

2. Summary in Polish

Mikrozanieczyszczenia, w tym farmaceutyki, plastyfikatory oraz inne nowo pojawiające się grupy związków chemicznych to substancje, które są wprowadzane do środowiska m.in. w wyniku działalności antropogenicznej, takiej jak emisje przemysłowe oraz ścieki komunalne (Narwał et al. 2023). Związki te występują w środowisku w śladowych stężeniach, zazwyczaj w zakresie od mikrogramów do nanogramów na litr. Stan wiedzy na temat toksyczności, losu środowiskowego oraz właściwości substancji określanych mianem nowo pojawiających się zanieczyszczeń, mimo zwiększającej się ilości badań, pozostaje ciągle ubogi. Ich trwałość lub pseudo-trwałość wynikająca z ciągłego uwalniania do środowiska, a także potencjał do bioakumulacji i biomagnifikacji sprawiają, iż, stanowią one istotne zagrożenie zarówno dla ekosystemów lądowych, jak i wodnych. Ekotoksykologiczne skutki obecności mikrozanieczyszczeń związane z organizmami wodnymi mogą obejmować subletalne efekty, takie jak zaburzenia endokrynologiczne, upośledzenie funkcji rozrodczych oraz zmiany behawioralne, które następnie mogą mieć negatywny wpływ na bioróżnorodność i usługi ekosystemowe (Sharma et al. 2024). Wykrywanie i monitorowanie mikrozanieczyszczeń stanowi wyzwanie ze względu na ich niskie stężenia oraz konieczność stosowania zaawansowanych technik analitycznych. Ponadto, obecne regulacje prawne oraz technologie oczyszczania ścieków często okazują się niewystarczające w skutecznym ograniczaniu przenikania mikrozanieczyszczeń do środowiska (Li et al. 2024).

Ciecze jonowe stanowią nową grupę mikrozanieczyszczeń, która dopiero niedawno została wykryta w środowisku dzięki zastosowaniu nowoczesnych technik analitycznych (Neuwald et al. 2021). Są to sole pozostające w stanie ciekłym w temperaturze pokojowej charakteryzujące się niską lotnością, wysoką stabilnością termiczną oraz możliwością dostosowywania ich właściwości fizykochemicznych (Maculewicz et al. 2022). Unikalne cechy cieczy jonowych wynikają z szerokiego zakresu możliwych kombinacji kationów i anionów, które mogą być niezależnie dobierane, co pozwala na precyzyjną modyfikację ich właściwości chemicznych. Dzięki temu znajdują one coraz szersze zastosowanie w przemyśle, m.in. w syntezie chemicznej, wychwytywaniu dwutlenku węgla, katalizie oraz elektrochemii. Są one również uznawane za obiecujące rozpuszczalniki w kontekście tzw. „zielonej chemii” ze względu na potencjalnie mniejszy negatywny wpływ na środowisko w porównaniu z tradycyjnymi, organicznymi rozpuszczalnikami (Gonçalves et al. 2021). Niektóre ciecze jonowe dzięki właściwościom zapobiegającym adhezji mikroorganizmów i tworzeniu się biofilmów znajdują zastosowanie jako składniki powłok przeciwpiorostowych statków (Taylor et al. 2024). Co ciekawe, ciecze jonowe zaczynają odgrywać istotną rolę w przemyśle

kosmicznym (Cook et al. 2017). Biorąc pod uwagę stale rosnącą liczbę startów pojazdów kosmicznych, ich potencjalny wpływ na środowisko staje się coraz bardziej niepokojący. Rynek związany z tą grupą związków dynamicznie się rozwija wraz z intensyfikacją badań oraz postępem technologicznym (Zhou et al. 2023). W 2023 roku globalna wartość rynku cieczy jonowych wynosiła ponad 2,3 miliarda USD, a prognozowana skumulowana roczna stopa wzrostu (CAGR) na lata 2024–2032 wynosi 13,5% (Global Market Insights, 2023). Unikalne właściwości cieczy jonowych związane m.in. z obecnością kationów i anionów, które oddziałują z błonami biologicznymi i białkami, mogą jednakże prowadzić do powstania niepożądanych efektów toksycznych u narażonych organizmów (Gonçalves et al. 2021, Vieira Sanches et al. 2023, Maculewicz et al. 2024). Obecność tych związków w środowisku została udokumentowana w szeregu ostatnich badań (Neuwald et al. 2020, 2021; Pati i Arnold, 2020), co podkreśla konieczność dalszych prac nad ich wpływem na ekosystemy.

Pozostałości farmaceutyków są uznawane za istotną grupę nowych mikrozanieczyszczeń, charakteryzujących się specyficznym oddziaływaniem ekotoksykologicznym. Stanowią one zróżnicowaną grupę biologicznie aktywnych związków stosowanych w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej, które przedostają się do środowiska wodnego głównie poprzez ścieki komunalne. Związane jest to z konwencjonalnymi procesami oczyszczania ścieków, które często okazują się niewystarczające do ich całkowitego usunięcia (Samal et al. 2022). Dodatkowymi źródłami zanieczyszczenia farmaceutykami są spływy rolnicze z hodowli zwierząt, nieprawidłowa utylizacja niewykorzystanych leków, odcieki ze składowisk odpadów oraz bezpośrednie wydalanie przez ludzi i zwierzęta (aus der Beek et al. 2016). Obecność farmaceutyków w ekosystemach wodnych budzi szczególne obawy ze względu na ich aktywność biologiczną, nawet przy bardzo niskich stężeniach. Pomimo powszechnego występowania tej grupy związków w środowisku, nadal istnieje wiele niewyjaśnionych kwestii dotyczących skutków długoterminowej ekspozycji oraz interakcji w złożonych mieszaninach farmaceutyków i innych mikrozanieczyszczeń.

Długoterminowe konsekwencje przewlekłej ekspozycji na mieszaniny mikrozanieczyszczeń nie zostały poddane odpowiedniej ocenie pod względem prezentowanego zagrożenia dla biocenozy. Dotychczas większość badań koncentrowała się na oddziaływaniu pojedynczych związków, jednak organizmy i ekosystemy są nieustannie narażone na złożone mieszaniny wielu substancji chemicznych, co prowadzi do nieznanych i często nieprzewidywalnych konsekwencji. Skumulowane skutki ekspozycji na wiele substancji mogą mieć charakter addytywny. Interakcje w obrębie mieszanin chemicznych mogą również prowadzić do efektów synergistycznych i antagonistycznych.

Środowisko morskie w tym przybrzeżne jest uważane za rezerwuár mikrozanieczyszczeń ze względu na jego zdolność do akumulacji zanieczyszczeń pochodzących z różnych źródeł (Spindola et al. 2022). Obecność mikrozanieczyszczeń w środowisku morskim stanowi poważne zagrożenie dla fotoautotroficznych mikroorganizmów morskich odpowiedzialnych za produkcję pierwotną. Ryzyko to jest dodatkowo potęgowane przez możliwość długoterminowej, przewlekłej ekspozycji, która może prowadzić do zakłóceń w procesie fotosyntezy, powodować stres oksydacyjny oraz zmiany w składzie gatunkowym biocenozy morskich.

Podstawą produkcji pierwotnej w ekosystemach wodnych jest aktywność fotosyntetyczna organizmów autotroficznych, obejmujących fitoplankton, fitobentos i makroglony, przy czym fitoplankton stanowi dominującą grupę (Purina et al. 2018). Wśród tych organizmów okrzemki odgrywają kluczową rolę ekologiczną, odpowiadając za około 20% globalnej produkcji pierwotnej (Malviya et al. 2016). Glony i cyjanobakterie są szeroko wykorzystywane jako organizmy wskaźnikowe w ocenie ryzyka ekotoksykologicznego ze względu na ich szybką reakcję na stres oraz wysoką wrażliwość. Cyjanobakterie wykazują znaczną podatność na ksenobiotyki, co czyni je kluczową grupą organizmów modelowych w badaniach ekotoksykologicznych (OECD, 2011). Mikroorganizmy wybrane do niniejszych badań są uznawane za gatunki modelowe, które odgrywają istotną rolę w produkcji pierwotnej oraz cyklach biogeochemicznych w Morzu Bałtyckim – unikalnym i wrażliwym ekosystemie słonawowodnym (Russo et al., 2023). Morze Bałtyckie jest szczególnie podatne na zanieczyszczenie ksenobiotykami ze względu na ograniczoną wymianę wód, niską różnorodność gatunkową oraz rozległy obszar zlewni. Jest ono także intensywnie eksploatowanym szlakiem żeglugowym. W ostatnich dekadach odnotowano ciągły wzrost liczby oraz wielkości statków, w tym tankowców transportujących ropę naftową (Ringbom, 2018). Przewiduje się, że ten trend będzie się utrzymywał w przyszłości. Dodatkowym czynnikiem związanym z potencjalnym uwalnianiem zanieczyszczeń chemicznych jest rozwój morskiej energetyki wiatrowej na obszarze Morza Bałtyckiego. Wzrost emisji związany z budową infrastruktury i związanym z tym ruchem jednostek pływających może powodować zaburzenia osadów dennych, prowadząc do mobilizacji zanieczyszczeń związanych z osadami oraz wprowadzenia do środowiska substancji chemicznych wykorzystywanych w budowie farm wiatrowych (Reckermann et al. 2022). Dodatkowo region ten znajduje się pod silną presją antropogeniczną związaną z rolnictwem, działalnością przemysłową oraz dużą gęstością zaludnienia w strefach przybrzeżnych – czynnikami mogącymi wpływać na skład, obfitość oraz różnorodność mikroorganizmów bałtyckich (Mazur-Marzec et al. 2024).

Współwystępowanie odmiennych grup mikrozanieczyszczeń w ekosystemach wodnych wiąże się ze złożonymi wyzwaniami badawczymi ze względu na różnorodne właściwości chemiczne, mechanizmy działania oraz możliwość występowania interakcji w mieszaninach związków. Przegląd dostępnej literatury ujawnił istotne braki w wiedzy dotyczące antybiotyków – kluczowej grupy nowo pojawiających się zanieczyszczeń (**publikacja 1**) – oraz cieczy jonowych (**publikacja 3**). Do najważniejszych spostrzeżeń wynikających z analizy dostępnych publikacji można zaliczyć brak danych dotyczących wpływu mikrozanieczyszczeń na mikroorganizmy morskie i słonawowodne, skupienie na ostrych efektach toksycznych (mniej na chronicznych skutkach działania tych związków), a także skąpe informacje dotyczące oddziaływania mieszanin zanieczyszczeń. Biorąc pod uwagę udokumentowane, szerokie występowanie pozostałości farmaceutyków w środowisku oraz pojawiające się obawy dotyczące cieczy jonowych, kluczowe staje się zbadanie wpływu mieszanin tych związków na organizmy występujące w środowisku wodnym.

Głównym celem niniejszej pracy było uzupełnienie wiedzy na temat ryzyka środowiskowego związanego z występowaniem mieszanin mikrozanieczyszczeń organicznych. Badania koncentrowały się na wpływie cieczy jonowych (IM1-12Br oraz IM1-8C(CN)₃), antybiotyku oksytetracykliny, metabolitu leku przeciwdrgawkowego karbamazepiny -10,11-epoksydu karbamazepiny oraz stymulanta kofeiny na wybrane mikroorganizmy, w tym cyjanobakterię *Microcystis aeruginosa*, zielenicę *Chlorella vulgaris* oraz okrzemkę *Phaeodactylum tricornutum*. W rezultacie sformułowano następujące cele badawcze:

- i. Ocena i porównanie wrażliwości morskich i słonawowodnych mikroorganizmów fotosyntetyzujących na niskie stężenia pojedynczych zanieczyszczeń oraz ich mieszanin. Analiza ta obejmowała określenie efektywnego stężenia powodującego 50% inhibicji (EC₅₀) parametru maksymalnej fotochemicznej wydajności fotosystemu PSII (F_v/F_m) i została przeprowadzona zgodnie z wytycznymi OECD 201 dotyczącymi testowania substancji chemicznych (OECD, 2011).
- ii. Zbadanie podstawowych mechanizmów działania poszczególnych związków oraz ich mieszanin poprzez wykorzystanie niestandardowych biomarkerów. Analiza obejmowała ocenę wpływu wybranych związków na wzrost oraz procesy fizjologiczne mikroorganizmów morskich występujących w Morzu Bałtyckim, przy użyciu różnych wskaźników, takich jak aktywność enzymu antyoksydacyjnego dysmutazy nadadtlenkowej (T-SOD), wydajność

fotosyntetyczna (ze szczególnym uwzględnieniem fotosystemu II) oraz mechanizmy fotoprotekcyjne (np. cykl ksantofilowy).

- iii. Ocena potencjału toksykologicznego oraz możliwego wzrostu toksyczności cieczy jonowych w połączeniu z innymi organicznymi mikrozanieczyszczeniami, w tym wybranymi farmaceutykami i kofeiną – wskaźnikiem zanieczyszczenia antropogenicznego. Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem teoretycznych modeli addytywności (Concentration Addition CA) i niezależnego działania (Independent Action IA) oraz obliczeń wskaźnika odchylenia modelu (Model Deviation Ratio MDR) w celu ilościowego określenia odchylenia od przewidywanych efektów addytywnych.
- iv. Zbadanie dokładności modeli CA i IA w charakteryzowaniu zaobserwowanych efektów dwuskładnikowych mieszanin zawierających cieczy jonowe oraz inne mikrozanieczyszczenia organiczne.

Na podstawie oceny dotychczasowego stanu wiedzy sformułowano następujące hipotezy badawcze:

- i. Obecność wybranych cieczy jonowych, farmaceutyków oraz produktów ich transformacji, kofeiny jako składników mieszanin mikrozanieczyszczeń prowadzi do efektów wynikających bezpośrednio z interakcji między składnikami mieszanin, w tym synergizmu lub antagonizmu.
- ii. Przewlekła ekspozycja na niskie stężenia pojedynczych związków lub ich mieszanin może negatywnie wpływać na procesy fotosyntetyczne i mechanizmy fotoprotekcyjne zachodzące u mikroorganizmów fotoautotroficznych, prowadząc do stresu oksydacyjnego
- iii. Zastosowanie czułych, niespecyficznych biomarkerów umożliwia identyfikację mechanizmów działania badanych substancji oraz wykrywanie subtelnych zmian fizjologicznych przed wystąpieniem mierzalnego zahamowania wzrostu.
- iv. Badane gatunki okrzemek, zielenic i cyjanobakterii wykazują zróżnicowane reakcje oraz różny stopień wrażliwości na ekspozycję na testowane substancje i ich mieszaniny.

Badania miały na celu ocenę właściwości toksykologicznych dwóch kationów o zróżnicowanej długości łańcucha alkilowego: [IM1-12]⁺ (**publikacja 3**) oraz [IM1-8]⁺ (**publikacje 4 i 5**), w połączeniu z wybranymi organicznymi mikrozanieczyszczeniami.

Wyższe powinowactwo kationów o dłuższych łańcuchach bocznych do błon biologicznych jest zgodne z koncepcją opisującą odwrotną zależność pomiędzy wartościami EC_{50} a wzrastającą hydrofobowością. To dobrze udokumentowane zjawisko zostało wykazane w szeregu badań biologicznych dotyczących cieczy jonowych (Markiewicz et al., 2011). Wybór kationów został oparty na wcześniejszych badaniach dotyczących ich powinowactwa do błon biologicznych oraz potencjału do ulegania biokoncentracji (Dołzonek et al., 2017; Maculewicz et al., 2023^a). Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że ciecze jonowe mogą wykazywać większy potencjał do ulegania bioakumulacji, niż ten oszacowany na podstawie wartości współczynnika podziału oktanol/woda ($\log K_{ow}$) (Dołzonek et al., 2017). Badania dotyczące interakcji cieczy jonowych z albuminą ludzką (Human Serum Albumin, HSA), będącą reprezentatywnym białkiem osocza krwi, potwierdziły powinowactwo obu analizowanych kationów do badanego białka. Jednakże $[IM1-12]^+$ wykazywał istotnie silniejsze oddziaływanie w porównaniu do $[IM1-8]^+$, co wskazuje na zróżnicowany potencjał obu kationów do ulegania biokoncentracji (Kowalska et al., 2023). Badania in vivo dodatkowo potwierdziły te obserwacje, wykazując, iż ciecze jonowe o długich łańcuchach, takie jak $[IM1-12]^+$, spełniają kryteria związków zaliczanych do kategorii ulegających bioakumulacji. Współczynnik biokoncentracji (BCF) dla $[IM1-8]^+$ został określony jako niższy niż 100, co wskazuje na minimalną zdolność do bioakumulacji (Maculewicz et al., 2023^a, 2023^b).

Wybór reprezentatywnych związków, w tym antybiotyku oraz cieczy jonowych, został oparty na kompleksowym przeglądzie literatury (**publikacje 1 i 3**). Oksytetracyklina, powszechnie stosowany antybiotyk, została wybrana ze względu na jej dobrze udokumentowaną obecność w środowisku wodnym. Jej wpływ na wzrost oraz fluorescencję chlorofilu *a* wytypowanych organizmów, w tym zielenicy (*C. vulgaris*), sinicy (*M. aeruginosa*) – mikroorganizmów zasiedlających wody słone i przybrzeżne – oraz okrzemki (*P. tricornutum*), powszechnie występującej w basenie Morza Bałtyckiego, został szeroko opisany w **publikacji 2**. Dodatkowo, badania objęły interakcje oksytetracykliny z cieczami jonowymi $[IM1-12]^+[Br]^-$ (**publikacja 3**) oraz $[IM1-8]^+[C(CN)_3]^-$ (**publikacja 4**).

Główny metabolit karbamazepiny (10,11-epoksyd karbamazepiny) - szeroko stosowanego leku przeciwdrgawkowego, został również uwzględniony w ocenie toksyczności mieszanin (**publikacja 4**). Karbamazepina i jej metabolity są powszechnie wykrywane w środowiskach wodnych, również w Morzu Bałtyckim, przy czym związek macierzysty charakteryzuje się znaczną trwałością w środowisku, w tym szacowanym okresem półtrwania wynoszącym 3,5 roku w wodzie morskiej. Ta trwałość, w połączeniu z szerokim występowaniem, czyni karbamazepinę i jej pochodne wskaźnikami zanieczyszczenia

antropogenicznego (Brezina et al., 2017). Istnieje niewiele badań dotyczących mikroorganizmów i efektów toksykologicznych 10,11-epoksydu karbamazepiny. Wpływ tego związku na organizmy *M. aeruginosa* i *P. tricornutum* został poddany analizie w **publikacji 4**.

Kofeina została wybrana do badań ze względu na jej powszechne globalne spożycie oraz obecność w środowisku (**publikacja 5**) (Korekar et al., 2020, Szymczycha et al. 2020). Stała obecność pozostałości kofeiny w ekosystemach przybrzeżnych i morskich naraża organizmy wodne na neurotoksyczność, stres oksydacyjny oraz zaburzenia rozwojowe i reprodukcyjne (Rizzi et al., 2020). Ze względu na swoją trwałość i szkodliwe działanie, niektórzy badacze postulują klasyfikację kofeiny jako substancji niebezpiecznej (Vieira et al., 2022). Dodatkowo pełni ona funkcję wskaźnika zanieczyszczenia antropogenicznego, odzwierciedlając stopień aktywności ludzkiej i zrzutów ścieków do ekosystemów wodnych. Dotychczasowe badania wskazują na wpływ kofeiny na morskie mikroorganizmy fotosyntetyzujące ściśle zależny od stężenia i wrażliwości danego gatunku – przy czym niskie stężenia mogą wykazywać minimalne, a nawet stymulujące działanie (Hutárová et al., 2023; de Sousa et al., 2021). Niniejsze badanie koncentrowało się na indywidualnym wpływie środowiskowych stężeń kofeiny na wytypowane mikroorganizmy oraz na interakcjach zachodzących w mieszaninach zanieczyszczeń zawierających ciecz jonową IM1-8C(CN)₃ (**publikacja 5**).

W celu oceny procesów zachodzących w wybranych mikroorganizmach podczas 11-dniowych doświadczeń przeprowadzonych w kontrolowanych warunkach, uwzględniających ekspozycję na pojedyncze związki i ich mieszaniny, zastosowano następujące metody analityczne:

- i. **Analiza fluorescencji chlorofilu *a***: analiza za pomocą fluorymetru AquaPen AP110-C (**publikacje 2, 3, 4 i 5**).
- ii. **Oznaczanie stężenia barwników**: stężenia barwników zostały oznaczone za pomocą chromatograficznego systemu Agilent HP1200 (Perlan Technologies, USA) wyposażonego w detektory fluorescencyjne i diodowe zgodnie z metodą opracowaną przez Stoń-Egiert i Kosakowską (2005) (**publikacje 4 i 5**).
- iii. **Oznaczanie stężenia barwników (fikobiliprotein)**: Analiza została przeprowadzona za pomocą spektrofluorymetru Cary Eclipse (Agilent Technologies) zgodnie z metodą opisaną przez Sobiechowską-Sasim et al. (2014) (**publikacje 3, 4 i 5**).
- iv. **Oznaczenie aktywności enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (T-SOD)**: Aktywność T-SOD została oznaczona przy użyciu komercyjnych zestawów

testowych (Elabscience Biotechnology Inc., Chiny) opartych na metodzie WST-1 (**publikacje 4 i 5**).

- v. **Oznaczanie zawartości białka:** Zawartość rozpuszczalnych białek została oznaczona metodą Bradforda (Bradford, 1976), zastosowano metodę precypitacji kwasem trichlorooctowym (TCA) (Peterson 1977; 1983; Clayton et al. 1988). Analizę ilościową przeprowadzono przy użyciu czytnika mikroplętek Thermo Scientific™ Varioskan (**publikacje 4 i 5**).
- vi. **Analiza gęstości optycznej hodowli mikroorganizmów:** Pomiar gęstości optycznej przeprowadzono za pomocą spektrofotometru UV-VIS HITACHI U-2800 przy długościach fal 680 nm i 750 nm (**publikacje 2, 3, 4 i 5**).
- vii. **Oznaczanie stężenia cieczy jonowych:** Stężenia IM1-12Br oraz IM1-8C(CN)₃ w badanych próbkach określono za pomocą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (UHPLC-MS) (Maculewicz et al. 2023^a, 2023^b) (**publikacje 3 i 4**).
- viii. **Oznaczanie stężenia 10,11-epoksydu karbamazepiny i kofeiny:** Analiza stężenia 10,11-epoksydu karbamazepiny oraz kofeiny została przeprowadzona metodą LC-MS po ekstrakcji na BAKERBOND Speedisk (H₂O-Philic DVB) (JT Baker, Heidelberg, Niemcy) (**Publikacje 4 i 5**).
- ix. **Modelowanie toksyczności mieszanin:** Wpływ mieszanin badanych związków na wybrane mikroorganizmy oceniono przy użyciu modeli CA i IA, a następnie obliczono współczynnik MDR (Wieczerek et al. 2018) (**publikacje 3, 4 i 5**).

Uzyskane wyniki pozwoliły na realizację celów niniejszej pracy. Pierwszy cel rozprawy związany był z oceną i porównaniem wrażliwości wybranych mikroorganizmów fotosyntetyzujących na działanie pojedynczych związków oraz ich dwuskładnikowych mieszanin, w tym oznaczenie efektywnego stężenia EC₅₀ na podstawie inhibicji wzrostu oraz efektywności fotosyntezy. Uzyskane dane umożliwiły ocenę odpowiedzi badanych gatunków obecnych w Morzu Bałtyckim, potwierdzając ich zmienną wrażliwość na badane substancje (**Publikacje 2, 3, 4 i 5**). Zgodnie z wytycznymi Europejskiej Agencji Chemikaliów (ECHA, 2008), klasyfikacja toksyczności opiera się na następujących zakresach stężeń parametru EC₅₀: substancje wysoce toksyczne (EC₅₀ = 0,1–1 mg/L), umiarkowanie toksyczne (1–10 mg/L), średnio toksyczne (10–100 mg/L) oraz nietoksyczne (100–1000 mg/L).

Spośród badanych mikroorganizmów najwyższą wrażliwość na obecność cieczy jonowych wykazała cyjanobakteria *M. aeruginosa* przy wartości EC₅₀ dla IM1-12Br równej

0,03 mg/L oraz 0,10 mg/L dla IM1-8C(CN)₃, co wskazuje na wysoką toksyczność tych substancji. Z kolei *P. tricornutum* oraz *C. vulgaris* charakteryzowały się niższą wrażliwością, przy wartościach EC₅₀ IM1-12Br kolejno 8,00 mg/L i 0,37 mg/L. *M. aeruginosa* oraz *P. tricornutum* wykazały umiarkowaną wrażliwość na oksytetracyklinę, natomiast dla *C. vulgaris* wartość EC₅₀ mieściła się w górnej granicy normy dla substancji wysokotoksycznych i wynosiła 1,00 mg/L. Zarówno kofeina oraz 10,11-epoksyd karbamazepiny nie wpłynęły na wzrost ani parametr F_v/F_m badanych organizmów *M. aeruginosa* i *P. tricornutum* przy zastosowanych stężeniach niższych od 100 mg/L. Uzyskane wyniki podkreślają zróżnicowaną wrażliwość badanych mikroorganizmów, przy czym cyjanobakteria *M. aeruginosa* wykazała szczególną podatność na obecność wybranych cieczy jonowych, natomiast okrzemka *P. tricornutum* charakteryzowała się wyższą tolerancją. Otrzymane dane są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi, wskazującymi na odmienną wrażliwość różnych grup taksonomicznych na działanie zanieczyszczeń chemicznych (Guo i in., 2016).

Drugim celem niniejszej pracy było **wyjaśnienie mechanizmów działania badanych związków oraz ich mieszanin poprzez zastosowanie niestandardowych biomarkerów**. Podejście to obejmowało ocenę parametrów fizjologicznych i biochemicznych, w tym analizę fluorescencji chlorofilu *a*, ilościowe oznaczanie zawartości barwników (w tym fikobiliprotein) oraz ocenę aktywności enzymu T-SOD (**publikacje 2, 3, 4 i 5**). Wzrost, procesy fotosyntetyczne oraz zawartość barwników we wszystkich badanych mikroorganizmach ulegały istotnym zmianom po ekspozycji zarówno na pojedyncze zanieczyszczenia, jak i ich mieszaniny. Zastosowanie niestandardowych biomarkerów umożliwiło identyfikację mechanizmów odpowiedzialnych za reakcje stresowe, nawet w przypadku braku obserwowalnych zmian we wzroście badanych mikroorganizmów. Podejście to pozwoliło również wykryć mechanizmy fotoprotekcyjne aktywowane w odpowiedzi na niskie stężenia badanych związków, w tym kofeiny. Wśród badanych mikroorganizmów *M. aeruginosa* wykazywała najwyższą wrażliwość na badane ciecze jonowe potwierdzoną przez wartość parametru EC₅₀, co przejawiało się istotnym spadkiem wartości parametru F_v/F_m (**publikacje 3 i 4**). W przypadku *C. vulgaris* wykazano dwufazową odpowiedź na IM1-12Br - niskie stężenia stymulowały wydajność fotosyntetyczną, podczas gdy wyższe powodowały jej zahamowanie. Zaobserwowany efekt może być interpretowany jako zjawisko hormezy, gdzie umiarkowany stres wywołuje reakcje adaptacyjne (**publikacja 3**). Okrzemka *P. tricornutum* cechowała się najmniejszą wrażliwością, a wartości F_v/F_m malały dopiero przy wysokich stężeniach badanych związków (**publikacje 3 i 4**). Mieszaniny IM1-8C(CN)₃, 10,11-epoksydu karbamazepiny i oksytetracykliny wykazywały działanie synergiczne względem *M.*

aeruginosa, prowadząc do znacznego obniżenia wartości F_v/F_m (**publikacja 4**). Natomiast obecność kofeiny w mieszaninach miała mniej wyraźny wpływ na wartość parametru, a umiarkowany spadek jego wartości obserwowano jedynie przy wysokich stężeniach obu związków (**publikacja 5**). *C. vulgaris* wykazywała znaczące zmiany w parametrach ABS/RC (strumień fotonów zaabsorbowanych przez cząsteczki chlorofilu w przeliczeniu na centrum reakcji (RC)) oraz DI_0/RC (rozpraszanie ciepłej energii wzbudzenia w przeliczeniu na RC) w odpowiedzi na wysokie stężenia IM1-12Br, oksytetracykliny oraz ich mieszaniny (**publikacje 2 i 3**). Wszystkie badane organizmy wykazały wzrost wartości parametru DI_0/RC po ekspozycji na cieczy jonowe oraz mieszaniny wybranych substancji (**publikacje 3, 4 i 5**). Parametr ten określa mechanizm adaptacyjny, polegający na rozpraszaniu nadmiaru pochłoniętej energii w postaci ciepła lub fluorescencji, co zapobiega uszkodzeniom aparatu fotosyntetycznego w warunkach stresowych. Obecność niskiego, zbliżonego do środowiskowego stężenia kofeiny (10 $\mu\text{g/L}$) spowodowała wzrost wartości parametru DI_0/RC , co wskazuje na nasiloną dyssypację energii jako odpowiedź na stres zaobserwowaną zarówno u cyjanobakterii jak i okrzemki (**publikacja 5**). Ponadto, we wszystkich mikroorganizmach narażonych na wyższe stężenia cieczy jonowych oraz mieszanin substancji zaobserwowano gwałtowny wzrost wartości ABS/RC, co najprawdopodobniej odzwierciedla mechanizm kompensacyjny umożliwiający optymalizację pochłaniania światła i utrzymanie funkcji fotosyntetycznych w warunkach stresu (**publikacje 3, 4 i 5**).

Analiza stężeń barwników wykazała istotny spadek zawartości chlorofilu *a* pod wpływem obecności najwyższych stężeń cieczy jonowych, zarówno w przypadku *M. aeruginosa*, jak i *P. tricornutum*, przy czym stopień spadku zawartości barwnika był proporcjonalny do stężenia związku. Oba organizmy wykazały zmiany w stężeniach barwników związanych z odpowiedzią na stres, takich jak β -karoten oraz pochodne ksantofili (np. wiolaksantyna, diadinoxantyna i diatoksantyna). Zaobserwowano wzrost ich zawartości przy niższych stężeniach cieczy jonowych, co wskazuje na reakcję adaptacyjną mającą na celu ograniczenie stresu oksydacyjnego (**publikacje 4 i 5**). Dodatkowo zawartość chlorofilidu *a*, produktu degradacji chlorofilu *a*, rosła w obecności wyższych stężeń cieczy jonowych oraz mieszanin dwuskładnikowych, co sugeruje nasiloną degradację chlorofilu. Ponadto, niskie stężenia oksytetracykliny również znacząco wpłynęły na *C. vulgaris* i *P. tricornutum*, prowadząc do redukcji zawartości feopigmentu i chlorofilu *a* (**publikacja 2**). W przypadku *M. aeruginosa* poziom stężeń fikobiliprotein ulegał dużym zmianom, przy czym zawartość fikoerytryny wzrastała, a fikocyjaniny spadała aż do całkowitego zahamowania produkcji tego barwnika (**publikacje 3, 4 i 5**). W przypadku *P. tricornutum* zmianom uległy stężenia

barwników biorących udział w cyklu ksantofilowym oraz pochodne chlorofilu. Dodatkowo, zahamowanie produkcji wiolaksantyny w warunkach silnego stresu zostało zinterpretowane jako oznaka osłabienia mechanizmów fotoochronnych (**publikacje 4 i 5**).

Obecność cieczy jonowej IM1-8C(CN)₃ oraz dwuskładnikowych mieszanin zawierających, oksytetracyklinę, 10,11-epoksyd karbamazepiny lub kofeinę miała wysoki wpływ na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (T-SOD) - wskaźnika stresu oksydacyjnego (**publikacje 4 i 5**). Uzyskane wyniki były zależne od gatunku mikroorganizmu oraz stężenia i zawartości związków. *M. aeruginosa* charakteryzowała się wysoką wrażliwością na badane związki oraz mieszaniny, co manifestowało się zwiększoną aktywnością T-SOD. Z kolei reakcja poprzez modulację aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w przypadku *P. tricornutum* na ekspozycję na samą ciecz jonową była silniejsza niż na mieszaniny badanych związków (**publikacja 4**). Oba organizmy wykazywały znaczący stres oksydacyjny w odpowiedzi na obecność mieszanin cieczy jonowej i kofeiny (**publikacja 5**).

Trzecim celem pracy była **ocena toksyczności cieczy jonowych w połączeniu z innymi organicznymi mikrozanieczyszczeniami przy wykorzystaniu modeli CA i IA, a także MDR w celu ilościowego określenia odchyłeń od przewidywanych efektów addytywnych**. Ponadto dokonano **analizy dokładności zastosowanych modeli teoretycznych CA i IA w przewidywaniu oraz charakterystyce zaobserwowanych efektów dla mieszanin dwuskładnikowych**.

Uzyskane wyniki pozwoliły na zaobserwowanie złożonych interakcji między zanieczyszczeniami, charakteryzującymi się zależnymi od stężenia efektami synergistycznymi i antagonistycznymi, z istotnymi różnicami w przewidywanych odpowiedziach według modeli CA i IA (**publikacje 3, 4 i 5**). W przypadku *C. vulgaris*, przy wyższych stężeniach cieczy jonowej IM1-12Br i oksytetracykliny wystąpił efekt synergistyczny, który został trafnie przewidziany przez oba modele (**publikacja 3**). W przypadku cyjanobakterii *M. aeruginosa*, zastosowanie modelu IA pozwoliło na uchwycenie wyraźnych interakcji synergistycznych. Ponadto oba modele poprawnie przewidziały interakcje między wytypowanymi związkami oraz ich wpływ na *P. tricornutum* (**publikacja 3**). Model CA pozwolił na identyfikację zależnych od stężeń interakcji między IM1-8C(CN)₃ i oksytetracykliną, wykazując obecność efektów antagonistycznych przy wyższych stężeniach oraz synergistycznych przy niższych stężeniach badanych związków w przypadku *M. aeruginosa* i *P. tricornutum* (**publikacja 4**). Obserwacja ta sugeruje osłabianie lub wzmacnianie toksyczności wybranych substancji w zależności od wzajemnych proporcji. W modelu IA doszło do przeszacowania toksyczności, zwłaszcza przy wyższych stężeniach antybiotyku, oraz w przypadku interakcji

antagonistycznych cieczy jonowej oraz 10,11-epoksydu karbamazepiny. Zastosowanie modelu CA wykazało występowanie efektów synergistycznych przy wysokich stężeniach cieczy jonowych oraz antagonistycznych przy niższych poziomach w odniesieniu do aktywności fotosyntetycznej. Podkreśla to złożony, zależny od stężenia charakter interakcji, które nie zostały uchwycone z zastosowaniem modelu IA (**publikacja 4**). Analiza interakcji zachodzących w mieszaninach IMI-8C(CN)₃ i kofeiny wykazała, że kofeina zmniejsza toksyczne działanie cieczy jonowej, co zostało odzwierciedlone w modelu CA. Przeważające antagonistyczne interakcje zostały zidentyfikowane przez oba modele, szczególnie przy wyższych stężeniach kofeiny, przy czym model CA dostarczał dokładniejszych prognoz. Model IA często przeszacowywał toksyczność przy średnich stężeniach cieczy jonowej, co wskazuje na jego ograniczenia w modelowaniu interakcji między związkami o różnych mechanizmach działania (**publikacja 5**).

Na podstawie wyników zamieszczonych w niniejszej pracy wszystkie hipotezy badawcze zostały zweryfikowane, potwierdzając przewidywany wpływ mikrozanieczyszczeń na procesy fizjologiczne i biochemiczne wytypowanych mikroorganizmów. Sformułowano następujące wnioski:

- i. Ciecze jonowe oraz ich mieszaniny z innymi organicznymi mikrozanieczyszczeniami, takimi jak oksytetracyklina, kofeina i 10,11-epoksyd karbamazepiny wykazały zależny od gatunku oraz proporcjonalny do stężenia badanych związków wpływ na wytypowane mikroorganizmy. Cyjanobakteria *M. aeruginosa* cechowała się najwyższą wrażliwością na badane substancje, wykazując zahamowanie wydajności fotosyntetycznej, wzrostu oraz zmiany w produkcji barwników.
- ii. Biomarkery, takie jak fluorescencja chlorofilu *a*, zmiany w proporcjach barwników fotosyntetycznych, fotoochronnych oraz aktywność T-SOD, okazały się istotne w zbadaniu reakcji badanych mikroorganizmów na stres. Zmiany zachodzące w procesach biochemicznych zostały uchwycone wcześniej niż pozwalają na to standardowe testy oparte na zahamowaniu wzrostu. Analiza parametrów fluorescencji chlorofilu *a*, takich jak DI₀/RC oraz zmiany w składzie barwników, wskazały na aktywację mechanizmów fotoprotekcyjnych w badanych mikroorganizmach w odpowiedzi na obecność mikrozanieczyszczeń.
- iii. Zróżnicowany stopień wrażliwości na badane związki wśród badanych gatunków okrzemek, zielenic i cyjanobakterii może prowadzić do zmian na

poziomie struktur populacyjnych, a tym samym mieć daleko idące skutki dla ekosystemu morskiego

- iv. Zidentyfikowano złożone, zależne od stężenia interakcje w mieszaninach badanych mikrozanieczyszczeń organicznych. Zaobserwowano zarówno efekty synergistyczne, jak i antagonistyczne, zależne od obecności związków oraz ich wzajemnych proporcji.
- v. Model CA zapewnił dokładniejsze przewidywania toksyczności mieszanin badanych substancji w porównaniu do modelu IA.
- vi. Zaobserwowane efekty działania mieszanin mikrozanieczyszczeń na wybrane mikroorganizmy wskazują na konieczność dalszych badań skupionych na interakcjach oraz możliwych skutkach obecności tych substancji w ekosystemach. Jest to szczególnie istotne w słabo zbadanych środowiskach morskich, takich jak Morze Bałtyckie. Wyniki badań wskazują również na konieczność przeprowadzania ocen chronicznej ekspozycji organizmów na mikrozanieczyszczenia w celu określenia długoterminowych efektów działania tych związków na ekosystemy wodne.

Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy, zastosowanie niestandardowych biomarkerów, takie jak analiza fluorescencji chlorofilu *a* oraz zmian w składzie barwników, jako czułych wskaźników wczesnych odpowiedzi stresowych mikroorganizmów, powinno zostać uwzględnione w przyszłych badaniach laboratoryjnych oraz środowiskowych. Biorąc pod uwagę możliwe skutki długoterminowej ekspozycji na mikrozanieczyszczenia, kolejne badania powinny koncentrować się na ocenie chronicznej toksyczności, stosując dłuższą ekspozycję niż standardowo stosowane testy, co pozwoli na identyfikację opóźnionych efektów fizjologicznych, potencjalnych mechanizmów regeneracyjnych i adaptacyjnych. Przyszłe analizy powinny skupiać się również na toksyczności mieszanin zamiast ocenie toksyczności pojedynczych związków. Należałoby również wdrożyć zaawansowane modele zdolne do analizy i przewidywania interakcji w złożonych mieszaninach zanieczyszczeń, które pozwoliłyby na pominięcie ograniczeń związanych z zastosowaniem tradycyjnych modeli CA i IA. Pozwoli to na bardziej kompleksową ocenę wpływu mikrozanieczyszczeń na środowisko oraz związanego z tym ryzyka. Pomimo tego, iż badania laboratoryjne dostarczają cennych informacji, konieczne jest rozszerzenie analiz na badania terenowe, które pozwolą na weryfikację wyników otrzymanych w warunkach laboratoryjnych. Szczególnie istotne są

badania dotyczące zmian w składzie gatunkowym, interakcjach zachodzących na różnych poziomach troficznych oraz wpływu na ekosystemy na poziomie mikroskalowym.