szczególnie płyn po biosorpcji ibuprofenu okazał się wyjątkowo toksyczny dla *H. pluvialis*, prowadząc do całkowitej śmierci hodowli już w 10. dniu inkubacji. Co ciekawe, w przeciwieństwie do *Daphnia magna* i *Chlorella vulgaris*, płyn po biosorpcji paracetamolu nie tylko nie wykazywał toksycznego działania na *H. pluvialis*, ale wręcz stymulował wzrost tego gatunku w późniejszym okresie inkubacji (7–14 dzień). Warto porównać te wyniki z hodowlami sinic z dodatkiem paracetamolu, gdzie podobnie nie odnotowano toksycznego wpływu w ostatnich dniach hodowli, co sugeruje, że potencjalne metabolity tego związku nie wpływają toksycznie również na cyjanobakterie. Oznacza to, że toksyczność płynów po biosorpcji jest specyficzna dla gatunku i zależy od budowy komórki oraz systemu metabolicznego. Warto także zwrócić uwagę na różnice w krzywych wzrostu i intensywności rozwoju dwóch gatunków mikroalg. *Chlorella vulgaris* to kulista mikroalga (o średnicy 2–10 µm), której budowa przypomina klasyczną komórkę roślinną. Jej ściana komórkowa zbudowana jest głównie z chitozanu, a jej struktura i skład mogą się zmieniać w zależności od warunków środowiskowych. *Chlorella* rozwija się szybko i jest bardzo odporna na zmienne warunki oraz konkurencję z innymi mikroorganizmami. Osiąga to m.in. poprzez zmiany w zawartości lipidów i skrobi oraz ograniczanie wzrostu komórek. Istnieją również doniesienia, że *Chlorella* może produkować biomasę bez udziału światła, korzystając jedynie z węgla organicznego, co świadczy o jej zdolności do heterotroficznego odżywiania się. Prowadzi to do szybszego wzrostu komórek, jednocześnie zmniejszając akumulację wewnętrznych składników, takich jak lipidy [Safi, 2014]. Dane literaturowe, że ta mikroalga może

odżywiać się zarówno autotroficznie, jaki i heterotroficznie [Ru, 2019; Ahmad, 2020]. Z kolei *Haematococcus pluvialis* wyróżnia się innymi cechami. Ma wolne tempo wzrostu i mniejszą liczbę komórek w hodowlach w porównaniu do większości mikroalg. Jest również bardzo wrażliwa na zmiany środowiskowe, w tym na zanieczyszczenia. Charakterystyczną cechą tego gatunku jest obecność sporopoleiny – spolimeryzowanego karotenoidu – w ścianie komórkowej, co nadaje jej sztywność i zwiększa wytrzymałość [Borowiak, 2021; Hagen, 2002; Montsant, 2001]. Mimo niskiej odporności na zmienne warunki, jak pokazano wcześniej, *H. pluvialis* najlepiej radziła sobie w płynach pohodowlanych po biosorpcji paracetamolu.

4.5. Identyfikacja metabolitów badanych ksenofarmaceutyków biosyntezyowanych przez cyjanobakterie

Identyfikacja metabolitów powstałych w wyniku działania ksenofarmaceutyków stanowi istotny element analizy procesów biosorpcyjnych. Zrozumienie mechanizmów przekształcania chemicznych zanieczyszczeń jest kluczowe w ocenie skuteczności biotransformacji i wpływu tych procesów na środowisko. W trakcie biotransformacji ksenofarmaceutyków, cyjanobakterie mogą adsorbować te związki na swojej powierzchni oraz uczestniczyć w ich przekształceniach chemicznych. Metabolity powstające w procesach biotransformacji mogą być produktami hydrolizy, oksydacji, redukcji czy koniugacji z innymi związkami, co może prowadzić do powstawania nowych produktów, które są mniej toksyczne lub łatwiejsze do wydalania ze środowiska. Poza tym cyjanobakterie jako aktywne biosorbenty, mogą wydzielać substancje wspomagające rozkład ksenobiotyków i ich ewentualną detoksyfikację [Pannard, 2016; Sarmah, 2020]. W przypadku większości ksenofarmaceutyków, metabolity mogą być wynikiem rozkładu struktur pierwotnych leków na bardziej hydrofilowe związki, które mają mniejszą aktywność biologiczną. Proces ten może obejmować hydrolizę wiązań chemicznych, oksydację grup funkcyjnych lub powstawanie związków o zmniejszonej masie cząsteczkowej. W określonych warunkach może również dochodzić do tworzenia dimerów.

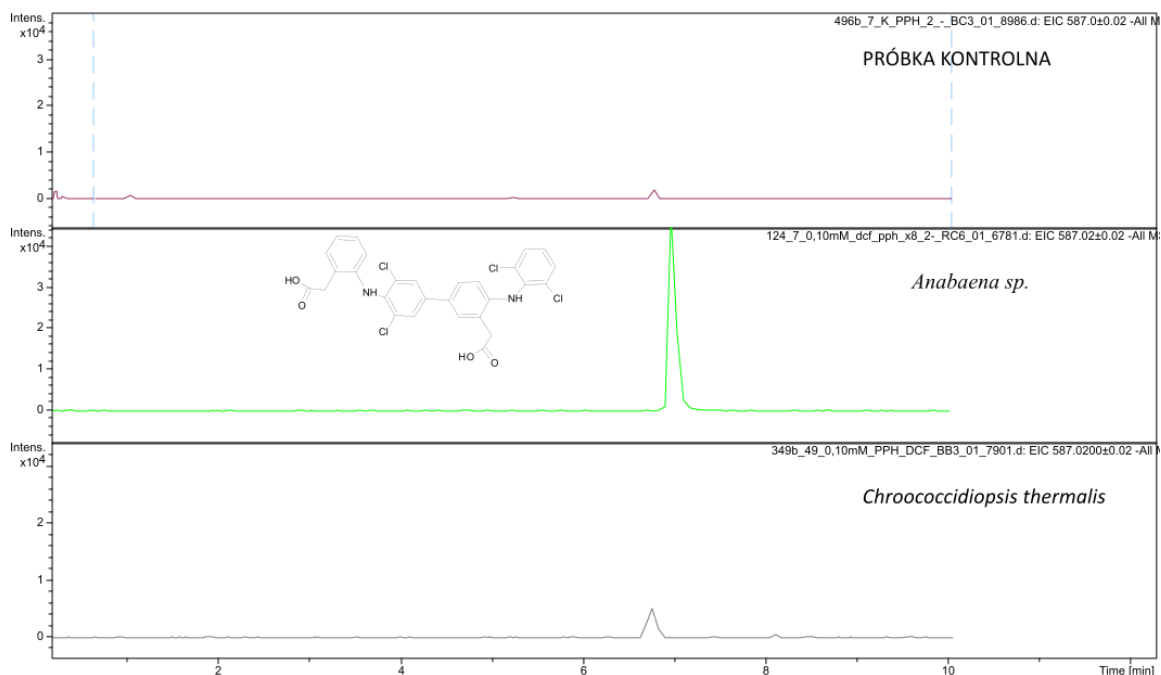
Ponieważ ksenofarmaceutyki, takie jak między innymi niesteroidowe leki przeciwzapalne, wykazują dużą trwałość w środowisku oraz często działają toksycznie nawet w niewielkich stężeniach, ich biotransformacja staje się istotnym elementem ochrony środowiska. Dlatego, w ramach niniejszej pracy cyjanobakterie badano pod kątem ich zdolności nie tylko do adsorpcji farmaceutyków na powierzchni komórek, ale przede wszystkim skutecznego usuwania z medium hodowlanego badanych leków oraz ich ewentualnej biotransformacji w metabolity. Zidentyfikowanie powstających metabolitów jest kluczowe dla oceny czy procesy biotransformacji prowadzą do zmniejszenia toksyczności zanieczyszczeń oraz czy produkty uboczne nie stanowią dodatkowego zagrożenia dla ekosystemów. To zadanie okazało się jednak być najtrudniejsze do realizacji w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Ze względu na złożoność badanych procesów biochemicznych identyfikacja potencjalnych metabolitów okazała się szczególnie wymagająca. Do badań nad identyfikacją metabolitów testowanych

leków zastosowano technikę chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS), która umożliwiła precyzyjne wykrywanie związków chemicznych.

W pierwszym etapie badań skoncentrowano się na analizie próbek z hodowli, w których cyjanobakterie były poddane działaniu pojedynczych farmaceutyków. Założono, że szczegółowa obserwacja procesów biotransformacji każdego z badanych związków z osobna umożliwi dokładniejsze śledzenie zmian chemicznych zachodzących podczas biosorpcji i biotransformacji. W trakcie eksperymentów stwierdzono obecność, w płynie pohodowlanym *Anabaena* sp. inkubowanym z diklofenakiem, dodatkowego pików przy $t_r = 7$ min o wartości m/z 587,01, którego nie wykryto w próbce kontrolnej (referencyjnej) (Rys. 37). Ta obserwacja bezpośrednio sugerowała obecność potencjalnego metabolitu diklofenaku. Co ciekawe jon $[M-H]^-$ o wartości m/z 587,01 to dimer DCF ($C_{28}H_{20}Cl_4N_2O_4$), którego widmo MS i widmo fragmentacyjne (MS/MS) z rozkładem monoizotopowym charakterystycznym dla związków zawierających w swojej strukturze atomy chloru, przedstawiono na Rys. 38. Z doniesień literaturowych wiadomo, że dimery DCF powstają w wyniku procesów oksydacyjnych, podczas których dwie cząsteczki diklofenaku łączą się, tworząc bardziej złożony związek chemiczny [Lucas, 2014; Nackiewicz, 2021; Nackiewicz, 2023]. Proces ten może zachodzić zarówno w warunkach biologicznych (wewnątrz organizmów), jak i w warunkach laboratoryjnych, zwłaszcza w obecności katalizatorów i utleniaczy. W organizmie zwierząt diklofenak jest metabolizowany przez enzymy, głównie z grupy cytochromów P450 [Li, 2017]. A przecież, cyjanobakterie są zdolne do przeprowadzania różnych reakcji biochemicznych, w tym procesów redoks (utleniania i redukcji), co może sugerować, że mogą brać udział w przemianach związków organicznych, takich jak diklofenak. Najprawdopodobniej obecność w komórkach sinic porfiryn oraz enzymów zawierających jony metali sprzyja procesom redoks, w tym przekształcaniu między innymi diklofenaku w jego dimer. Co istotne, biotransformacja diklofenaku do dimeru z udziałem cyjanobakterii nie była wcześniej opisana w literaturze.

W tym miejscu należy podkreślić, że zdolność do biotransformacji diklofenaku do formy dimeru zaobserwowano jedynie u gatunku *Anabaena* sp., podczas gdy w przypadku *Ch. thermalis* obecności D-DCF w medium pohodowlanym nie stwierdzono (Rys. 39). Te różnice mogą wynikać z większej wrażliwości *Anabaena* sp. na obecność diklofenaku w podłożu, co potwierdzają wcześniejsze wyniki badań zrealizowane w ramach niniejszej pracy doktorskiej, a które dotyczyły wpływu diklofenaku na rozwój badanych sinic. Ponadto dimer $C_{28}H_{20}Cl_4N_2O_4$ został potwierdzony wyłącznie w hodowlach z *Anabaena* sp. w sytuacjach, gdy diklofenak był obecny w roztworze jako czynnik stresowy. W pozostałych hodowlach, zarówno w układach z mieszaninami leków jak i w płynach pohodowlanych *Arthrospira platensis*, dimeru nie wykryto w ogóle, albo występował on w zdecydowanie mniejszych ilościach (dotyczy eksperymentów z konsorcjami). Obecność tego związku wydaje się więc specyficzna

dla interakcji *Anabaena* sp. z diklofenakiem, co sugeruje, że inne warunki lub organizmy nie prowadzą do jego powstawania.

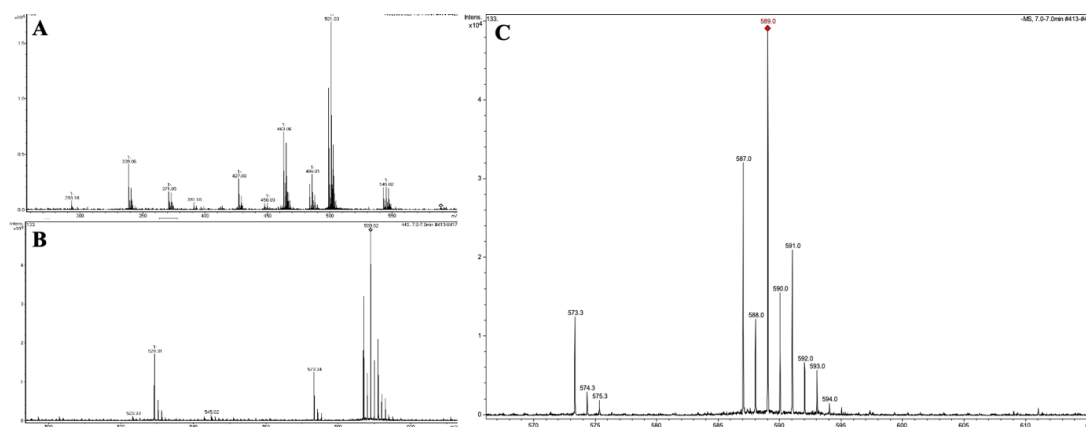


Rysunek 37 Chromatogramy LC-MS, w trybie SIM (m/z 587,02), próbki kontrolnej, próbki z hodowli eksperymentalnej z *Anabaena* sp. oraz *Ch. thermalis* inkubowanych z diklofenakiem (100 μ M) ($n=3$, $RSD<10\%$).

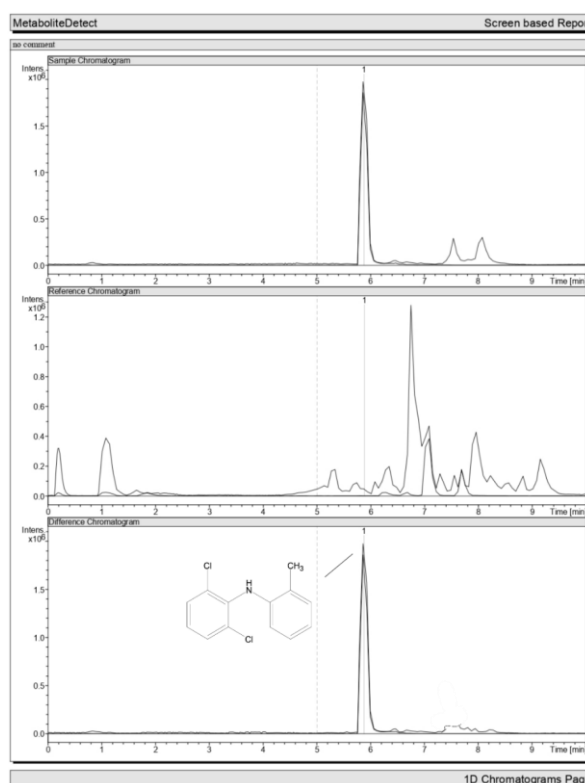
Mimo, że badania nad toksycznością dimerów diklofenaku dla różnych organizmów są ograniczone, dostępne wyniki wskazują, że mogą być one mniej toksyczne niż sam diklofenak. W jednym z badań testowano działanie dimeru DCF na bakterie *E. coli* i stwierdzono, że wyraźny efekt toksyczny pojawiał się dopiero przy stężeniach powyżej 6 μ M [Nackiewicz, 2023]. Co interesujące, opisane dotąd wyniki badań sugerują, że ze względu na większy rozmiar cząsteczki (ok. 600 Daltonów), dimery mają mniejszą zdolność przenikania przez błony komórkowe i ograniczoną interakcję z wewnątrzkomórkowymi strukturami, co zmniejsza ich potencjalne działanie toksyczne [Keen, 2013]. Dodatkowo, cyjanobakterie mogą przekształcać diklofenak w te mniej toksyczne formy, prawdopodobnie jako mechanizm ochronny przed jego szkodliwym działaniem. Takie biotransformacje mogą zmniejszać ogólną toksyczność diklofenaku w środowisku wodnym, choć konieczne są dalsze badania, aby w pełni ocenić wpływ tych metabolitów na organizmy wodne oraz ich bezpieczeństwo środowiskowe.

Ciekawym spostrzeżeniem był fakt, że w płynach pohodowlanych obu bakterii słodkowodnych poddanych działaniu DCF wykryto obecność jonu $[M-H]^-$ m/z = 250,01 (t_r = 5,9 min) (Rys. 39). Wynik ten uzyskano dzięki zastosowaniu programu Bruker Daltonics Metabolite Tools 2.0 SR4, a identyfikacja widm masowych dowiodła, że jon molekularny o wartości m/z 250,01 (Rys. 40) to najprawdopodobniej produkt dekarboksylacji diklofenaku. Chociaż podstawowa dekarboksylacja dotyczy głównie wewnętrznych procesów metabolicznych, wydaje się bardzo prawdopodobnym, że

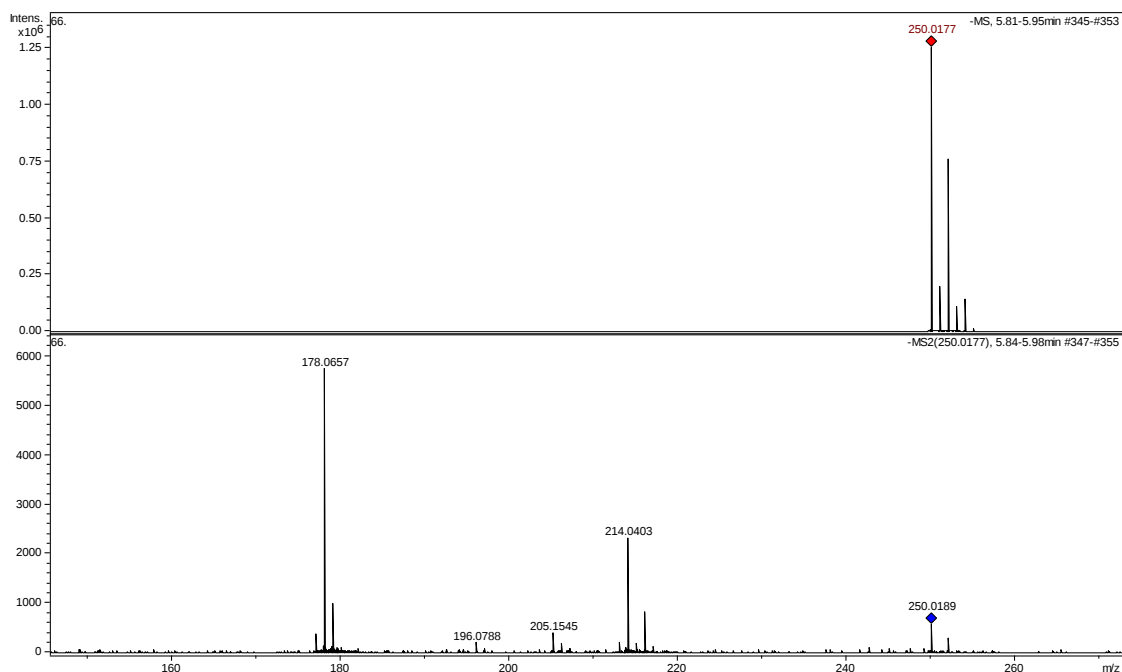
cyjanobakterie mogą także uczestniczyć w biotransformacji ksenobiotyków (w tym farmaceutyków) poprzez mechanizmy obejmujące dekarboksylację. W literaturze ten aspekt nie jest zbyt szeroko opisany, ale enzymatyczny potencjał cyjanobakterii wskazuje, że taka możliwość istnieje, zwłaszcza jeśli odpowiednie enzymy (dekarboksylazy) są obecne i aktywne w danym gatunku [Lei, 2018; Li, 2023].



Rysunek 38 Widma MS i MS/MS związku nr 2 zidentyfikowanego jako dimer DCF, którego obecność potwierdzono w pożywce pochodzącej z hodowli *Anabaena* sp. zawierającej diklofenak jako badany ksenofarmaceutyk. Widmo MS sygnału o wartości m/z 587,02 (A) i odpowiadającemu widma MS/MS (B i C).

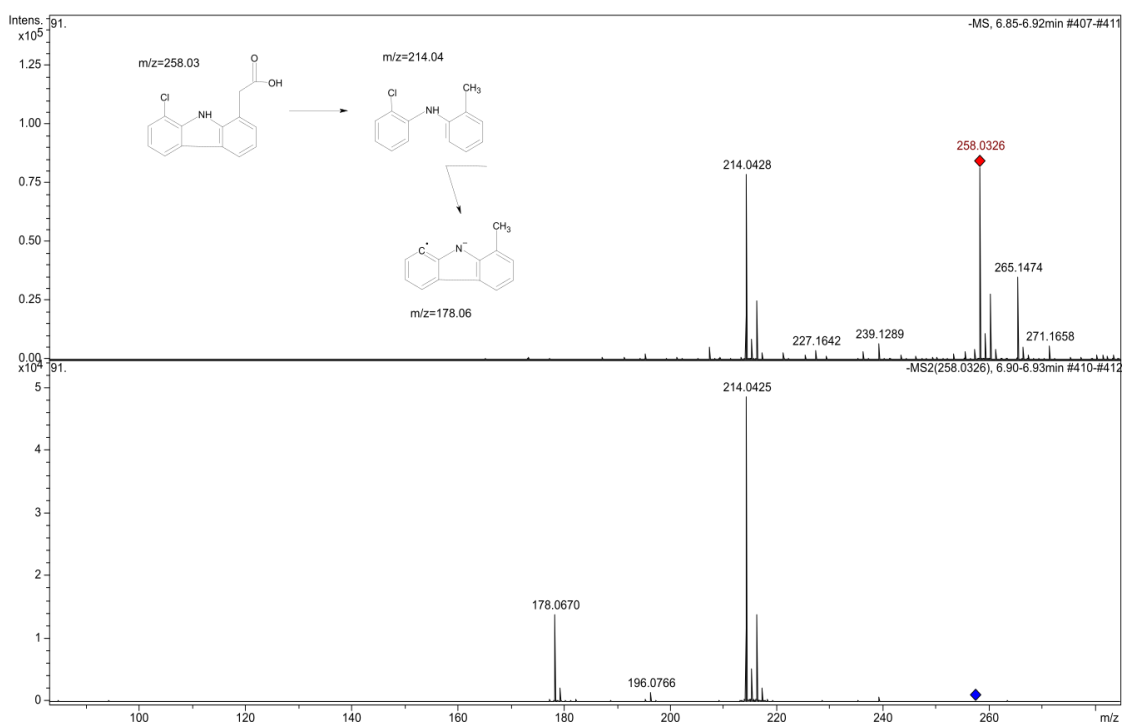


Rysunek 39 Przykładowy chromatogram analizy LC-MS próbki (C) uzyskany po odjęciu chromatogramu próby kontrolnej (A) od chromatogramu hodowli eksperymentalnej (B) dla hodowli *Ch. thermalis* inkubowanej z diklofenakiem (100 μ M) (n=3, RSD<10%).



Rysunek 40 Widma MS i MS/MS związku nr 1, którego obecność potwierdzono w pożywce pochodzącej z *Anabaena* sp. zawierającej diklofenak jako badany ksenofarmaceutyk. Widmo MS sygnału o wartości m/z 250.01 i odpowiadające mu widmo MS/MS.

W płynach pochodzących z gatunku *Chroococcidiopsis thermalis* oraz w hodowlach z mieszaninami i układach testowanych konsorcjów wykryto obecność jonu $[M-H]^- = 258,03$ ($t_r = 6,9$ min), który najprawdopodobniej jest związkiem $C_{14}H_{10}ClNO_2$, którego widma MS i MS/MS oraz zaproponowaną strukturę chemiczną przedstawiono na poniższym Rys. 41.



Rysunek 41 Widma MS i MS/MS związku nr 3, którego obecność potwierdzono w pożywce pochodzącej z *Chroococcidiopsis thermalis* zawierającej diklofenak lub mieszaninę badanych związków. Widmo MS sygnału o wartości m/z 258.03 i odpowiadające mu widmo MS/MS.

Niestety, poszukiwanie potencjalnych metabolitów paracetamolu i ibuprofenu nie przyniosło pożądanych rezultatów. Analiza płynów pochodzących nie wykazała obecności żadnych metabolitów znanych z literatury. Analizując dane LC-MS, w Tab. 6 przedstawiono zestawy jonów, które mogą reprezentować potencjalne metabolity powstałe w wyniku biotransformacji badanych ksenofarmaceutyków. Niestety jednoznaczne określenie ich struktury chemicznej okazało się być niemożliwe.

Tabela 6 Zestaw potencjalnych metabolitów

Gatunek / konsorcjum	Jon molekularny	Jony fragmentacyjny
<i>Ch. thermalis</i>	225,15	207,14/167,11
<i>Anabaena</i> sp., <i>Ch. thermalis</i> oraz konsorcja	293,18	221,15
konsorcja <i>Anabaena</i> sp. i <i>Ch. thermalis</i>	343,22	215,17/183,02
<i>Arthrospira platensis</i>	390,89	260,88/186,93
<i>Anabaena</i> sp i konsorcja <i>Anabaena</i> sp. i <i>Ch.</i> <i>thermalis</i>	611,01	250,02

Najprawdopodobniej przeprowadzenie eksperymentów na większą skalę (np. w bioreaktorach) da możliwość wykrycia takich produktów biotransformacji, co planuje się wdrożyć w przyszłości. Poza tym w literaturze wskazuje się, że paracetamol może być rozkładany przez niektóre mikroorganizmy, nawet do związków najprostszych takich jak woda i dwutlenek węgla [Guzik, 2019].

5. Podsumowanie

Rezultaty przeprowadzonych badań potwierdzają możliwość zastosowania cyjanobakterii jako aktywnych biosorbentów do usuwania leków przeciwbólowych i przeciwzapalnych dostępnych bez recepty. Wykazano, że skuteczność usuwania badanych farmaceutyków zależała od jego stężenia oraz gatunku cyjanobakterii. Słodkowodne gatunki sinic najefektywniej usuwały paracetamol, który charakteryzuje się największym powinowactwem do wody. Pozostałe dwa związki, diklofenak i ibuprofen, były usuwane przez gatunki *Anabaena* sp. i *Chroococcidiopsis thermalis* ze znacznie mniejszą efektywnością, zarówno w hodowlach z pojedynczymi substancjami, jak i w mieszaninach leków. Interesującym wynikiem było znaczące zwiększenie biosorpcji w przypadku mieszaniny leków o stężeniu 300 μ M przez jedno z konsorcjów zatasowanych cyjanobakterii (7/49/(.2)). W tym przypadku wszystkie trzy badane związki były usuwane z ponad 80% efektywnością. Gatunek *A. platensis* wykazywał najwyższą skuteczność biosorpcji przeciwbólowych ksenobiotyków spośród wszystkich testowanych gatunków, zarówno z pożywki zawierającej pojedyncze związki, jak i z ich mieszanin. Ustalono również, że adsorpcja badanych leków na powierzchni komórek oraz biosorpcja do wnętrza komórek była bardzo niska i w większości przypadków nie przekraczała 5%.

Dodatkowo, zbadano wpływ ksenofarmaceutyków na rozwój oraz metabolizm testowanych gatunków cyjanobakterii, analizując zmiany w ilości i proporcjach barwników fotosyntetycznych. Gatunek *Anabaena* sp. wykazywał najwyższą wrażliwość na obecność testowanych leków w pożywce. W większości przeprowadzonych eksperymentów obecność badanych substancji przyspieszała rozwój tego gatunku oraz zwiększała biosyntezę pomocniczych barwników fotosyntetycznych. Znaczące zahamowania wzrostu *Anabaena* sp. zaobserwowano jedynie w przypadku, inkubacji komórek w zubożalej pożywce z dodatkiem 300 μ M ibuprofenu. Pozostałe dwa gatunki wykazywały znacznie słabszą odpowiedź na obecność ksenofarmaceutyków, z maksymalnym wpływem wynoszącym 20% w porównaniu do warunków kontrolnych. Podobne zależności odnotowano w przypadku zmian w ilości barwników fotosyntetycznych. Największe różnice, zarówno zwiększenie, jak i zmniejszenie stężenia w komórkach, zaobserwowano dla fikobiliprotein, a charakter tych zmian był zróżnicowany w zależności od gatunku. W przypadku *Chroococcidiopsis thermalis* tendencja ta wskazywała na spowolnienie syntezy fikobiliprotein, natomiast u pozostałych gatunków oraz w konsorcjach obecność leków prowadziła do zwiększenia produkcji tych pigmentów. Zmiany w rozwoju konsorcjów *Anabaena* sp. i *Chroococcidiopsis thermalis* były porównywalne do obserwowanych w hodowli samej *Anabaena* sp., co sugeruje dominację tego gatunku w konsorcjum. Wniosek ten potwierdzono na podstawie obserwacji mikroskopowych.

Wyniki uzyskane w pożywkach pozbawionych związków węgla przedstawiają się odmiennie. Rozwój komórek był wyraźnie spowolniony, a w układach eksperymentalnych zawierających słodkowodne gatunki cyjanobakterii z ibuprofenem oraz *Arthrospira platensis* i diklofenakiem, zaobserwowano całkowite zahamowanie wzrostu. W większości przypadków hodowle prowadzone w warunkach braku węgla, którego źródłem była pożywka, cechowały się również obniżoną efektywnością biosorpcji badanych leków. Interesującym wyjątkiem był układ *Anabaena* sp. z diklofenakiem, w którym poziom biosorpcji był wyższy niż w analogicznym eksperymencie z pełną pożywką oraz w odniesieniu do układu z paracetamolem.

Dla płynów pohodowlanych z hodowli *A. platensis*, zawierających 300 μ M paracetamolu, diklofenaku, ibuprofen oraz ich mieszaninę, przeprowadzono testy toksyczności na *Daphnia magna* oraz dwóch gatunków mikroalg: *Chlorella vulgaris* i *Haematococcus pluvialis*. Wyniki tych badań potwierdziły, że jedynie płyny po biosorpcji paracetamolu wykazywały dużą toksyczność, prowadząc do śmierci *Daphnia magna*. W przypadku mikroalg jedynie płyny pohodowlane z pożywki zawierającej ibuprofen powodowały całkowite zahamowanie wzrostu *Haematococcus pluvialis*.

Zastosowanie techniki LC-MS/MS umożliwiło przede wszystkim monitorowanie skuteczności usuwania (biosorpcji) testowanych leków z pożywek, zachodzących w obecności badanych gatunków cyjanobakterii oraz identyfikację niektórych metabolitów, powstających w wyniku biotransformacji przeprowadzanej przez badane cyjanobakterie. W medium pohodowlanym wykryto bezpośrednio obecność trzech metabolitów DCF i określono również ich strukturę chemiczną. Jakkolwiek próby zidentyfikowania metabolitów okazały się wyjątkowo trudne. Po pierwsze, wiele zidentyfikowanych sygnałów na widmie MS nie odpowiadało żadnym wzorcowym metabolitom w dostępnych bazach danych, co uniemożliwiło ich dopasowanie na podstawie istniejących informacji. Dodatkowym utrudnieniem była obecność licznych izomerów i produktów ubocznych powstających podczas biotransformacji, które mogą dawać bardzo podobne sygnały masowe, ale różnią się strukturą chemiczną. W konsekwencji, nawet zaawansowana technika spektrometrii mas nie była wystarczająca do pełnego zidentyfikowania wszystkich metabolitów. Dodatkowym czynnikiem, który mógł wpłynąć na trudności w identyfikacji metabolitów, było potencjalnie zbyt niskie stężenie niektórych związków w próbkach. Niewielkie ilości metabolitów mogą powodować słabe sygnały w widmach MS i MS/MS, co utrudnia precyzyjne określenie struktury i przypisanie poszczególnych fragmentów. Zbyt mała intensywność sygnału może także prowadzić do pominięcia istotnych jonów lub generowania niepełnych widm fragmentacyjnych, co ogranicza zdolność do przeprowadzenia jednoznacznej analizy chemicznej. Poza tym, pochodne diklofenaku były łatwiejsze do zidentyfikowania ze względu na charakterystyczny układ monoizotopowy wynikający z obecności atomów chloru w ich strukturze. Dzięki temu pochodne diklofenaku generują specyficzne "bliźniacze" piki w widmach masowych, co znacząco ułatwia ich identyfikację w porównaniu z innymi związkami, które nie mają tak wyraźnego wzorca izotopowego. To charakterystyczne rozszczepienie sygnałów pozwala na szybkie

wyselekcjonowanie związków chlorowych spośród innych metabolitów, nawet w bardziej złożonych mieszaninach.

Podsumowując, w ramach przeprowadzonych badań, wykazano, że zarówno słodkowodne, jak i halofilne gatunki cyjanobakterie są zdolne do skutecznej biosorpcji paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu. Efektywność usuwania poszczególnych ksenofarmaceutyków zależy jednak od gatunku sinic oraz stężenia poszczególnych związków. Zastosowanie żywych komórek cyjanobakterii nie koncentruje się na adsorpcji zanieczyszczeń na powierzchni mikroorganizmów, ale obejmuje przede wszystkim proces biotransformacji, podczas którego ksenofarmaceutyki przekształcane są raczej w mniej toksyczne metabolity, co jest cechą charakterystyczną aktywnych biosorbentów. Technika LC-MS/MS umożliwiła oznaczanie ilościowe oraz stanowi pomocne narzędzie w identyfikacji potencjalnych metabolitów badanych ksenobiotyków w płynach pochodowlanych. Dodatkowo, testowane substancje nie wykazywały silnego działania toksycznego wobec cyjanobakterii, a w niektórych przypadkach nawet stymulowały ich wzrost, co eliminuje potrzebę regeneracji komórek przy ich zastosowaniu jako biosorbentu. Płyny pochodowlane pochodzące z hodowli z *Arthrospira platensis*, w większości przypadków nie wykazywały również toksyczności wobec badanych modelowych gatunków zwierząt i roślin. Tym samym potencjalne wykorzystanie cyjanobakterii jako aktywnych biosorbentów ogranicza konieczność dalszego przetwarzania i oczyszczania płynów pochodowlanych, co znacząco zwiększa efektywność i opłacalność takiego rozwiązania.

6. Wnioski

- ◆ Zoptymalizowana metoda rozdzielania chromatograficznego badanych leków z użyciem detekcji UV-VIS i MS, pozwoliła na ich ilościowe oznaczenie nawet w złożonych matrycach takich jak płyny pohodowlane cyjanobakterii. Stosując opracowaną metodę możliwa była również identyfikacja metabolitów testowanych leków wytwarzanych przez badane gatunki cyjanobakterii
- ◆ Testowane słodkowodne sinice wykazały bardzo dobrą zdolność do biosorpcji paracetamolu z medium hodowlanego nawet w wysokich stężeniach (300 μ M).
- ◆ Gatunek *Arthrospira platensis* oraz jedno z konsorcjów słodkowodnych cyjanobakterii (7/49/(2)) wykazały wysoką skuteczność w usuwaniu paracetamolu, diklofenaku i ibuprofenu ze środowiska wodnego.
- ◆ W przeważającej większości przypadków testowane ksenofarmaceutyki nie powodowały istotnego zahamowania wzrostu trzech badanych gatunków cyjanobakterii.
- ◆ Badania toksyczności przeprowadzone na skorupiaku *Daphnia magna* oraz dwóch gatunkach eukariotycznych mikroalg wykazały, że płyny pohodowlane pochodzące z hodowli *Arthrospira platensis* nie wykazują żadnych oznak toksyczności.
- ◆ Badane gatunki cyjanobakterii przekształcały diklofenak w procesach metabolicznych, m.in. do formy dimeru oraz innych mniej toksycznych pochodnych, co potwierdza ich wysoki potencjał jako aktywnych biosorbentów.

7. Summary

The dissertation focuses on utilizing cyanobacteria as active biosorbents for the removal of selected xenopharmaceuticals, such as paracetamol, diclofenac, and ibuprofen, from various aqueous matrices, including cultivation media. Xenopharmaceuticals, as a subgroup of environmental pollutants, pose significant risks to aquatic and terrestrial ecosystems due to their widespread usage, bioaccumulation potential, and the challenge of removing them from water through conventional treatment methods. This study aims to address these challenges by exploring the biosorptive capabilities of different cyanobacterial species and consortia. Cyanobacteria, due to their unique metabolic properties and cell structures, present a promising solution as biosorbents for such pollutants. They are capable of accumulating and transforming these substances through biosorption and biotransformation, reducing their toxicity. The study investigates both freshwater and halophilic species to evaluate their biosorption efficiency and metabolic changes under exposure to the selected pharmaceuticals.

The primary aim of the research was to evaluate the effectiveness of different cyanobacterial species in removing paracetamol, diclofenac, and ibuprofen from cultivation media using the optimized analytical method (LC-MS/MS) for the qualitative and quantitative detection of these pharmaceuticals in complex matrices. Furthermore, the impact of xenopharmaceuticals on the growth and metabolism of cyanobacteria, determining the ecological safety and sustainability of using these organisms as biosorbents was studied. The research employed a combination of chromatographic and spectrometric techniques (LC-MS/MS) to analyze the concentration of pharmaceuticals in various media. Different cyanobacterial species, including *Chroococcidiopsis thermalis*, *Arthrospira platensis* and *Anabaena sp.*, were cultivated in both standard and carbon-deprived media to evaluate their biosorption capacities under different environmental conditions. The experimental setup included testing individual compounds and mixtures to mimic real environmental scenarios. The study also involved monitoring the growth rate and pigment composition of cyanobacteria under stress conditions induced by the presence of xenopharmaceuticals, analysing the surface of cyanobacteria cells using scanning electron microscopy (SEM) to understand the adsorption mechanisms and assessing the toxicity of post-biosorption media using *Daphnia magna* and two microalgae species (*Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis*).

The results demonstrated that *Arthrospira platensis* and specific cyanobacterial consortia (7/49/(.2)) showed high efficiency in removing paracetamol, diclofenac, and ibuprofen, even at high concentrations (up to 300 μ M). The removal efficiency varied significantly depending on the species and the concentration of the pollutants. Furthermore, most xenopharmaceuticals did not inhibit the growth of the tested cyanobacteria significantly. In some cases, they even stimulated growth, indicating a potential adaptive response to these environmental stressors. Using LC-MS/MS, three potential metabolites of DCF were identified, suggesting that cyanobacteria are capable to metabolize them into less toxic forms. This highlights the potential of these organisms for active biosorption and biotransformation. The toxicity tests showed that the culture media after cultivation with *Arthrospira platensis* did not exhibit harmful effects on *Daphnia magna* and the tested microalgae. It can confirm that the biosorbent and xenopharmaceuticals metabolites were less toxic.

The study confirmed that cyanobacteria, particularly *Arthrospira platensis* and certain consortia, can serve as effective and sustainable biosorbents for the removal of environmental xenopharmaceuticals. Their ability to biotransform these compounds into less toxic metabolites positions them as promising candidates for the development of eco-friendly water treatment technologies.

8. Literatura

1. Abdel-Aty, A. M., Ammar, N. S., Ghafar, H. H. A., & Ali, R. K. (2013). Biosorption of cadmium and lead from aqueous solution by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass. *Journal of advanced research*, 4(4), 367-374. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.07.004>
2. Abdel-Ghany, T. M., Alawlaqi, M. M., Shater, A. R. M., & Al Abboud, M. A. (2019). Congo red biosorption with live and dead biomass of thermophilic *Aspergillus fumigatus*. *Egypt. J. Exp. Biol.(Bot.)*, 15(1), 1-6.
3. Abushanab, D., & Al-Badriyeh, D. (2021). Efficacy and safety of ibuprofen plus paracetamol in a fixed-dose combination for acute postoperative pain in adults: meta-analysis and a trial sequential analysis. *CNS drugs*, 35, 105-120. <https://doi.org/10.1007/s40263-020-00777-7>
4. Ahmad, M. T., Shariff, M., Md. Yusoff, F., Goh, Y. M., & Banerjee, S. (2020). Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. *Reviews in aquaculture*, 12(1), 328-346. <https://doi.org/10.1111/raq.12320>
5. Aguiló-Nicolau, P., Galmés, J., Fais, G., Capó-Bauçà, S., Cao, G., & Iñiguez, C. (2023). Singular adaptations in the carbon assimilation mechanism of the polyextremophile cyanobacterium *Chroococcidiopsis thermalis*. *Photosynthesis Research*, 156(2), 231-245.
6. Alfaro, R. A., & Davis, D. D. (2020). Diclofenac.
7. Allegaert, K., Peeters, M. Y., Beley, B., Smits, A., Kulo, A., van Calsteren, K., ... & Knibbe, C. A. (2015). Paracetamol pharmacokinetics and metabolism in young women. *BMC anesthesiology*, 15, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12871-015-0144-3>
8. Alsayadi, Y. M., & Arora, S. (2023, February). Impact of pharmaceutical pollutants on ecosystem-A Comprehensive review. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2558, No. 1). AIP Publishing.
9. Ashfaq, M., Khan, K. N., Rehman, M. S. U., Mustafa, G., Nazar, M. F., Sun, Q., ... & Yu, C. P. (2017). Ecological risk assessment of pharmaceuticals in the receiving environment of pharmaceutical wastewater in Pakistan. *Ecotoxicology and environmental safety*, 136, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.029>
10. Athersuch, T. J., Antoine, D. J., Boobis, A. R., Coen, M., Daly, A. K., Possamai, L., ... & Wilson, I. D. (2018). Paracetamol metabolism, hepatotoxicity, biomarkers and therapeutic interventions: a perspective. *Toxicology research*, 7(3), 347-357.
11. Athira, K., Sathish, A., Nithya, K., & Guhananthan, A. (2020). Corn cob immobilised *Chlorella sorokiniana* for the sequestration of chromium ions from aqueous solution. *Materials Today: Proceedings*, 33, 2148-2155. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.03.151>
12. Aus der Beek, T., Weber, F. A., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., & Küster, A. (2016). Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(4), 823-835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
13. Ayele, A., Getachew, D., Kamaraj, M., & Suresh, A. (2021). Phycoremediation of synthetic dyes: an effective and eco-friendly algal technology for the dye abatement. *Journal of Chemistry*, 2021(1), 9923643. <https://doi.org/10.1155/2021/9923643>
14. Ayele, A., Suresh, A., Benor, S., & Konwarh, R. (2021). Optimization of chromium (VI) removal by indigenous microalga (*Chlamydomonas* sp.)-based biosorbent using response surface methodology. *Water Environment Research*, 93(8), 1276-1288.
15. Banerjee, S., Kundu, A., & Dhak, P. (2022). Bioremediation of uranium from waste effluents using novel biosorbents: a review. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 331(6), 2409-2435.
16. Baldanta, S., Arnal, R., Blanco-Rivero, A., Guevara, G., & Navarro Llorens, J. M. (2023). First characterization of cultivable extremophile *Chroococcidiopsis* isolates from a solar panel. *Frontiers in Microbiology*, 14, 982422.
17. Bansal, R.C.; Donnet, J.-B.; Stockli, F. *Activated Carbon*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1988
18. Bazargan, M., Ghaemi, F., Amiri, A., & Mirzaei, M. (2021). Metal-organic framework-based sorbents in analytical sample preparation. *Coordination Chemistry Reviews*, 445, 214107. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214107>
19. Bazrafshan, E., Zarei, A. A., & Mostafapour, F. K. (2016). Biosorption of cadmium from aqueous solutions by *Trichoderma* fungus: kinetic, thermodynamic, and equilibrium study. *Desalination and Water Treatment*, 57(31), 14598-14608. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1065764>
20. Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
21. Bender, R. P., Lindsey, R. H., Burden, D. A., & Osheroff, N. (2004). N-acetyl-p-benzoquinone imine, the toxic metabolite of acetaminophen, is a topoisomerase II poison. *Biochemistry*, 43(12), 3731-3739. <https://doi.org/10.1021/bi036107r>

22. Bibbins-Martínez, M., Juárez-Hernández, J., López-Domínguez, J. Y., Nava-Galicia, S. B., Martínez-Tozcano, L. J., Juárez-Atonal, R., ... & Díaz-Godínez, G. (2023). Potential application of fungal biosorption and/or bioaccumulation for the bioremediation of wastewater contamination: A review. *Journal of Environmental Biology*, 44(2), 135-145.
23. Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical pharmacology*, 180, 114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>
24. Borowiak, D., Lenartowicz, P., Grzebyk, M., Wiśniewski, M., Lipok, J., & Kafarski, P. (2021). Novel, automated, semi-industrial modular photobioreactor system for cultivation of demanding microalgae that produce fine chemicals—The next story of *H. pluvialis* and astaxanthin. *Algal Research*, 53, 102151. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102151>
25. Brennan, R., Wazaify, M., Shawabkeh, H., Boardley, I., McVeigh, J., & Van Hout, M. C. (2021). A scoping review of non-medical and extra-medical use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Drug safety*, 44, 917-928. <https://doi.org/10.1007/s40264-021-01085-9>
26. Brutzkus, J. C., Shahrokhi, M., & Varacallo, M. (2018). Naproxen.
27. Bunke, D., Moritz, S., Brack, W., Herráez, D. L., Posthuma, L., & Nuss, M. (2019). Developments in society and implications for emerging pollutants in the aquatic environment. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12302-019-0213-1>
28. Castenholz, R. W. (2015). General characteristics of the cyanobacteria. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-23. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00019>
29. Çelekli, A., & Zariç, Ö. E. (2024). Breathing life into Mars: Terraforming and the pivotal role of algae in atmospheric genesis. *Life Sciences in Space Research*.
30. Chen, B., & Ding, J. (2012). Biosorption and biodegradation of phenanthrene and pyrene in sterilized and unsterilized soil slurry systems stimulated by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of hazardous materials*, 229, 159-169.
31. Chen, C., Hu, J., & Wang, J. (2020). Biosorption of uranium by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Environmental Radioactivity*, 213, 106158. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106158>
32. Chen, S., Yin, H., Tang, S., Peng, H., Liu, Z., & Dang, Z. (2016). Metabolic biotransformation of copper–benzo [a] pyrene combined pollutant on the cellular interface of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Bioresource technology*, 204, 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.068>
33. Churro, C., Fernandes, A. S., Alverca, E., Sam-Bento, F., Paulino, S., Figueira, V. C., ... & Pereira, P. (2010). Effects of tryptamine on growth, ultrastructure, and oxidative stress of cyanobacteria and microalgae cultures. *Hydrobiologia*, 649, 195-206.
34. Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2013). Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(1), 5-11. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5902>
35. Cooper, R. J. (2013). Over-the-counter medicine abuse—a review of the literature. *Journal of substance use*, 18(2), 82-107.
36. Cui, J., Zhu, N., Kang, N., Ha, C., Shi, C., & Wu, P. (2017). Biorecovery mechanism of palladium as nanoparticles by *Enterococcus faecalis*: from biosorption to bioreduction. *Chemical Engineering Journal*, 328, 1051-1057. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.124>
37. Cumbers, J., & Rothschild, L. J. (2014). Salt tolerance and polyphyly in the cyanobacterium *C. hroococoidopsis* (P. leurocapsales). *Journal of phycology*, 50(3), 472-482. <https://doi.org/10.1111/jpy.12169>
38. De Coen, W. M., Janssen, C. R., & Segner, H. (2001). The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing V. In vivo alterations in the carbohydrate metabolism of *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of mercury and lindane. *Ecotoxicology and environmental safety*, 48(3), 223-234.
39. da Rosa, A. L. D., Carissimi, E., Dotto, G. L., Sander, H., & Feris, L. A. (2018). Biosorption of rhodamine B dye from dyeing stones effluents using the green microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of cleaner Production*, 198, 1302-1310. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.128>
40. da Silveira Barcellos, D., Procopiuck, M., & Bollmann, H. A. (2022). Management of pharmaceutical micropollutants discharged in urban waters: 30 years of systematic review looking at opportunities for developing countries. *Science of the Total Environment*, 809, 151128. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151128>
41. de Fátima, Â., de Paula Pereira, C., Olímpio, C. R. S. D. G., de Freitas Oliveira, B. G., Franco, L. L., & da Silva, P. H. C. (2018). Schiff bases and their metal complexes as urease inhibitors—a brief review. *Journal of advanced research*, 13, 113-126. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.007>
42. de Freitas, G. R., Vieira, M. G. A., & da Silva, M. G. C. (2020). Characterization and biosorption of silver by biomass waste from the alginate industry. *Journal of cleaner production*, 271, 122588. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122588>

43. De Philippis, R., Colica, G., & Micheletti, E. (2011). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Applied microbiology and biotechnology*, 92, 697-708. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3601-z>
44. Del Álamo, A. C., Pariente, M. I., Molina, R., & Martínez, F. (2022). Advanced bio-oxidation of fungal mixed cultures immobilized on rotating biological contactors for the removal of pharmaceutical micropollutants in a real hospital wastewater. *Journal of hazardous materials*, 425, 128002. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128002>
45. Deng, S. (2006). Sorbent technology. *Encyclopedia of chemical processing*, 2825-2845.
46. Dey, S., Bhattacharya, S., Ghosh, R., Bhattacharyya, S. (2019). Biosorption of hexavalent chromium by *Aspergillus fumigatus* S101 isolated from a coal mining environment, *Environmental and Experimental Biology* 17: 97–105 DOI: 10.22364/eeb.17.10
47. Dhairykar, M., Jawre, S., & Rajput, N. (2022). Impact of plastic pollution on wildlife and its natural habitat. *The Pharm Innovation Journal*, 141-143.
48. Domaradzka, D., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2015). Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14, 229-239.
49. Drzyzga, D., & Lipok, J. (2018). Glyphosate dose modulates the uptake of inorganic phosphate by freshwater cyanobacteria. *Journal of applied phycology*, 30, 299-309.
50. Drzyzga, D., Forlani, G., Niemczyk, E., & Lipok, J. (2018). The aminophosphonate glyphosine enhances phycobiliprotein yields from selected cyanobacterial cultures. *Journal of Applied Phycology*, 30, 311-317. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1271-7>
51. Duarte, P., Almeida, C. M. R., Fernandes, J. P., Morais, D., Lino, M., Gomes, C. R., ... & Mucha, A. P. (2019). Bioremediation of bezafibrate and paroxetine by microorganisms from estuarine sediment and activated sludge of an associated wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment*, 655, 796-806.
52. Dyhrman, S. T., Chappell, P. D., Haley, S. T., Moffett, J. W., Orchard, E. D., Waterbury, J. B., & Webb, E. A. (2006). Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature*, 439(7072), 68-71. <https://doi.org/10.1038/nature04203>
53. Basile A., Galluci F. (2009). Membrane reactors—part I. *Technology*, 7(17), 743-753. doi: 10.1002/apj.
54. Edwards, S. J., & Kjellerup, B. V. (2013). Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 9909-9921. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5216-z>
55. Eggink, L. L., Park, H., & Hooper, J. K. (2001). The role of chlorophyll b in photosynthesis: hypothesis. *BMC plant biology*, 1, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-1-2>
56. El-Naggar, N. E. A., Hussein, M. H., & El-Sawah, A. A. (2017). Bio-fabrication of silver nanoparticles by phycocyanin, characterization, in vitro anticancer activity against breast cancer cell line and in vivo cytotoxicity. *Scientific reports*, 7(1), 10844. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11121-3>
57. Erlandsson, P., Isaksson, R., Lorentzon, P., & Lindberg, P. (1990). Resolution of the enantiomers of omeprazole and some of its analogues by liquid chromatography on a trisphenylcarbamoylcellulose-based stationary phase: the effect of the enantiomers of omeprazole on gastric glands. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 532, 305-319. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)83781-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)83781-0)
58. Evans, A. M. (2001). Comparative pharmacology of S (+)-ibuprofen and (RS)-ibuprofen. *Clinical rheumatology*, 20, 9-14.
59. Fais, G., Casula, M., Sidorowicz, A., Manca, A., Margarita, V., Fiori, P. L., ... & Concas, A. (2024). Cultivation of *Chroococcidiopsis thermalis* Using Available In Situ Resources to Sustain Life on Mars. *Life*, 14(2), 251.
60. Fan, H., Ma, Y., Wan, J., Wang, Y., Li, Z., & Chen, Y. (2020). Adsorption properties and mechanisms of novel biomaterials from banyan aerial roots via simple modification for ciprofloxacin removal. *Science of the Total Environment*, 708, 134630. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134630>
61. de Farias Silva, C. E., Sforza, E., & Bertucco, A. (2019). Enhancing carbohydrate productivity in photosynthetic microorganism production: a comparison between cyanobacteria and microalgae and the effect of cultivation systems. In *Advances in feedstock conversion technologies for alternative fuels and bioproducts* (pp. 37-67). Woodhead Publishing
62. Felis, E., Kalka, J., Sochacki, A., Kowalska, K., Bajkacz, S., Harnisz, M., & Korzeniewska, E. (2020). Antimicrobial pharmaceuticals in the aquatic environment-occurrence and environmental implications. *European Journal of Pharmacology*, 866, 172813. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172813>

63. Fernandes, T. A., Iyer, V., & Apte, S. K. (1993). Differential responses of nitrogen-fixing cyanobacteria to salinity and osmotic stresses. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 899-904. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.899-904.1993>
64. Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of functional foods*, 11, 375-392. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>
65. Fokunang, C., Fokunang, E. T., Frederick, K., Ngameni, B., & Ngadjui, B. (2018). Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs (nsaids) in resource limited countries. *Moj Toxicol*, 4(1), 5-13.
66. Forlani, G., Pavan, M., Gramek, M., Kafarski, P., & Lipok, J. (2008). Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. *Plant and cell physiology*, 49(3), 443-456.
67. Gallardo-Altamirano, M. J., Maza-Márquez, P., Montemurro, N., Rodelas, B., Osorio, F., & Pozo, C. (2019). Linking microbial diversity and population dynamics to the removal efficiency of pharmaceutically active compounds (PhACs) in an anaerobic/anoxic/aerobic (A2O) system. *Chemosphere*, 233, 828-842. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.017>
68. Garreta-Lara, E., Campos, B., Barata, C., Lacorte, S., & Tauler, R. (2018). Combined effects of salinity, temperature and hypoxia on *Daphnia magna* metabolism. *Science of the Total Environment*, 610, 602-612.
69. Gao, X., Zhang, Y., & Zhao, Y. (2017). Biosorption and reduction of Au (III) to gold nanoparticles by thiourea modified alginate. *Carbohydrate Polymers*, 159, 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.095>
70. Ghaffar, U. B., & Tadv, N. A. (2014). Paracetamol toxicity: a review. *J Contemp Med A Dent*, 2, 12-5.
71. Giese, E. C., Silva, D. D., Costa, A. F., Almeida, S. G., & Dussán, K. J. (2020). Immobilized microbial nanoparticles for biosorption. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(5), 653-666.
72. Godage, N. H., & Gionfriddo, E. (2020). Use of natural sorbents as alternative and green extractive materials: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 1125, 187-200. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.045>
73. Gou, Y., Ma, J., Yang, S., & Song, Y. (2022). Insights into the effects of Fenton oxidation on PAH removal and indigenous bacteria in aged subsurface soil. *Environmental Pollution*, 298, 118872.
74. Guzik, U., & Wojcieszńska, D. (2019). Biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their influence on soil microorganisms. *Microbes and enzymes in soil health and bioremediation*, 379-401.
75. Gworek, B., Kijeńska, M., Wrzosek, J., & Graniewska, M. (2021). Pharmaceuticals in the soil and plant environment: a review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(4), 145.
76. Hafizi, A., Rahimpour, M. R., & Heravi, M. (2019). Experimental investigation of improved calcium-based CO₂ sorbent and Co₃O₄/SiO₂ oxygen carrier for clean production of hydrogen in sorption-enhanced chemical looping reforming. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(33), 17863-17877. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.05.030>
77. Hagen, C., Siegmund, S., & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology*, 37(2), 217-226.
78. Hajdu-Rahkama, R. (2014). Bioremediation of heavy metals by using the microalga *Desmodesmus subspicatus*.
79. Han, R., Li, H., Li, Y., Zhang, J., Xiao, H., & Shi, J. (2006). Biosorption of copper and lead ions by waste beer yeast. *Journal of hazardous materials*, 137(3), 1569-1576.
80. Hasan, M., Alfredo, K., Murthy, S., & Riffat, R. (2021). Biodegradation of salicylic acid, acetaminophen and ibuprofen by bacteria collected from a full-scale drinking water biofilter. *Journal of Environmental Management*, 295, 113071.
81. Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 207-220.
82. Heckmann, L. H., Sibly, R. M., Connon, R., Hooper, H. L., Hutchinson, T. H., Maund, S. J., ... & Callaghan, A. (2008). Systems biology meets stress ecology: linking molecular and organismal stress responses in *Daphnia magna*. *Genome biology*, 9, 1-14.
83. Heidari, F., Riahi, H., Aghamiri, M. R., Shariatmadari, Z., & Zakeri, F. (2017). Isolation of an efficient biosorbent of radionuclides (226 Ra, 238 U): green algae from high-background radiation areas in Iran. *Journal of Applied Phycology*, 29, 2887-2898. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1151-1>
84. Hindák, F., Kvíderová, J., & Lukavský, J. (2013). Growth characteristics of selected thermophilic strains of cyanobacteria using crossed gradients of temperature and light. *Biologia*, 68(5), 830-837.
85. Ho, M. Y., Soulier, N. T., Canniffe, D. P., Shen, G., & Bryant, D. A. (2017). Light regulation of pigment and photosystem biosynthesis in cyanobacteria. *Current opinion in plant biology*, 37, 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.03.006>

86. Ho, Y. N., Mathew, D. C., Hsiao, S. C., Shih, C. H., Chien, M. F., Chiang, H. M., & Huang, C. C. (2012). Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. *Journal of Hazardous Materials*, 219, 43-49.
87. Hoffmann, F., Bantel, C., & Jobski, K. (2020). Agranulocytosis attributed to metamizole: An analysis of spontaneous reports in EudraVigilance 1985-2017. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 126(2), 116-125. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13310>
88. Hu, I. C. (2019). Production of potential coproducts from microalgae. In *Biofuels from algae* (pp. 345-358). Elsevier.
89. Hug, J. J., Krug, D., & Müller, R. (2020). Bacteria as genetically programmable producers of bioactive natural products. *Nature Reviews Chemistry*, 4(4), 172-193.
90. Igwegbe, C. A., Aniagor, C. O., Oba, S. N., Yap, P. S., Iwuchukwu, F. U., Liu, T., ... & Ighalo, J. O. (2021). Environmental protection by the adsorptive elimination of acetaminophen from water: a comprehensive review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 104, 117-135. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.08.015>
91. Imtiazuddin, S. M., Mumtaz, M., & Mallick, K. A. (2012). Pollutants of wastewater characteristics in textile industries. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 8(2), 554-556. <https://doi.org/10.6000/1927-5129.2012.08.02.47>
92. Izadi, P., Izadi, P., Salem, R., Papry, S. A., Magdouli, S., Pulicharla, R., & Brar, S. K. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the environment: Where were we and how far we have come?. *Environmental Pollution*, 267, 115370.
93. Izydorczyk, G., Mikula, K., Skrzypczak, D., Moustakas, K., Witek-Krowiak, A., & Chojnacka, K. (2021). Potential environmental pollution from copper metallurgy and methods of management. *Environmental Research*, 197, 111050.
94. Jan-Roblero, J., & Cruz-Maya, J. A. (2023). Ibuprofen: toxicology and biodegradation of an emerging contaminant. *Molecules*, 28(5), 2097. <https://doi.org/10.3390/molecules28052097>
95. Jasińska, A., Masłanka, T., & Jaroszewski, J. J. (2014). Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(1). <http://dx.doi.org/10.2478/pjvs-2014-0030>
96. John, R., & Rajan, A. P. (2021). Effective sequestration of chromium by bacterial biosorption: a review. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(8), 738-748.
97. Józwiak, T., Mazur-Marzec, H., & Pliński, M. (2008). Cyanobacterial blooms in the Gulf of Gdańsk (southern Baltic): the main effect of eutrophication. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 37(4), 115-121.
98. Karatay, S. E., Dönmez, G., & Aksu, Z. (2017). Effective biosorption of phenol by the thermophilic cyanobacterium *Phormidium* sp. *Water Science and Technology*, 76(12), 3190-3194. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.478>
99. Kasowska-Żok, E., Ostrowska, M., Studnik, H., Balcerzak, L., Żyszka, B., Drzyzga, D., ... & Lipok, J. (2014). Potencjał biotechnologiczny cyjanobakterii tworzących zakwity sinicowe. *Chemik*, 68(4), 355-362
100. Keen, O. S., Thurman, E. M., Ferrer, I., Dotson, A. D., & Linden, K. G. (2013). Dimer formation during UV photolysis of diclofenac. *Chemosphere*, 93(9), 1948-1956.
101. Kenzhaliyev, B. K., Surkova, T. Y., Berkinbayeva, A. N., Dosymbayeva, Z. D., & Abdikerim, B. E. (2020). Revisiting the kazakhstan natural sorbents modification. *Metalurgija*, 59(1), 117-120.
102. Khandelwal, A., Singh, S. B., Sharma, A., Nain, L., Varghese, E., & Singh, N. (2023). Effect of surfactant on degradation of *Aspergillus* sp. and *Trichoderma* sp. mediated crude oil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 103(7), 1667-1680.
103. KołECKA, K., Gajewska, M., & Caban, M. (2022). From the pills to environment—Prediction and tracking of non-steroidal anti-inflammatory drug concentrations in wastewater. *Science of The Total Environment*, 825, 153611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153611>
104. Kołodziejcka, J., & Kołodziejczyk, M. (2018). Diclofenac in the treatment of pain in patients with rheumatic diseases. *Reumatologia/Rheumatology*, 56(3), 174-183. <https://doi.org/10.5114/reum.2018.76816>
105. Konik, M., Bradtke, K., Stoń-Egiert, J., Soja-Woźniak, M., Śliwińska-Wilczewska, S., & Darecki, M. (2023). Cyanobacteria index as a tool for the satellite detection of cyanobacteria blooms in the Baltic Sea. *Remote Sensing*, 15(6), 1601.
106. Kononova, S. V., & Nesmeyanova, M. A. (2002). Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry (Moscow)*, 67, 184-195. <https://doi.org/10.1023/A:1014409929875>
107. Koskinen, W. C., Marek, L. J., & Hall, K. E. (2016). Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, plant materials and soil. *Pest Management Science*, 72(3), 423-432. <https://doi.org/10.1002/ps.4172>

- 108.Kotta-Loizou, I., Pritsa, A., Antasouras, G., Vasilopoulos, S. N., Voulgaridou, G., Papadopoulou, S. K., Giaginis, C. (2024). Fetus Exposure to Drugs and Chemicals: A Holistic Overview on the Assessment of Their Transport and Metabolism across the Human Placental Barrier. *Diseases*, 12(6), 114. <https://doi.org/10.3390/diseases12060114>
- 109.Kumar, A., Tabita, F. R., & Van Baalen, C. (1982). Isolation and characterization of heterocysts from *Anabaena* sp. strain CA. *Archives of Microbiology*, 133, 103-109.
- 110.Kupriyanova, E. V., Pronina, N. A., & Los, D. A. (2023). Adapting from low to high: an update to CO₂-concentrating mechanisms of cyanobacteria and microalgae. *Plants*, 12(7), 1569.
- 111.Laroche, C. (2022). Exopolysaccharides from microalgae and cyanobacteria: diversity of strains, production strategies, and applications. *Marine drugs*, 20(5), 336. <https://doi.org/10.3390/md20050336>
- 112.Latifi, A., Ruiz, M., & Zhang, C. C. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 258-278. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x>
- 113.Lazarus, R. J. (2023). *The making of environmental law*. University of Chicago Press.
- 114.Le, V. V., Tran, Q. G., Ko, S. R., Lee, S. A., Oh, H. M., Kim, H. S., & Ahn, C. Y. (2023). How do freshwater microalgae and cyanobacteria respond to antibiotics?. *Critical Reviews in Biotechnology*, 43(2), 191-211.
- 115.Lei, G., Wang, X., Lai, C., Li, Z. M., Zhang, W., Xie, C., Li, Z. (2018). Expression and biochemical characterization of α -ketoglutarate decarboxylase from cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002. *International journal of biological macromolecules*, 114, 188-193.
- 116.Lenartowicz, M., Marek, P. H., Madura, I. D., & Lipok, J. (2017). Formation of variously shaped gold nanoparticles by *Anabaena laxa*. *Journal of Cluster Science*, 28, 3035-3055.
- 117.Lenartowicz, P., Kafarski, P., & Lipok, J. (2015). The overproduction of 2, 4-DTBP accompanying to the lack of available form of phosphorus during the biodegradative utilization of aminophosphonates by *Aspergillus terreus*. *Biodegradation*, 26, 65-76. <https://doi.org/10.1007/s10532-014-9716-z>
- 118.Li, X., & Li, G. (2015). A review: pharmaceutical wastewater treatment technology and research in China. In *2015 Asia-Pacific Energy Equipment Engineering Research Conference* (pp. 345-348). Atlantis Press. <https://doi.org/10.2991/ap3er-15.2015.81>
- 119.Li, X., de Toledo, R. A., Wang, S., & Shim, H. (2015). Removal of carbamazepine and naproxen by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* under non-sterile condition. *New Biotechnology*, 32(2), 282-289.
- 120.Li, X., Dreher, T. W., & Li, R. (2016). An overview of diversity, occurrence, genetics and toxin production of bloom-forming *Dolichospermum* (*Anabaena*) species. *Harmful algae*, 54, 54-68.
- 121.Li, X., He, Q., Li, H., Gao, X., Hu, M., Li, S., ... & Wang, X. (2017). Bioconversion of non-steroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and naproxen by chloroperoxidase. *Biochemical Engineering Journal*, 120, 7-16.
- 122.Li, Z. M., Hu, Z., Wang, X., Chen, S., Yu, W., Liu, J., & Li, Z. (2023). Biochemical and Structural Insights into a Thiamine Diphosphate-Dependent α -Ketoglutarate Decarboxylase from Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (15), 12198.
- 123.Li, Y., Taggart, M. A., McKenzie, C., Zhang, Z., Lu, Y., Pap, S., & Gibb, S. (2019). Utilizing low-cost natural waste for the removal of pharmaceuticals from water: Mechanisms, isotherms and kinetics at low concentrations. *Journal of cleaner production*, 227, 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.081>
- 124.Lima, S., Matinha-Cardoso, J., Tamagnini, P., & Oliveira, P. (2020). Extracellular vesicles: an overlooked secretion system in cyanobacteria. *Life*, 10(8), 129.
- 125.Liu, H., & Fang, H. H. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of biotechnology*, 95(3), 249-256. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1)
- 126.Liu, J. L., & Wong, M. H. (2013). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. *Environment international*, 59, 208-224. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.012>
- 127.Liu, L., & Dai, Y. (2021). Strong adsorption of metolachlor by biochar prepared from walnut shells in water. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(35), 48379-48391. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14117-9>
- 128.Lu, L., Shi, L., Secor, J., & Alfano, R. (2018). Resonance Raman scattering of β -carotene solution excited by visible laser beams into second singlet state. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 179, 18-22.
- 129.Lucas, F. W. D. S., Mascaro, L. H., Fill, T. P., Rodrigues-Filho, E., Franco-Junior, E., Homem-de-Mello, P., Correia, A. N. (2014). Diclofenac on boron-doped diamond electrode: from electroanalytical determination to prediction of the electrooxidation mechanism with HPLC-ESI/HRMS and computational simulations. *Langmuir*, 30(19), 5645-5654.
- 130.Lutz, M. (2019). Metamizole (dipyrone) and the liver: a review of the literature. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 59(11), 1433-1442. <https://doi.org/10.1002/jcph.1512>

131. Maciel, G. M., de Souza, C. G. M., de Araújo, C. A. V., Bona, E., Haminiuk, C. W. I., Castoldi, R., ... & Peralta, R. M. (2013). Biosorption of herbicide picloram from aqueous solutions by live and heat-treated biomasses of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Trametes* sp. *Chemical Engineering Journal*, 215, 331-338. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.09.127>
132. Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. *Plant, soil and microbes: volume 1: implications in crop science*, 253-269.
133. Manyike, P. T., Kharasch, E. D., Kalthorn, T. F., & Slaterry, J. T. (2000). Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 67(3), 275-282.
134. Marchlewicz, A., Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2015). Over-the-counter monocyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs in environment—sources, risks, biodegradation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2622-0>
135. Markou, G., Mitrogiannis, D., Çelekli, A., Bozkurt, H., Georgakakis, D., & Chrysikopoulos, C. V. (2015). Biosorption of Cu²⁺ and Ni²⁺ by *Arthrospira platensis* with different biochemical compositions. *Chemical engineering journal*, 259, 806-813. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.037>
136. Meakin, C., Barrett, E. S., & Aleksunes, L. M. (2022). Extravillous trophoblast migration and invasion: impact of environmental chemicals and pharmaceuticals. *Reproductive Toxicology*, 107, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.11.008>
137. Meireles dos Santos, A., Vieira, K. R., Basso Sartori, R., Meireles dos Santos, A., Queiroz, M. I., Queiroz Zepka, L., & Jacob-Lopes, E. (2017). Heterotrophic cultivation of cyanobacteria: study of effect of exogenous sources of organic carbon, absolute amount of nutrients, and stirring speed on biomass and lipid productivity. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 5, 12.
138. Mishra, S., Bharagava, R. N., More, N., Yadav, A., Zainith, S., Mani, S., & Chowdhary, P. (2019). Heavy metal contamination: an alarming threat to environment and human health. *Environmental biotechnology: For sustainable future*, 103-125. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7284-0_5
139. Mitchell, J. A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R. J., & Vane, J. R. (1993). Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11693-11697.
140. Mitrogiannis, D., Markou, G., Çelekli, A., & Bozkurt, H. (2015). Biosorption of methylene blue onto *Arthrospira platensis* biomass: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(2), 670-680. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.02.008>
141. Mlunguza, N. Y., Ncube, S., Mahlambi, P. N., Chimuka, L., & Madikizela, L. M. (2019). Adsorbents and removal strategies of non-steroidal antiinflammatory drugs from contaminated water bodies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(3), 103142. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103142>
142. Mohapatra, R. K., Parhi, P. K., Pandey, S., Bindhani, B. K., Thatoi, H., & Panda, C. R. (2019). Active and passive biosorption of Pb (II) using live and dead biomass of marine bacterium *Bacillus xiamenensis* PbRPSD202: Kinetics and isotherm studies. *Journal of environmental management*, 247, 121-134. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.073>
143. Montes, R. H., Lima, A. P., Cunha, R. R., Guedes, T. J., dos Santos, W. T., Nossol, E., ... & Munoz, R. A. (2016). Size effects of multi-walled carbon nanotubes on the electrochemical oxidation of propionic acid derivative drugs: Ibuprofen and naproxen. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775, 342-349
144. Montuori, P., Shojaeian, S. Z., Pennino, F., D'Angelo, D., Sorrentino, M., Di Sarno, S., ... & Triassi, M. (2024). Consumer awareness and knowledge regarding use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in a metropolitan area. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1362632.
145. Montsant, A., Zarka, A., & Boussiba, S. (2001). Presence of a nonhydrolyzable biopolymer in the cell wall of vegetative cells and astaxanthin-rich cysts of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Marine Biotechnology*, 3, 515-521.
146. Moyo, F., Tandlich, R., Wilhelmi, B. S., & Balaz, S. (2014). Sorption of hydrophobic organic compounds on natural sorbents and organoclays from aqueous and non-aqueous solutions: a mini-review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 5020-5048. <https://doi.org/10.3390/ijerph110505020>
147. Muñoz, A. J., Espínola, F., Ruiz, E., Barbosa-Dekker, A. M., Dekker, R. F., & Castro, E. (2021). Biosorption mechanisms of Ag (I) and the synthesis of nanoparticles by the biomass from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Journal of Hazardous Materials*, 420, 126598. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126598>
148. Muñoz, A. J., Espínola, F., Ruiz, E., Barbosa-Dekker, A. M., Dekker, R. F., & Castro, E. (2021). Biosorption mechanisms of Ag (I) and the synthesis of nanoparticles by the biomass from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Journal of Hazardous Materials*, 420, 126598.

149. Mustapha, M. U., Halimoon, N., & Johari, W. L. W. (2020). Optimization of carbofuran insecticide degradation by *Enterobacter* sp. using response surface methodology (RSM). *Journal of King Saud University-Science*, 32(3), 2254-2262. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.03.002>
150. Mutoti, M. I., Jideani, A. I., & Gumbo, J. R. (2022). Using FlowCam and molecular techniques to assess the diversity of Cyanobacteria species in water used for food production. *Scientific Reports*, 12(1), 18995.
151. Nackiewicz, J., Kołodziej, Ł., Poliwoda, A., & Broda, M. A. (2021). Oxidation of diclofenac in the presence of iron (II) octacarboxyphthalocyanine. *Chemosphere*, 265, 129145.
152. Nackiewicz, J., Gąsowska-Bajger, B., Kołodziej, Ł., Poliwoda, A., Pogoda-Mieszczak, K., & Skonieczna, M. (2023). Comparison of the degradation mechanisms of diclofenac in the presence of iron octacarboxyphthalocyanine and myeloperoxidase. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 287, 122113.
153. Naidu, R., Biswas, B., Willett, I. R., Cribb, J., Singh, B. K., Nathanail, C. P., Aitken, R. J. (2021). Chemical pollution: A growing peril and potential catastrophic risk to humanity. *Environment International*, 156, 106616. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106616>
154. Nicolaisen, K., Hahn, A., & Schleiff, E. (2009). The cell wall in heterocyst formation by *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of basic microbiology*, 49(1), 5-24.
155. Nilsson, M., Bhattacharya, J., Rai, A. N., & Bergman, B. (2002). Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic *Nostoc* strains. *New Phytologist*, 156(3), 517-525. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00534.x>
156. Okenicová, L., Žemberyová, M., & Procházková, S. (2016). Biosorbents for solid-phase extraction of toxic elements in waters. *Environmental Chemistry Letters*, 14, 67-77. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0539-x>
157. Oren, A. (2015). Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. *Biodiversity and Conservation*, 24, 781-798. <https://doi.org/10.1007/s10531-015-0882-z>
158. Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P., & Abalde, J. (2000). Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology*, 12, 553-556. <https://doi.org/10.1023/A:1008173807143>
159. Pandey, N., & Keshavkant, S. (2021). Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbents. In *New Trends in Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewater* (pp. 1-21). Elsevier.
160. Pannard, A., Pedrono, J., Bormans, M., Briand, E., Claquin, P., & Lagadeuc, Y. (2016). Production of exopolymers (EPS) by cyanobacteria: impact on the carbon-to-nutrient ratio of the particulate organic matter. *Aquatic Ecology*, 50, 29-44. <https://doi.org/10.1007/s10452-015-9550-3>
161. Park, D., Yun, Y. S., & Park, J. M. (2010). The past, present, and future trends of biosorption. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, 86-102. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0199-4>
162. Parker, R. S. (1989). Carotenoids in human blood and tissues. *The Journal of nutrition*, 119(1), 101-104.
163. Parra-Saldivar, R., Castillo-Zacarias, C., Bilal, M., Iqbal, H. M., & Barceló, D. (2021). Sources of pharmaceuticals in water. Interaction and fate of pharmaceuticals in soil-crop systems: the impact of reclaimed wastewater, 33-47.
164. Pérez-Cejuela, H. M., Herrero-Martínez, J. M., & Simó-Alfonso, E. F. (2020). Recent advances in affinity MOF-based sorbents with sample preparation purposes. *Molecules*, 25(18), 4216. <https://doi.org/10.3390/molecules25184216>
165. Pleonsil, P., Soogarun, S., & Suwanwong, Y. (2013). Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycocyanin and their protective effects on human erythrocytes. *International journal of biological macromolecules*, 60, 393-398. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.016>
166. Przybyła, G. W., Szychowski, K. A., & Gmiński, J. (2021). Paracetamol—An old drug with new mechanisms of action. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48(1), 3-19. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13392>
167. Pubchem/Acetaminophen - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen#section=Autoignition-Temperature>
168. Pubchem/Diclofenac - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac>
169. Pubchem/Ibuprofen - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ibuprofen>
170. Qin, H., Hu, T., Zhai, Y., Lu, N., & Aliyeva, J. (2020). The improved methods of heavy metals removal by biosorbents: A review. *Environmental pollution*, 258, 113777.
171. Rainsford, K. D. (2013). Ibuprofen: from invention to an OTC therapeutic mainstay. *International Journal of Clinical Practice*, 67, 9-20.
172. Rainsford, K. D., & Rainsford, K. D. (2012). Mechanisms of Inflammation and Sites of Action of NSAIDs. *Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and Side Effects*, 43-57.
173. Rastogi, A., Tiwari, M. K., & Ghangrekar, M. M. (2021). A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs). *Journal of Environmental Management*, 300, 113694.

174. Rathi, B. S., Kumar, P. S., & Vo, D. V. N. (2021). Critical review on hazardous pollutants in water environment: Occurrence, monitoring, fate, removal technologies and risk assessment. *Science of the Total Environment*, 797, 149134. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149134>
175. Rezayian, M., Niknam, V., & Ebrahimpzadeh, H. (2019). Stress response in cyanobacteria. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 9(3), 2773-2787.
176. Richmond, E. K., Rosi, E. J., Walters, D. M., Fick, J., Hamilton, S. K., Brodin, T., ... & Grace, M. R. (2018). A diverse suite of pharmaceuticals contaminates stream and riparian food webs. *Nature Communications*, 9(1), 4491. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06822-w>
177. Rinanti, A., Fachrul, M. F., & Hadisoebroto, R. (2017). Improving biosorption of Cu (II)-ion on artificial wastewater by immobilized biosorbent of tropical microalgae. *GEOMATE Journal*, 13(36), 6-10. <http://dx.doi.org/10.21660/2017.36.2744>
178. Ríos, A. L. M., Gutierrez-Suarez, K., Carmona, Z., Ramos, C. G., & Oliveira, L. F. S. (2022). Pharmaceuticals as emerging pollutants: Case naproxen an overview. *Chemosphere*, 291, 132822. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132822>
179. Robert, F. O., Pandhal, J., & Wright, P. C. (2010). Exploiting cyanobacterial P450 pathways. *Current opinion in microbiology*, 13(3), 301-306. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.007>
180. Ronco, C., & Bellomo, R. (2023). History and development of sorbents and requirements for sorbent materials. *Contributions to nephrology*, 200, 2-7. <https://doi.org/10.1159/000529569>
181. Rostom, M., Selim, K. A., & Safwat, G. (2019). *Bacillus Subtilis* Bacteria as a Biosorbent for Dye Removal from Industrial Water Effluents. *Elixir Bio Tech*. 130 (2019) 53168-53170
182. Rowe, J. D., & Griffiths, W. T. (1995). Protochlorophyllide reductase in photosynthetic prokaryotes and its role in chlorophyll synthesis. *Biochemical journal*, 311(2), 417-424.
183. Ru, I. T. K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M. E. A., & Nagappan, T. (2020). *Chlorella vulgaris*: A perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Applied Phycology*, 1(1), 2-11. <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1715256>
184. Ruffolo, F., Dinhof, T., Murray, L., Zangelmi, E., Chin, J. P., Pallitsch, K., & Peracchi, A. (2023). The microbial degradation of natural and anthropogenic phosphonates. *Molecules*, 28(19), 6863.
185. Rusu, L., Grigoraş, C. G., Simion, A. I., Suceveanu, E. M., Istrate, B., & Harja, M. (2022). Biosorption potential of microbial and residual biomass of *saccharomyces pastorianus* immobilized in calcium alginate matrix for pharmaceuticals removal from aqueous solutions. *Polymers*, 14(14), 2855. <https://doi.org/10.3390/polym14142855>
186. Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 35, 265-278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
187. Sallmann, A. R. (1986). The history of diclofenac. *The American Journal of Medicine*, 80(4), 29-33.
188. Sandri, A. (2014). Diclofenac: update on tolerableness and spinal anti-inflammatory action. *Minerva Medica*, 105(4), 313-318.
189. Santaefemia, S., Torres, E., & Abalde, J. (2018). Biosorption of ibuprofen from aqueous solution using living and dead biomass of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Applied Phycology*, 30, 471-482.
190. Santaefemia, S., Torres, E., Mera, R., & Abalde, J. (2016). Bioremediation of oxytetracycline in seawater by living and dead biomass of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of hazardous materials*, 320, 315-325. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.042>
191. Sarmah, P., & Rout, J. (2020). Role of algae and cyanobacteria in bioremediation: prospects in polyethylene biodegradation. In *Advances in cyanobacterial biology* (pp. 333-349). Academic Press.
192. Sellier, A., Khaska, S., & La Salle, C. L. G. (2022). Assessment of the occurrence of 455 pharmaceutical compounds in sludge according to their physical and chemical properties: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 426, 128104. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128104>
193. Shen, N., & Chirwa, E. M. (2020). Live and lyophilized fungi-algae pellets as novel biosorbents for gold recovery: Critical parameters, isotherm, kinetics and regeneration studies. *Bioresource technology*, 306, 123041. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123041>
194. Silah, H., & Gül, Ü. D. (2017, April). Comparison of nickel biosorption properties of living and dead *Rhizopus arrhizus* biosorbent. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1833, No. 1). AIP Publishing. <https://doi.org/10.1063/1.4981753>
195. Silva, A., Delerue-Matos, C., Figueiredo, S. A., & Freitas, O. M. (2019). The use of algae and fungi for removal of pharmaceuticals by bioremediation and biosorption processes: a review. *Water*, 11(8), 1555. <https://doi.org/10.3390/w11081555>
196. Sivonen, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35(sup6), 12-24

197. Singha, B., & Das, S. K. (2012). Removal of Pb (II) ions from aqueous solution and industrial effluent using natural biosorbents. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 2212-2226. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0725-8>
198. Sinha, R. P., & Häder, D. P. (1996). Response of a rice field cyanobacterium *Anabaena* sp. to physiological stressors. *Environmental and experimental botany*, 36(2), 147-155.
199. Sinha, R. P. (2003). Stress responses in Cyanobacteria. *Modern trends in applied aquatic ecology*, 201-218. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0221-0_9
200. Soares, P. R. S., Birolli, W. G., Ferreira, I. M., & Porto, A. L. M. (2021). Biodegradation pathway of the organophosphate pesticides chlorpyrifos, methyl parathion and profenofos by the marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 and its potential for methylation reactions of phenolic compounds. *Marine Pollution Bulletin*, 166, 112185. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112185>
201. Sneha, G. R., Annayya, Hembrom, B. B., Varghese, E., Yadav, R. K., & Abraham, G. (2023). Screening and selection of *Anabaena* spp. for desiccation tolerance through physiological parameters and multivariate analysis. *Journal of Applied Phycology*, 35(3), 1273-1284
202. Srivastava, A. K., Rai, A. N., & Neilan, B. A. (Eds.). (2013). *Stress biology of cyanobacteria: molecular mechanisms to cellular responses*. CRC Press.
203. Stebbegg, R., Schmetterer, G., & Rompel, A. (2023). Heterotrophy among cyanobacteria. *ACS omega*, 8(37), 33098-33114.
204. Strzemiescka, B., Kasperkowiak, M., Łożyński, M., Paukszta, D., & Voelkel, A. (2012). Examination of zeolites as fragrance carriers. *Microporous and Mesoporous Materials*, 161, 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.05.024>
205. Sun, F., Zhang, H., Qian, A., Yu, H., Xu, C., Pan, R., & Shi, Y. (2020). The influence of extracellular polymeric substances on the coagulation process of cyanobacteria. *Science of the Total Environment*, 720, 137573. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137573>
206. Sun, P., Hui, C., Wang, S., Wan, L., Zhang, X., & Zhao, Y. (2016). *Bacillus amyloliquefaciens* biofilm as a novel biosorbent for the removal of crystal violet from solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 164-170. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.014>
207. Suzuki, T., Hidaka, T., Kumagai, Y., & Yamamoto, M. (2020). Environmental pollutants and the immune response. *Nature Immunology*, 21(12), 1486-1495.
208. Śliwińska-Wilczewska, S., Cieszyńska, A., Konik, M., Maculewicz, J., & Latała, A. (2019). Environmental drivers of bloom-forming cyanobacteria in the Baltic Sea: Effects of salinity, temperature, and irradiance. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 219, 139-150.
209. Świacka, K., Michnowska, A., Maculewicz, J., Caban, M., & Smolarz, K. (2021). Toxic effects of NSAIDs in non-target species: a review from the perspective of the aquatic environment. *Environmental Pollution*, 273, 115891. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115891>
210. Tan, H., Wang, C., Zeng, G., Luo, Y., Li, H., & Xu, H. (2020). Bioreduction and biosorption of Cr (VI) by a novel *Bacillus* sp. CRB-B1 strain. *Journal of hazardous materials*, 386, 121628.
211. Tanaka, R., & Tanaka, A. (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8), 968-976. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.01.002>
212. Tang, F. H., Lenzen, M., McBratney, A., & Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature geoscience*, 14(4), 206-210.
213. Ternan, N. G., Mc Grath, J. W., Mc Mullan, G., & Quinn, J. P. (1998). Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(5), 635-647. <https://doi.org/10.1023/A:1008848401799>
214. Thawabteh, A. M., Naseef, H. A., Karaman, D., Bufo, S. A., Scrano, L., & Karaman, R. (2023). Understanding the risks of diffusion of cyanobacteria toxins in rivers, lakes, and potable water. *Toxins*, 15(9), 582.
215. Thijssen, H. H., Soute, B. A., Vervoort, L. M., & Claessens, J. G. (2004). Paracetamol (acetaminophen) warfarin interaction: NAPQI, the toxic metabolite of paracetamol, is an inhibitor of enzymes in the vitamin K cycle. *Thrombosis and haemostasis*, 92(10), 797-802. DOI: 10.1160/TH04-02-0109
216. Tiwari, B., Chakraborty, S., Srivastava, A. K., & Mishra, A. K. (2017). Biodegradation and rapid removal of methyl parathion by the paddy field cyanobacterium *Fischerella* sp. *Algal research*, 25, 285-296. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.024>
217. Tkaczyk, A., Bownik, A., Dudka, J., Kowal, K., & Ślaska, B. (2021). *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *Science of the Total Environment*, 763, 143038.
218. Torres, E. (2020). Biosorption: A review of the latest advances. *Processes*, 8(12), 1584.
219. Van Apeldoorn, M. E., Van Egmond, H. P., Speijers, G. J., & Bakker, G. J. (2007). Toxins of cyanobacteria. *Molecular nutrition & food research*, 51(1), 7-60.

220. Vatovec, C., Van Wagoner, E., & Evans, C. (2017). Investigating sources of pharmaceutical pollution: Survey of over-the-counter and prescription medication purchasing, use, and disposal practices among university students. *Journal of environmental management*, 198, 348-352.
221. Vaudin, P., Augé, C., Just, N., Mhaouty-Kodja, S., Mortaud, S., & Pillon, D. (2022). When pharmaceutical drugs become environmental pollutants: Potential neural effects and underlying mechanisms. *Environmental Research*, 205, 112495. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112495>
222. Vega Cuellar, M. Á., Calderón Domínguez, G., Perea Flores, M. D. J., Pena Barrientos, A., Salgado Cruz, M. D. L. P., García Hernández, A. B., & Davila Ortiz, G. (2022). Use of microorganisms and agro-industrial wastes in the biosorption of chromium (VI): a review. *Waste and Biomass Valorization*, 13(10), 4115-4136.
223. Vershinin, A. (1999). Biological functions of carotenoids - diversity and evolution. *Biofactors*, 10(2 - 3), 99-104.
224. Vijayaraghavan, K., & Yun, Y. S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*, 26(3), 266-291. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.002>
225. Vincent, W. F. (2009). *Cyanobacteria. Protists, Bacteria and Fungi: Planktonic and Attached*. Elsevier Inc.; 226 – 232
226. Vishnu, D., Gopinath, K. P., & Dhandapani, B. (2020). Biosorption of Metal Ions Present in Industrial Wastewater. In *Green Adsorbents to Remove Metals, Dyes and Boron from Polluted Water* (pp. 229-243). Cham: Springer International Publishing.
227. Vo, H. N. P., Le, G. K., Nguyen, T. M. H., Bui, X. T., Nguyen, K. H., Rene, E. R., ... & Mohan, R. (2019). Acetaminophen micropollutant: Historical and current occurrences, toxicity, removal strategies and transformation pathways in different environments. *Chemosphere*, 236, 124391. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124391>
228. Volesky, B. (1990). Biosorption and biosorbents. *Biosorption of heavy metals*, 3-5.
229. Wada, N., Sakamoto, T., & Matsugo, S. (2013). Multiple roles of photosynthetic and sunscreen pigments in cyanobacteria focusing on the oxidative stress. *Metabolites*, 3(2), 463-483.
230. Wasi, S., Tabrez, S., & Ahmad, M. (2013). Toxicological effects of major environmental pollutants: an overview. *Environmental monitoring and assessment*, 185, 2585-2593.
231. Watanabe, M., Semchonok, D. A., Webber-Birungi, M. T., Ehira, S., Kondo, K., Narikawa, R., ... & Ikeuchi, M. (2014). Attachment of phycobilisomes in an antenna–photosystem I supercomplex of cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(7), 2512-2517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320599111>
232. Williams, E. T. (2019). Environmental pollution by heavy metal: an overview. *International Journal of Environmental Chemistry*, 12(2), 72-82.
233. Wu, Z. Y., Li, C., Liang, H. W., Zhang, Y. N., Wang, X., Chen, J. F., & Yu, S. H. (2014). Carbon nanofiber aerogels for emergent cleanup of oil spillage and chemical leakage under harsh conditions. *Scientific reports*, 4(1), 4079. <https://doi.org/10.1038/srep04079>
234. Xie, Z., Lu, G., Yan, Z., Liu, J., Wang, P., & Wang, Y. (2017). Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake. *Environmental Pollution*, 222, 356-366.
235. Young, A. J., & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and biophysics*, 385(1), 20-27. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2149>
236. Zandaryaa, S., & Frank-Kamenetsky, D. (2021). A source-to-sea approach to emerging pollutants in freshwater and oceans: Pharmaceuticals in the Baltic Sea region. In *Source-to-Sea Management* (pp. 60-75). Routledge.
237. Zhang, C., Ren, H. X., Zhong, C. Q., & Wu, D. (2020). Biosorption of Cr (VI) by immobilized waste biomass from polyglutamic acid production. *Scientific Reports*, 10(1), 3705.
238. Zhang, S., Wang, S., & Zhan, J. (2016). Engineered biosynthesis of medicinally important plant natural products in microorganisms. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(15), 1740-1754.
239. Zhang, X., Yip, A. C., & Pang, S. (2023). Advances in the application of active metal-based sorbents and oxygen carriers in chemical looping biomass steam gasification for H₂ production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 48(28), 10394-10422. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.11.317>
240. Zheng, H., Guo, W., Li, S., Chen, Y., Wu, Q., Feng, X., Chang, J. S. (2017). Adsorption of p-nitrophenols (PNP) on microalgal biochar: analysis of high adsorption capacity and mechanism. *Bioresource technology*, 244, 1456-1464. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.025>
241. ZHOU, Z. P., LIU, L. N., CHEN, X. L., WANG, J. X., Chen, M. I. N., ZHANG, Y. Z., & ZHOU, B. C. (2005). Factors that effect antioxidant activity of C - phycocyanins from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 313-322. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00035.x>
242. Żur, J., Piński, A., Marchlewicz, A., Hupert-Kocurek, K., Wojcieszńska, D., & Guzik, U. (2018). Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 21498-21524.

9. Dorobek naukowy

▪ Publikacje:

- Jerzy Pogrzeba, Anna Poliwoda; "Biosorption Ability of Pharmaceutically Active Compounds by *Anabaena* sp. and *Chroococcidiopsis thermalis*". *Molecules* (2024), 29(18), 4488. (*Molecules*; IF 4.2 (2024), punkty MNiSW: 140)
- Emilia Niemczyk, Jerzy Pogrzeba, Jacek Lipok; „Fikobiliproteiny – barwne białka o nietypowej strukturze, interesujących właściwościach i zastosowaniu”; *Wiadomości Chemiczne* (2024), punkty MNiSW : 20)
- Emilia Niemczyk, Jerzy Pogrzeba, Agnieszka Adamczyk-Woźniak, Jacek Lipok; „Boronic Acids of Pharmaceutical Importance Affect the Growth and Photosynthetic Apparatus of Cyanobacteria in a Dose-Dependent Manner”; *Toxins* (2020), 12, 793, 1-18; (*Toxins*; IF 4.546 (2020), punkty MNiSW : 100)

▪ Ustne wystąpienia konferencyjne:

- Konferencja międzynarodowa: „Application of microorganisms as biosorbents to remove xenobiotics from the aquatic environmental”; QUO VADIS Life Sciences conference Opole 23-27 czerwca 2021;
- Konferencja ogólnopolska: “Freshwater cyanobacteria as effective biosorbents” J.Pogrzeba, A.Poliwoda; XIX Ogólnopolskie Seminarium Doktorantów i Studentów „Na pograniczu Chemii i Biologii, 4-7 czerwca 2023;
- Konferencja ogólnopolska: “Zastosowanie techniki LC-MS do oceny skuteczności biosorpcji leków przez słodkowodne sinice” J.Pogrzeba, A. Poliwoda; XIII Polska Konferencja Chromatograficzna, Katowice 25-28 czerwca 2023;

▪ Posterowe wystąpienia konferencyjne:

- Konferencja ogólnopolska: „Zastosowanie cyjanobakterii do biosorbowania leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych”; J. Pogrzeba, A. Poliwoda; XI Polska Konferencja Chemii Analitycznej 2022, Łódź 19-23 czerwca 2022;
- Konferencja ogólnopolska: „Interakcja leków przeciwbólowych z sinicą *Anabaena* sp.” J. Pogrzeba, A. Poliwoda; Zimowy Zjazd Sekcji Młodych PTChem 2022, Opole 10 grudnia 2022;

▪ Udział w projektach badawczych:

- 18.05.2021r. – 31.12.2021r. – projekt dla doktorantów: działalność naukowa w roku 2021 prowadzonej przez doktorantów Instytutu Chemii UO będących słuchaczami Szkoły Doktorskiej UO; Tytuł: Zastosowanie mikroorganizmów jako biosorbentów i biorekultywatorów do usuwania ksenobiotyków organicznych ze środowiska wodnego;

000685-2/2/SzD/ICh/21-M; Finansowane i realizowane przez Instytut Chemii Uniwersytetu Opolskiego;

- Nagrody

- Nagroda Rektora 2021/2022; 2022/2023; 2023/2024

- Staże naukowe

- 7-8 kwietnia 2022r.; Instytut Chemii Fizycznej Państwowej Akademii Nauk w Warszawie, zespół numer 21, pod kierunkiem dr hab. Anny Śrębowatej prof. PAN;

- Działalność popularyzująca naukę:

- 2020 Udział w Opolskim Festiwalu Nauki;
- 2021 i 2022 Udział i pomoc w organizacji Szkoły Letniej Uniwersytetu Opolskiego;
- Uczestnictwo w pokazach i seminariach dla szkół podstawowych i ponadpodstawowych w latach 2020 - 2023;

- Działalność organizacyjna:

- Starosta na I i II roku Szkoły Doktorskiej UO roku kształcenia 2020 – 2024;
- Przewodniczący Samorządu Doktorantów w kadencji 2022 – 2024;
- Przedstawiciel doktorantów w Senacie Uniwersytetu Opolskiego w latach 2023 – 2024;
- Współpraca przy organizacyjnej konferencji QUO VADIS Life Sciences conference Opole 23-27 czerwca 2021;
- Współpraca przy organizacyjnej konferencji Zimowy Zjazd Sekcji Młodych PTChem 2022, Opole 10 grudnia 2022;

10. Spis rysunków i tabel

Spis rysunków:

Rysunek 1. Schemat obiegu leków ksenofarmaceutyków w środowisku.	10
Rysunek 2. Struktury chemiczne wybranych związków o działaniu przeciwbólowym i/lub przeciwzapalnym.	12
Rysunek 3. Podstawowe mechanizmy biosorpcji na przykładzie oddziaływania toksycznych jonów metali z komórką cyjanobakterii.	19
Rysunek 4. Porównanie budowy ścian komórkowych bakterii Gram-ujemnych i cyjanobakterii.	26
Rysunek 5. Struktury chemiczne chlorofilu	27
Rysunek 6. Struktury wybranych przedstawicieli poszczególnych grup karotenoidów.	28
Rysunek 7. Struktury dwóch najczęściej występujących fikobilin, z zaznaczoną cysteiną łączącą je z częścią białkową. Po lewej fikocyjanobilina, po prawej fikoerytrobilina.	29
Rysunek 8 Zestawienie chromatogramów mieszaniny poszczególnych analitów przy zastosowaniu optymalnych warunków opracowanych metod LC. Stężenie analizowanych związków wynosiło 300 µM. Matryca: BG11	44
Rysunek 9 Zestawienie chromatogramów z analizy ekstraktów 21-dniowych płynów pochodzących przy długości fali 270 nm (A) oraz 238 nm (B). Kolorem fioletowym oznaczono próbę z konsorcjum cyjanobakterii o wyjściowym stężeniu chlorofilu 1 mg/l, a kolorem niebieskim – o stężeniu 2 mg/l. Próbę kontrolną oznaczono kolorem czarnym. Czerwoną ramką zaznaczono sygnał pochodzący od nieznannej substancji.	45
Rysunek 10 Widma masowe ibuprofenu (po lewej) i diklofenaku (po prawej) z zaznaczonymi jonami molekularnymi oraz fragmentacyjnymi lub właściwym adduktem	46
Rysunek 11 Współczynnik wzrostu dwóch badanych gatunków cyjanobakterii w odpowiedzi na rosnące stężenia trzech testowanych leków. Czerwona linia (100%) reprezentuje wzrost w próbie kontrolnej (n=3; RSD < 10%).	47
Rysunek 12 Zmiany metaboliczne w komórkach dwóch badanych słodkowodnych gatunków cyjanobakterii, przedstawione jako proporcje pigmentów fotosyntetycznych po 21 dniach ekspozycji na różne stężenia paracetamolu. Gwiazdki wskazują poziomy istotności statystycznej: 0,05 < p; * 0,0021 < p < 0,05; ** p < 0,0021, (n=3; RSD < 10%).	48
Rysunek 13 Zmiany metaboliczne w komórkach dwóch badanych słodkowodnych gatunków cyjanobakterii, wyrażone jako proporcje pigmentów fotosyntetycznych po 21 dniach ekspozycji na wybrane stężenia diklofenaku. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej, odpowiednio: 0,05 < p; * 0,0021 < p < 0,05; ** p < 0,0021, (n=3; RSD < 10%).	49
Rysunek 14 Metaboliczne zmiany w komórkach dwóch testowanych słodkowodnych gatunków cyjanobakterii, wyrażone jako proporcje pigmentów fotosyntetycznych po 21 dniach ekspozycji na różne stężenia ibuprofenu. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej, odpowiednio: 0,05 < p; * 0,0021 < p < 0,05; ** p < 0,0021, (n=3; RSD < 10%).	50
Rysunek 15 Efektywność biosorpcji poszczególnych ksenofarmaceutyków z medium pochodzącego po 21 dniach hodowli. Czerwoną linią (100%) wskazuje całkowite usunięcie leku (n=9; RSD < 10%).	51
Rysunek 16 Efektywność adsorpcji poszczególnych testowanych substancji na powierzchni komórek cyjanobakterii. Linią falowaną rozgraniczono zmianę skali (n=9; RSD < 10%).	52
Rysunek 17 Rozwój pojedynczych gatunków słodkowodnych cyjanobakterii i ich konsorcjów w obecności mieszanin testowanych leków, (n=3; RSD < 10%)	54
Rysunek 18 Zmiany metaboliczne w komórkach <i>Anabaena</i> sp. i <i>Chroococcidiopsis thermalis</i> inkubowanych w mieszaninach testowanych leków, testowanych w układach z pojedynczym mikroorganizmem oraz w odpowiednich konsorcjach. Gwiazdki wskazują progi istotności statystycznej, odpowiednio: 0,05 < p; * 0,0021 < p < 0,05; ** p < 0,0021 (n=3; RSD < 10%).	55
Rysunek 19 Efektywność usuwania poszczególnych ksenofarmaceutyków z ich mieszaniny przez pojedyncze gatunki sinic oraz ich konsorcja (n=9; RSD < 10%).	57
Rysunek 20 Adsorpcja na powierzchni komórek poszczególnych składników mieszanin ksenofarmaceutyków. Wyniki przedstawiono zarówno dla pojedynczych gatunków, jak i ich konsorcjów (n=9; RSD < 10%).	58
Rysunek 21 Stężenie poszczególnych leków we wnętrzu komórek w porównaniu do próby odniesienia (n=9; RSD < 10%).	59
Rysunek 22 Zdjęcia SEM konsorcjów badanych cyjanobakterii po 21 dniach hodowli. Obrazy w powiększeniu 1200 razy.	60
Rysunek 23 Zdjęcia SEM konsorcjów badanych cyjanobakterii po upływie 21 dni. obrazy w powiększeniu 5000 razy.	61
Rysunek 24 Efektywność biosorpcji testowanych związków z medium hodowanego w czasie. Zielony kolor ilustruje przyrost poszczególnych gatunków w ciągu 21 dni (n=9; RSD < 10%).	62
Rysunek 25 Efektywność biosorpcji w czasie z medium hodowanego testowanych związków. Kolorem zielonym zobrazowano przyrost konsorcjów w czasie 21 dni, (n=9; RSD < 10%).	63
Rysunek 26 Współczynnik wzrostu testowanych gatunków sinic w obecności badanych związków w pożywce pozbawionej węgla. Czerwona linia wskazuje poziom wzrostu w próbie kontrolnej bez dodatku węgla (n=3; RSD < 10%).	65
Rysunek 27 Proporcje barwników fotosyntetycznych w komórkach cyjanobakterii inkubowanych w pożywce pozbawionej związków węgla. Gwiazdki wskazują na istotne statystycznie zmiany w stężeniu pigmentów 0,05 < p; * 0,0021 < p < 0,05; ** p < 0,0021 (n=3; RSD < 10%).	66
Rysunek 28 Efektywność biosorpcji badanych substancji w zubożonym medium hodowanym zawierającym związki węgla (n=9; RSD < 10%).	67
Rysunek 29 Współczynnik wzrostu <i>Arthrospira platensis</i> po 21 dniach inkubacji w medium z dodatkiem pojedynczych testowanych ksenofarmaceutyków i ich mieszanin, oraz w układzie z pożywką pozbawioną obecności węgla (n=3; RSD < 10%).	69

Rysunek 30 Metaboliczne zmiany w komórkach <i>Arthrospira platensis</i> w 21. dniu hodowli z dodatkiem testowanych ksenofarmaceutyków. Gwiazdki oznaczają poziomy istotności statystycznej: * 0,0021 < p < 0,05; ** p < 0,0021, (n=3; RSD < 10%).	70
Rysunek 31 Efektywność biosorpcji testowanych leków przez gatunek <i>Arthrospira platensis</i> w 21 dniu hodowli (n=9; RSD < 10%).	72
Rysunek 32 Porównanie wartości współczynnika wzrostu testowanych gatunków cyjanobakterii, przedstawionego w procentach względem kontroli (100%), w kontekście wszystkich badanych układów eksperymentalnych.	74
Rysunek 33 Zestawienie wartości efektywności biosorpcji poszczególnych ksenofarmaceutyków, wyrażonego w procentach w porównaniu do próby odniesienia – pożywka z testowanym związkiem bez obecności komórek sinic. Po lewej stronie wykresu zamieszczono stężenia poszczególnych związków lub końcowe stężenia poszczególnych mieszanin.	76
Rysunek 34 Mikroskopowe zdjęcia rozwielitek (<i>Daphnia magna</i>) wykonane przy 100-krotnym powiększeniu. Litery nad zdjęciami odpowiadają osobnikom inkubowanym w różnych płynach pohodowlanych: A – kontrola, B – paracetamol, C – diklofenak, D – ibuprofen, E – mieszanina.	78
Rysunek 35 Wpływ płynów pohodowlanych pochodzących z hodowli <i>Arthrospira platensis</i> z dodatkiem wybranych farmaceutyków na liczebność żywych osobników <i>Daphnia magna</i> oraz tętno bicia ich serca (n=3., RSD <10%).	78
Rysunek 36 Rozwój dwóch gatunków mikroalg w płynach pohodowlanych <i>A. platensis</i> – stężenie chlorofilu w czasie 14-dniowej inkubacji (n=3., RSD <10%).	80
Rysunek 37 Chromatogramy LC-MS, w trybie SIM (m/z 587,02), próbki kontrolnej, próbki z hodowli eksperymentalnej z <i>Anabaena</i> sp. oraz <i>Ch. thermalis</i> inkubowanych z diklofenakiem (100 µM) (n=3, RSD<10%).	83
Rysunek 38 Widma MS i MS/MS związku nr 2 zidentyfikowanego jako dimer DCF, którego obecność potwierdzono w pożywce pohodowlanej <i>Anabaena</i> sp. zawierającej diklofenak jako badany ksenofarmaceutyk. Widmo MS sygnału o wartości m/z 587,02 (A) i odpowiadającemu widma MS/MS (B i C).	84
Rysunek 39 Przykładowy chromatogram analizy LC-MS próbki (C) uzyskany po odjęciu chromatogramu próby kontrolnej (A) od chromatogramu hodowli eksperymentalnej (B) dla hodowli <i>Ch. thermalis</i> . inkubowanej z diklofenakiem (100 µM) (n=3, RSD<10%).	84
Rysunek 40 Widma MS i MS/MS związku nr 1, którego obecność potwierdzono w pożywce pohodowlanej <i>Anabaena</i> sp. zawierającej diklofenak jako badany ksenofarmaceutyk. Widmo MS sygnału o wartości m/z 250.01 i odpowiadające mu widmo MS/MS.	85
Rysunek 41 Widma MS i MS/MS związku nr 3, którego obecność potwierdzono w pożywce pohodowlanej <i>Chroococcidiopsis thermalis</i> zawierającej diklofenak lub mieszaninę badanych związków. Widmo MS sygnału o wartości m/z 258.03 i odpowiadające mu widmo MS/MS.	85

Spis tabel

Tabela 1. Porównanie trzech testowanych ksenofarmaceutyków oraz ich kluczowych właściwości.	34
Tabela 2 Jony molekularne (m/z) oraz fragmentacyjne badanych farmaceutyków	34
Tabela 3 Zestawienie podstawowych informacji o testowanych gatunkach cyjanobakterii.	35
Tabela 4 Identyfikator (skrót), nazwa oraz zdjęcia mikroskopowe organizmów, na których testowano toksyczność płynów pohodowlanych <i>A. platensis</i> .	42
Tabela 5 Warunki rozdzielania chromatograficznego dla dwóch opracowanych metod analitycznych.	43
Tabela 6 Zestaw potencjalnych metabolitów.	86

11. Suplement

Tabela S 1 Skład medium hodowlanego BG11

Roztwór	Składnik	Stężenie [g / L]	Objętość H ₂ O [mL]
I	NaNO ₃	1,5	900
	MgSO ₄	0,036	
	CaCl ₂	0,028	
	Kwas cytrynowy	0,0065	
	Na ₂ CO ₃	0,02	
	EDTA	0,001	
	Cytrynian Fe-NH ₃	0,006	
II	K ₂ HPO ₄	0,03	100
Mikroelementy A5+Co	H ₃ BO ₃	2,86	1
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	1,81	
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,22	
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,079	
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,39	
	Co(NO ₃) ₂ x 2H ₂ O	0,05	

Tabela S 2 Skład medium hodowlanego MSp (ATCC 1676).

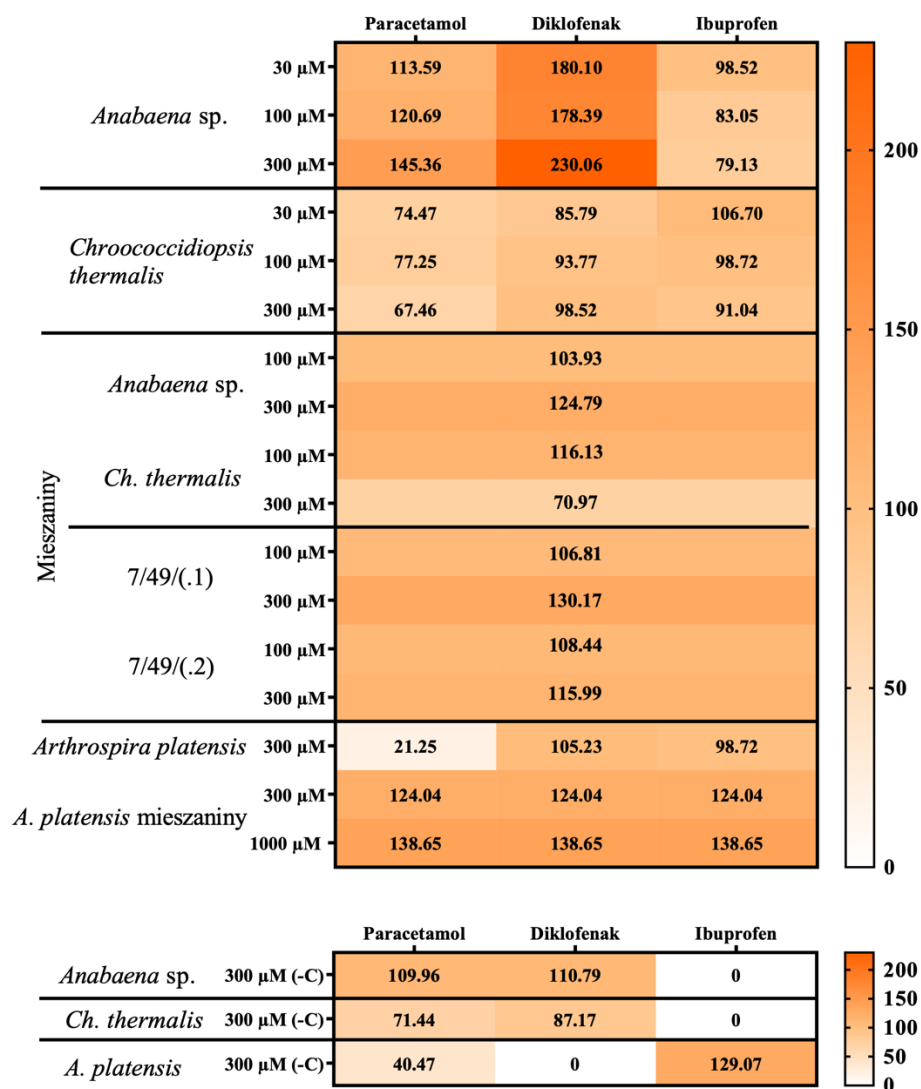
Roztwór	Składnik	Stężenie [g / L]	Objętość H ₂ O [mL]
I	NaHCO ₃	13,61	700
	Na ₂ CO ₃	4,03	
II	K ₂ HPO ₄	0,5	100
III	NaNO ₃	2,5	200
	K ₂ SO ₄	1	
	NaCl	1	
	MgSO ₄	0,098	
	CaCl ₂	0,0303	
	FeSO ₄ x H ₂ O	0,01	
	EDTA	0,08	
Mikroelementy A5+Co	H ₃ BO ₃	2,86	1
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	1,81	
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,22	
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,079	
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,39	
	Co(NO ₃) ₂ x 2H ₂ O	0,05	
Mikroelementy B6+Co	NH ₄ NO ₃	0,23	1
	KCr(SO ₄) ₂ x 12H ₂ O	0,096	
	NiSO ₄ x 7H ₂ O	0,048	
	NaWO ₄ x 2H ₂ O	0,018	
	TiO ₂	0,017	

Tabela S 3 Skład medium hodowlanego BG11 pozbawionego związków zawierających węgiel.

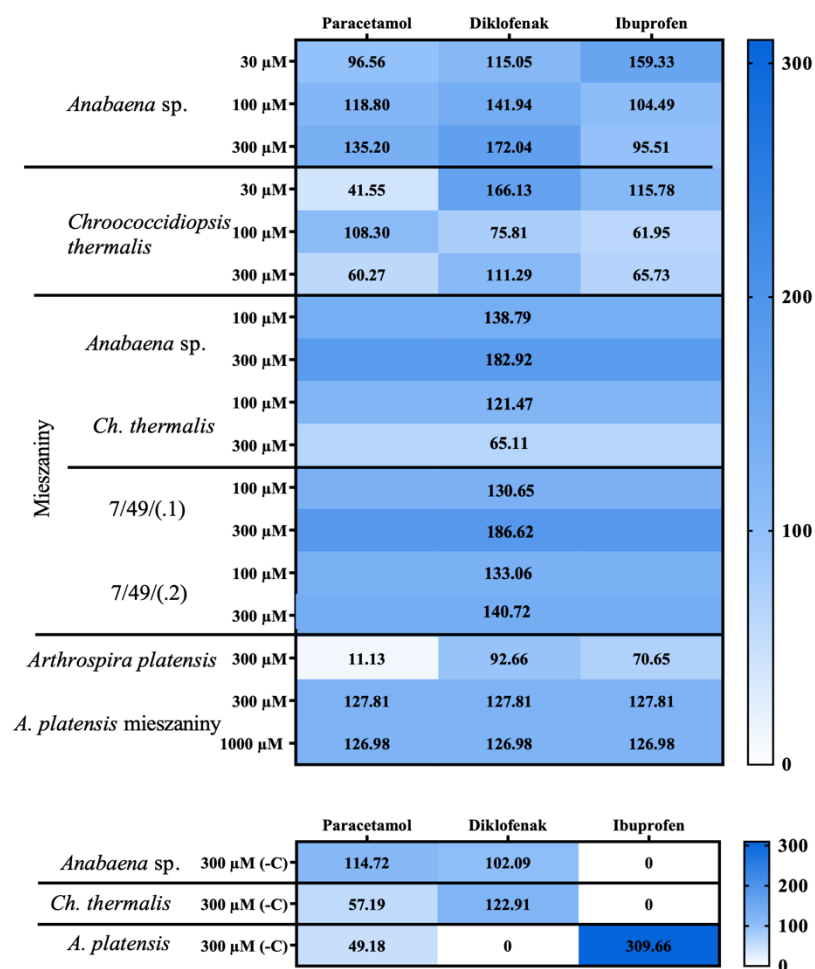
Roztwór	Składnik	Stężenie [g / L]	Objętość H ₂ O [mL]
I	NaNO ₃	1,5	900
	MgSO ₄	0,036	
	CaCl ₂	0,028	
	FeSO ₄ x H ₂ O	0,006	
II	K ₂ HPO ₄	0,03	100
Mikroelementy A5+Co	H ₃ BO ₃	2,86	1
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	1,81	
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,22	
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,079	
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,39	
	Co(NO ₃) ₂ x 2H ₂ O	0,05	

Tabela S 4 Skład medium hodowlanego MSp (ATCC 1676) pozbawionego związków zawierających węgiel.

Roztwór	Składnik	Stężenie [g / L]	Objętość H ₂ O [mL]
I	NaNO ₃	4,03	700
II	K ₂ HPO ₄	0,5	100
III	NaNO ₃	2,5	200
	K ₂ SO ₄	1	
	NaCl	1	
	MgSO ₄	0,098	
	CaCl ₂	0,0303	
	FeSO ₄ x H ₂ O	0,01	
Mikroelementy A5+Co	H ₃ BO ₃	2,86	1
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	1,81	
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,22	
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,079	
	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,39	
	Co(NO ₃) ₂ x 2H ₂ O	0,05	
Mikroelementy B6+Co	NH ₄ NO ₃	0,23	1
	KCr(SO ₄) ₂ x 12H ₂ O	0,096	
	NiSO ₄ x 7H ₂ O	0,048	
	NaWO ₄ x 2H ₂ O	0,018	
	TiO ₂	0,017	



Rysunek S 1 Mapa ciepła obrazująca zawartość karotenoidów w komórkach testowanych cyjanobakterii lub ich konsorcjów we wszystkich układach eksperymentalnych w 21 dniu hodowli. Wartości podano w procentach w odniesieniu do odpowiedniej kontroli (100%).



Rysunek S 2 Mapa ciepła obrazująca zawartość fikobiliprotein w komórkach testowanych cyjanobakterii lub ich konsorcjów we wszystkich układach eksperymentalnych w 21 dniu hodowli. Wartości podano w procentach w odniesieniu do odpowiedniej kontroli (100%).