



Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
Wydział Biologii

**Agnieszka Drewek**  
Rozprawa doktorska

**Reakcje małży Unionidae na nowe rodzaje zanieczyszczeń wód.  
Potencjalne wykorzystanie małży w systemach wczesnego  
ostrzegania przed zanieczyszczeniami**

Responses of unionid mussels (Unionidae) to new types of water pollutants.  
Potential use of mussels in pollution early warning systems

**Praca doktorska wykonana pod kierunkiem  
prof. UAM dr hab. Piotra Klimaszyka**

Poznań, 2024

## Podziękowania

Przede wszystkim pragnę złożyć serdeczne podziękowania mojemu *Promotorowi*, *Prof. UAM dr. hab. Piotrowi Klimaszykowi*, za merytoryczną opiekę, która w istotny sposób przyczyniła się do powstania niniejszej dysertacji. Dziękuję za poświęcony czas, życzliwość oraz przekazaną wiedzę podczas realizacji pracy.

Szczególne podziękowania kieruję do wszystkich *Współautorów* publikacji naukowych będących częścią tej dysertacji. Dziękuję za Wasz wkład i zaangażowanie.

Wyrazy wdzięczności składam także *Pracownikom Zakładu Ochrony Wód* za wszelką pomoc oraz za stworzenie atmosfery sprzyjającej prowadzeniu badań. Szczególnie dziękuję panu *mgr inż. Piotrowi Domkowi* za pomoc w pracach terenowych.

Dziękuję również wszystkim osobom, które towarzyszyły mi w codziennych obowiązkach w pokoju 0.117, za wspólnie spędzony czas, hektolitry wypitej kawy, herbaty i niezliczone ilości zjedzonych ciastek. *Asiu, Paulino* i *Michale* – dziękuję!

Specjalne podziękowania kieruję do pani *dr Karoliny Cerbin* oraz pani *mgr Magdaleny Walczak* za pomoc w sprawach administracyjnych, które niejednokrotnie wydawały się trudne do pokonania. Dzięki Waszej pomocy zawsze udawało się osiągnąć cel.

Na koniec, z całego serca dziękuję mojemu *Kubie, kochanym Rodzicom*, najbliższej *Rodzinie* i *Przyjaciołom* za ogromne wsparcie, które okazywaliście mi w trakcie realizacji tej pracy. Dziękuję za Waszą nieustanną obecność, zainteresowanie postępami w badaniach oraz za to, że zawsze mogę na Was liczyć.

*„Gdy nie wiesz, do którego portu płyniesz, żaden wiatr nie jest dobry”*

*„Ignoranti quem portum petat, nullus suus ventus est”*

Lucius Annaeus Seneca

## Spis treści

1. Streszczenie .....	5
2. Abstract .....	7
3. Wykaz publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej.....	9
4. Wstęp .....	10
5. Metodyka badań.....	14
6. Wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych i paracetamolu na reakcję behawioralną małży z rodziny Unionidae .....	21
7. Wpływ koagulantu żelazowego na behavior, stechiometrię chemiczną i biochemię małży z rodziny Unionidae .....	95
8. Behawioralne i biochemiczne efekty herbicydu Roundup opartego na glifosacie na małże z rodziny Unionidae.....	102
9. Bibliografia .....	110
10. Publikacja 1 .....	129
<b>The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels <i>Anodonta cygnea</i> and <i>Unio tumidus</i> during lake restoration.....</b>	<b>129</b>
11. Publikacja 2 .....	136
<b>Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides? .....</b>	<b>136</b>

## 1. Streszczenie

Małże z rodziny Unionidae są istotnym komponentem ekosystemów wodnych. W procesie odżywiania odfiltrują z toni wodnej bio i abioseston, a tym samym uczestniczą w procesie naturalnego oczyszczania wód powierzchniowych. Niestety, organizmy te są wrażliwe na różne zakłócenia środowiska i należą do najbardziej zagrożonych grup zwierząt wodnych. Małże bardzo często wykorzystywane są do bioindykacji zanieczyszczeń wody, w tym w systemach wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem.

Celem przeprowadzonych badań była ocena reakcji wybranych gatunków małży Unionidae na nowe rodzaje zanieczyszczeń oraz możliwości ich wykorzystania do wykrywania tych substancji w ramach systemów wczesnego ostrzegania o zanieczyszczeniach.

Pierwszą grupą badanych substancji były farmaceutyki. W ostatnich latach odnotowuje się rosnącą ilość aktywnych składników farmaceutycznych w ekosystemach wodnych. Przyczynia się do tego wzrastająca liczba leków na rynku oraz zwiększająca się ich konsumpcja. W pracy doktorskiej badano reakcję behawioralną małży na popularne niesteroidowe leki przeciwzapalne: diklofenak, ibuprofen oraz przeciwbólowy i przeciwgorączkowy paracetamol. Badano reakcje dwóch gatunków rodzimych małży, *Anodonta anatina* i *Unio tumidus* oraz inwazyjnego gatunku *Sinanodonta woodiana*, na różne dawki tych farmaceutyków. W procedurach testowych wykorzystano stężenia odpowiadające wartościom występującym w środowisku i ich multiplikacje. Wyniki badań wskazują na niską przydatność badanych gatunków do wykrywania zanieczyszczenia wody tymi substancjami w systemach wczesnego ostrzegania. Przy długotrwałej ekspozycji na wysokie dawki zaobserwowano zmniejszenie aktywności filtracyjnej gatunku, co wskazuje na potencjalny negatywny wpływ tego typu zanieczyszczeń na populację małży.

Inne badanie koncentrowało się na wpływie koagulantu żelazowego ( $\text{FeCl}_3$ ) na małże. Zastosowanie tej substancji chemicznej jest jedną z metod stosowanych w rekultywacji jezior. Dozowanie koagulantu ma zadanie strącać fosfor z toni wodnej. Metoda ta jest stosunkowo tania i efektywna, jednak skutki uboczne dostawy do środowiska wodnego tej substancji nie zostały szczegółowo rozpoznane. W niniejszym badaniu przeanalizowano wpływ koagulantu żelazowego na behawior filtracyjny, stechiometrię chemiczną oraz zaburzenia biochemiczne (stres oksydacyjny) u dwóch gatunków rodzimych małży *Anodonta cygnea* i *Unio tumidus* narażonych na zróżnicowane (stosowane w praktyce rekultywacyjnej) stężenia koagulantu żelazowego. Zaobserwowano znaczący i zależny od stężenia wpływ koagulantu na zmniejszenie aktywności filtracyjnej małży, zaburzenia stechiometrii chemicznej osobników, a

także wzrost stężenia żelaza przy jednoczesnej redukcji koncentracji fosforu w mięśniach. Wyniki badań zostały opublikowane w artykule zatytułowanym: „The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration” w *Journal of Environmental Management* (Q 1, IF=8.91).

W kolejnym badaniu analizowano zaburzenia behawioru filtracyjnego i poziom stresu oksydacyjnego małży *U. tumidus* oraz *A. anatina* narażonych na różne stężenia pestycydu Roundup 360 PLUS, którego związkiem aktywnym jest glifosat. Stosowanie produktów opartych na glifosacie budzi szereg obaw zarówno w kontekście zdrowia ludzkiego, jak i wpływu na środowisko wodne i lądowe. W badaniach testowano reakcje małży na koncentracje herbicydu odpowiadające stężeniom odnotowywanych w ekosystemach wodnych oraz ich multiplikacje. Badania wykazały, że testowane gatunki małży ograniczają aktywność filtracyjną już po narażeniu na niewielkie - środowiskowe stężenia pestycydu. Jednak reakcja ta była krótkotrwała i nie dość intensywna, by osiągnąć poziom uznawany zwyczajowo za alarmowy w systemach wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem. Narażenie małży na wyższe stężenia spowodowało gwałtowne i długotrwałe zmniejszenie aktywności filtracyjnej, co pokazuje, że środek ten może stanowić poważne zagrożenie dla rodzimej malakofauny. Wyniki badań pokazują, że małże skójkowate mogą być bioindykatorem incydentalnych zanieczyszczeń wody wysokimi dawkami Roundupu oraz, że obecność tego pestycydu w wodach negatywnie wpływa na populacje małży. Analiza reakcji biochemicznej wykazała wzrost stresu oksydacyjnego, ale różnice nie były statystycznie istotne.

Badania zostały opublikowane w artykule zatytułowanym: „Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides?” w *Water* (Q 1, IF=3.0).

**Słowa kluczowe:** małże Unionidae, zanieczyszczenia farmaceutyczne, jakość wody, chemiczna rekultywacja jezior, Roundup

## 2. Abstract

Bivalves of the family Unionidae are an essential component of aquatic ecosystems. In the process of feeding, they filter bioeston and abioeston from the water table, and thus participate in the process of natural purification of surface water. Regrettably, these organisms are vulnerable to various environmental disturbances and are among the most endangered groups of aquatic animals. Bivalves are frequently utilized as bioindicators of water pollution, including in pollution early warning systems.

The aim of the study was to evaluate the response of selected species of Unionidae bivalves to new types of pollutants and to assess the possibility of using the bivalves to detect these substances as part of pollution early warning systems.

Pharmaceuticals were the first group of tested substances. In recent years, aquatic ecosystems have seen an increase in the presence of active pharmaceutical ingredients. The growing number of pharmaceuticals on the market, as well as their increasing consumption contribute to this trend. The dissertation studied the behavioral response of mussels to the popular non-steroidal anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen and the analgesic and antipyretic paracetamol. The responses of two species of native bivalves, *Anodonta anatina* and *Unio tumidus*, and the invasive species *Sinanodonta woodiana*, to different doses of these pharmaceuticals were studied. Test procedures used concentrations corresponding to values found in the environment and their multiplications. The results of the study indicate the low suitability of the test species for detecting water contamination with these substances in early warning systems. With prolonged exposure to high doses, a reduction in the filtration activity of the species was observed, indicating the potential negative impact of this type of pollution on the bivalve population.

Another study focused on the effects of iron coagulant ( $\text{FeCl}_3$ ) on mussels. The use of this chemical is one of the methods used in lake reclamation. Coagulant dosing is designed to precipitate phosphorus from the water table. This method is relatively cheap and effective, but the side effects of the delivery of this substance to the aquatic environment have not been recognized in detail. In the present study, the effects of iron coagulant on filtration behavior, chemical stoichiometry and biochemical disorders (oxidative stress) in two species of native mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* exposed to varying (used in reclamation practice) concentrations of iron coagulant were analyzed. Significant and concentration-dependent effects of the coagulant on reducing the filtration activity of the bivalves were observed, as well as disturbances in the chemical stoichiometry of the individuals an increase in iron

concentration with a reduction in the concentration of phosphorus in the mussels. The results of the study were published in a paper entitled: “The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration” in the Journal of Environmental Management (Q 1, IF=8.91).

Another study analyzed filtration behavioral disorders and oxidative stress levels in *U. tumidus* and *A. anatina* mussels exposed to different concentrations of the pesticide Roundup 360 PLUS, whose active compound is glyphosate. The use of glyphosate-based products raises a number of concerns both in terms of human health and impacts on aquatic and terrestrial environments. The study tested the reactions of mussels to concentrations of the herbicide corresponding to concentrations recorded in aquatic ecosystems and their multiplications. The study showed that the mussel species tested reduced filtration activity already after exposure to low-environmental concentrations of the pesticide. However, this response was short-lived and not intense enough to reach levels customarily considered alarming in pollution early warning systems. Exposure of the clams to higher concentrations resulted in a rapid and prolonged reduction in filtration activity, showing that the chemical can pose a serious threat to native malacofauna. The results show that Unionidae bivalves can be a bioindicator of incidental water pollution with high doses of Roundup and also that the presence of this pesticide in the waters negatively affects bivalve populations. Analysis of the biochemical response showed an increase in oxidative stress, but the differences were not statistically significant.

The research was published in a paper entitled: “Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution by Glyphosate-Based Pesticides?” in Water (Q 1, IF=3.0).

**Keywords:** Unionid mussels, pharmaceutical pollution, water quality, chemical lakes restoration, Roundup



### 3. Wykaz publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej

1. Drewek A., Rybak M., Drzewiecka K., Niedzielski P., Polak J., Klimaszyk P., 2022 The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration. *Journal of Environmental Management* 318, p. 115535; <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115535>

Punktacja MNiSW – 200 pkt; Impact Factor – 8.91

2. Drewek A., Lubawy J., Domek P., Polak J., Słocińska M., Dziegielewska A., Klimaszyk P., 2024 Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides? *Water* 16(13), p. 1882; <https://doi.org/10.3390/w16131882>

Punktacja MNiSW – 100 pkt; Impact Factor – 3.0

#### 4. Wstęp

Szacuje się, że zasoby wodne Ziemi stanowią ponad 1,4 biliona kilometrów sześciennych. Woda pokrywa ponad 75% powierzchni naszej planety. Jednakże tylko 3% globalnego zasobu stanowią wody słodkie, a zaledwie z tego 1% przypada na ekosystemy słodkowodne, takie jak rzeki, jeziora, stawy, zbiorniki zaporowe (Holden 2014). Wykładniczy wzrost populacji ludzkiej, rozwój socjoekonomiczny i rozwój konsumpcjonizmu skutkuje w ostatnich dekadach gwałtownym wzrostem presji na środowisko naturalne (Vorosmarty i in. 2010). Wody słodkie są ekosystemami najsilniej narażonymi na antropopresję i przejawiają najwięcej symptomów degradacji (Strayer 2006, Klimaszyk i Gołdyn 2020). Wynika to z szeregu czynników, przede wszystkim ekosystemy te mają charakter akumulacyjny i w związku z tym mają na nie wpływ zmiany jakie dokonują się w otaczających je ekosystemach lądowych. Wylesianie, chemizacja rolnictwa, produkcja przemysłowa, nieodpowiednia gospodarka odpadami oraz transport, to tylko wybrane aktywności człowieka, w wyniku których do ekosystemów słodkowodnych docierają olbrzymie ilości różnego rodzaju zanieczyszczeń (Klimaszyk i Gołdyn 2020). Konsekwencją rozwoju cywilizacyjnego jest pojawianie się w wodach nowych grup zanieczyszczeń, których efekty oddziaływania na ekosystemy są jeszcze bardzo słabo rozpoznane. Przykładem tego może być zanieczyszczenie wód farmaceutykami (Rzymski i in. 2017).

Istotne zaburzenia ekosystemów słodkowodnych wynikają także z bezpośredniego oddziaływania człowieka na te ekosystemy. Przerywanie ciągłości rzek poprzez budowę zapór, pozyskiwanie substratu dennego, umacnianie brzegów czy zmiana termiki wód modyfikuje siedliska czy wręcz prowadzi do ich zaniku (Grzybowski i Glińska-Lewczuk 2019). Globalne ocieplenie wraz ze wzrostem zapotrzebowania na wodę rosnącej populacji ludzkiej, powoduje także zaburzenia funkcjonowania ekosystemów słodkowodnych takie jak, kurczenie się powierzchni jezior, okresowe wysychanie rzek czy zmiana reżimu termicznego wód (Marszelewski i in. 2022, Ades i in. 2022). Istotnym zagrożeniem dla słodkowodnych biocenoz jest ich nadmierna eksploatacja, a także przypadkowe bądź intencjonalne wprowadzanie obcych gatunków roślin i zwierząt (Malmquist i Rundle 2002, Strayer 2006). Wszystkie te zmiany prowadzą do ograniczania liczebności i zaniku populacji gatunków, a co za tym idzie spadku różnorodności biologicznej w ekosystemach słodkowodnych (Tickner i in. 2020).

Jedną z grup zwierząt słodkowodnych najwrażliwszych i najsilniej reagujących na zmiany środowiska są małże (Ożgo 2010, Lopes-Lima i in. 2017, Lopes-Lima i in. 2018). Choć występują w wodach słodkich pospolicie i na wszystkich kontynentach poza obszarami

polarnymi (z wyjątkiem kilku gatunków z rodziny Spheridae) i pustynnymi (Bespalaya i in. 2017, Schiøtte i Warèn 1992), to szacunki wskazują, że 40% gatunków jest bliskich zagrożenia, zagrożonych lub na granicy wymarcia (Lopes- Lima i in. 2017). Zanik słodkowodnych małży (zwłaszcza gatunków należących do rzędu Unionoida) jest zjawiskiem globalnym, zachodzącym z mniejszą lub większą intensywnością na niemal całym obszarze ich występowania (Lydeard i in. 2004). Główną przyczyną tego zjawiska jest szeroko ujmowane zniszczenie siedlisk (Downing i in. 2010). Zjawisko to odpowiada za ponad 75% przypadków drastycznej redukcji populacji lub całkowitego zaniku. W obrębie tej kategorii najsilniej wpływają: zanieczyszczenie i wynikające z niego pogorszenie jakości wody, fragmentacja siedlisk, zmiany reżimu hydrologicznego oraz zmiana struktury zlewni. Stosunkowo mniejsze znaczenie mają takie czynniki, jak pozyskiwanie osobników, zmiana struktury stref ekotonalnych, czy zaburzenia wynikające z rekreacyjnego wykorzystywania wód. Zagrożeniem dla rodzimych gatunków małży może być inwazja, zwłaszcza masowa, gatunków egzotycznych (Downing i in. 2010). W słodkowodnych ekosystemach Europy występuje obecnie kilka inwazyjnych gatunków małży: *Dreissena rostriformis bugensis* (Andrusov 1897), *Corbicula fluminea* (Muller 1774), *Corbicula fluminalis* (Muller 1774), *Dreissena polymorpha* (Pallas 1771) oraz *Sinanodonta woodiana* (Lea 1834) (Bogan i in. 2011). W Europie największą uwagę naukowców w ostatnich latach skupia ekspansja szczeżui chińskiej *S. woodiana*. Ten azjatycki gatunek należący do rodziny skójkowatych Unionidae stanowi potencjalne zagrożenie dla rodzimych gatunków małży, gdyż zajmuje tą samą niszę ekologiczną. Jednocześnie w porównaniu do rodzimych małży skójkowatych charakteryzuje się szybszym przyrostem ciała, wyższą zdolnością reprodukcyjną, brakiem wybiórczości gatunkowej żywiciela glochidiów i szerokim spektrum troficznym zasiedlanych ekosystemów (Beran 2008, Cappelletti i in. 2009, Benkő-Kiss i in. 2013, Demayo i in. 2012, Ciutti i in. 2011, Kamburska i in. 2013). Corsi i inni (2007) sugerują, że odmienna od rodzimych skójkowatych aktywność enzymatyczna, zwiększa jej tolerancję na szeroki zakres zanieczyszczeń występujących w środowisku wodnym. Długotrwałe efekty oddziaływania inwazji tego gatunku na rodzime małże nie są poznane i wymagają szczegółowych badań (Lopes- Lima i in. 2017).

Małże słodkowodne określane są jako gatunki kluczowe i inżynierowie środowiskowi umożliwiające stabilne funkcjonowanie ekosystemów wodnych (Bolotov i in. 2020). W głównej mierze funkcja ta wynika ze sposobu odżywiania się tych zwierząt. Odfiltrowują z toni wodnej zawiesinę (zarówno bio jak i abioseston) ograniczając liczebność fitoplanktonu, bakterii i drobnocząsteczkowej materii organicznej (Ożgo 2010). Zwłaszcza gatunki o dużych rozmiarach ciała (np. skójkowate) charakteryzują się bardzo dużą efektywnością tego procesu.

W zależności od rozmiaru ciała oraz specyfiki gatunku jeden dorosły osobnik z rodziny Unionidae przepuszcza przez skrzel i filtruje od 30 do ponad 70 litrów wody na dobę (Piechocki i Dyduch-Falinowska 1993, Tankersley i Dimock 1993, Ożgo 2010, Vaughn i Hoellein 2018). W wyniku tego procesu następuje translokacja energii i materii z toni wodnej w kierunku osadów dennych. Zauważyć jednak należy, że zbyt duża ilość zawiesiny w wodzie może redukować aktywność filtracyjną, oddychanie i być przyczyną załamania liczebności populacji małży (Goldsmith i in. 2020). Jedynie 2% odfiltrowanej materii organicznej buduje ciało małża, 30% ulega rozproszeniu w wyniku procesów metabolicznych, a prawie 70% wraz z cząsteczkami mineralnymi jest sklepane śluzem i deponowane na dnie jako fekalia i pseudofekalia (Ostrovsky i in. 1993, Ożgo 2010). Małże poruszając się po dnie powodują wzruszanie osadów, co przyczynia się do ich natleniania i w dalszej konsekwencji intensywnej mineralizacji materii organicznej. O ile glochidia małży pasożytują na rybach, to małże skójkowate są kluczowym elementem niezbędnym do występowania w wodach ryby różanki europejskiej (*Rhodeus amarus*) (Bloch 1782). Ryby te składają jaja do jamy skrzelowej małży. Tam też następuje zapłodnienie jaj i ich rozwój, aż do wolnopływającego stadium narybkowego, które opuszcza jamę skrzelową gospodarza. Stabilne funkcjonowanie populacji różanki w ekosystemie uzależnione jest więc od obecności małży skójkowatych (Smith i in. 2004).

Małże są grupą organizmów często wykorzystywanych w monitoringu wód. Początkowo, powszechnie wykorzystywano małże do monitoringu chemicznego zanieczyszczenia środowisk wodnych uwzględniając fakt, iż akumulują one w swoich tkankach szereg toksycznych pierwiastków czy związków chemicznych. Długotrwałe narażenie osobników na niewielkie stężenia tych substancji chemicznych skutkuje najczęściej wzrostem ich stężeń do poziomu, który łatwo jest określić analitycznie i porównać w analizach pomiędzy ekosystemami. Znaczącą niedogodnością takiego podejścia jest fakt, iż stabilne i wysokie stężenia toksykantów w tkankach małży utrzymują się dopiero po kilkutygodniowej ekspozycji (Kramer i in. 1989). To czyni metodę mało użyteczną do wykorzystania w systemach szybkiego ostrzegania przed zanieczyszczeniem, czy detekcji substancji szybko rozkładających się w środowisku wodnym (Salanki i Balogh 1989, Mersh i Johansson 1993). Analizy markerów stresu biochemicznego, czy badanie efektów genotoksycznych małży ekspozycyjnych na różnego rodzaju ksenobiotyki, wydają się dobrą grupą metod monitoringu zanieczyszczeń wód (Sohail i in. 2017, Martyniuk i in. 2022). Wyniki licznych badań pokazują, że poprawna ocena reakcji stresowych wymaga jednak podejścia multimarkerowego, gdyż dla różnych substancji

odmienne markery wskazują na zachodzący stres biochemiczny (Gnathyshyna i in. 2019, Khoma i in. 2021).

Metodą opartą o małże, wykorzystywaną w monitoringu wód jest obserwacja zmian behawioralnych osobników. Najczęściej wykorzystywaną reakcją behawioralną w tego typu metodach jest analiza ruchu skorup. Oparta jest na fakcie, że małże przez większą część czasu posiadają rozwarte skorupy, by oddychać i prowadzić filtracje zawiesiny z wody i zamykają je na dłuższy czas w przypadku oddziaływania czynnika stresowego (Kramer i in. 1989, Sluyts in. 1996, Chmist i in. 2019). Metoda ta, pozwala na zastosowanie w ciągłym monitoringu jakości wody i sprawdza się zwłaszcza w szybkiej detekcji zanieczyszczeń incydentalnych. Obecnie takie systemy wykorzystujące małże z rodzaju *Unio* zainstalowane są na kilku ujęciach wody w Polsce. Jej ograniczeniem jest fakt, że małże zamykają skorupy nie tylko w reakcji na pojawiające się zanieczyszczenie, ale także na inne stresory środowiskowe takie jak, nagły skok temperatury, wstrząsy czy gwałtowne zmiany oświetlenia (Kramer i in. 1989).

**Celem głównym pracy** była ocena reakcji małży słodkowodnych z rodzaju *Unio* na nowe rodzaje zanieczyszczeń docierających do ekosystemów wodnych oraz ocena możliwości wykorzystania małży do indykacji tych zanieczyszczeń w systemach wczesnego ostrzegania. Przeprowadzono badania:

- zaburzeń behawioralnych dwóch rodzimych gatunków małży skójkii zaostrowanej (*Unio tumidus* Philipsson, 1788) oraz szczeżui pospolitej (*Anodonta anatina* L.), a także inwazyjnego gatunku szczeżui chińskiej (*Sinanodonta woodiana*, I. Lea, 1834) w odpowiedzi na narażenie na szereg farmaceutyków odnotowywanych w ostatnich latach w ekosystemach wodnych na świecie. Testowano należące do niesteroidowych leków przeciwzapalnych: ibuprofen, diklofenak oraz lek przeciwbólowy i przeciwgorączkowy paracetamol.
- reakcji behawioralnej, zaburzeń w stechiometrii chemicznej i reakcji stresu biochemicznego u *U. tumidus* oraz szczeżui wielkiej (*Anodonta cygnea* L.) narażonych na zróżnicowane dawki koagulantu żelazowego ( $\text{FeCl}_3$ ) stosowanego powszechnie w chemicznej rekultywacji jezior.
- zmian behawioru filtracyjnego i biochemicznej reakcji stresowej dwóch gatunków małży: *U. tumidus* oraz *A. anatina* narażonych na różne dawki pestycydu Roundup 360 PLUS, zawierającego czynnik aktywny: glifosat.

## **5. Metodyka badań**

### **5.1. Pozyskiwanie i aklimatyzacja małży do testów**

Małże pobierano za pomocą drągi hydrobiologicznej lub ręcznie, przeznaczając do testów osobniki w wieku ca. 4 - 5 lat. Osobniki były transportowane w wodzie do laboratorium w skrzyni termicznej zaopatrzonej w system napowietrzania i schładzania.

W laboratorium małże były umieszczane w napowietrzanych akwariach o pojemności 250 l, wypełnionych wodą wodociągową uprzednio odchlorowaną. Temperatura wody utrzymywana była na poziomie 16°C. Osobniki aklimatyzowano przynajmniej przez 2 tygodnie. Podczas aklimatyzacji małże były karmione co 2 dni zawiesiną będącą mieszaniną pokarmu Flora Nature firmy Sera oraz suplementu diety chlorella.

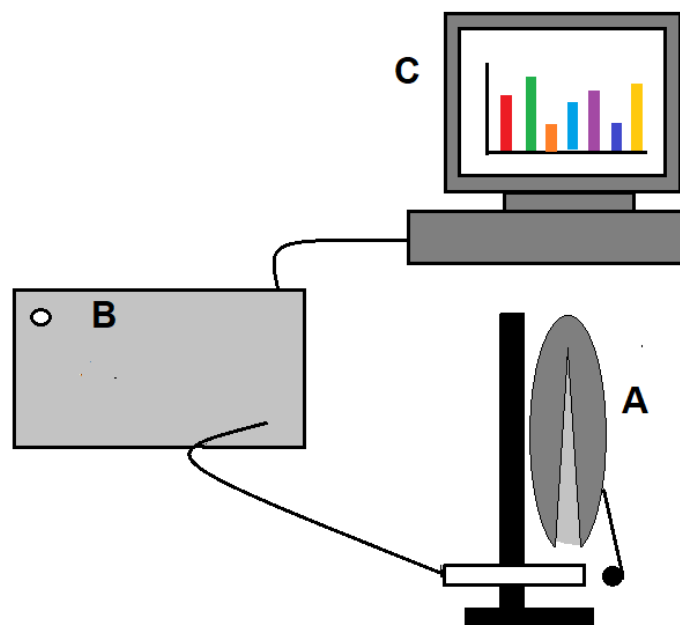
W badaniach nad wpływem farmaceutyków na małże osobniki wszystkich badanych gatunków pozyskane zostały z kanału Warta – Gopło w pobliżu jeziora Pątnowskiego. Przed kolejnymi badaniami (Roundup i koagulant żelazowy) stwierdzono na wielu stanowiskach systemu jezior Konińskich masowy pomór małży skójkowatych, co wymusiło zmianę miejsca pozyskiwania małży i jednocześnie zarzucenia badań na *S. woodiana*. Do eksperymentów nad herbicydem Roundup małże pobierane były ze śródleśnego zbiornika wodnego (N 52°42'34.46", E 16°08'34.76"), w którego zlewni nigdy nie stosowano tego herbicydu. Materiał biologiczny do badań nad wpływem koagulantu żelazowego pobrany został z Jeziora Drawskiego (Zachodniopomorskie, Polska). Na odstępstwa od ochrony częściowej szczytowi wielkiej wydała zgodę Regionalna Dyrekcja Ochrony Środowiska Oddział w Szczecinie (decyzja WOPN.6401.10.10.2022.KA).

### **5.2. Metodyka badań reakcji behawioralnej małży**

Badania reakcji behawioralnej małży oparto na obserwacjach szerokości rozwarcia skorup. Jest to podejście od dawna opisywane w literaturze światowej i bazuje na fakcie, że małże w optymalnych warunkach niemal przez całą dobę filtrują wodę wyłapując seston i oddychając. Gwałtowne i długotrwałe zamknięcia muszli, tzw. reakcja unikania, wskazują na działający czynnik stresowy (Sluyts i in.1996, Salanki 2003). Czynnikiem stresowym wywołującym reakcje skorup może być nie tylko zmiana chemizmu wody - pojawienie się substancji toksycznej, ale również zmiana czynników środowiskowych: skok temperatury, ruchy wody, wstrząsy czy zmiana światła (Kramer i in. 1989, Salanki 1991). By wyeliminować wpływ „fałszywych” reakcji nie związanych z działaniem badanych substancji testy prowadzono w pomieszczeniu o ograniczonym dostępie osób postronnych. By ograniczyć

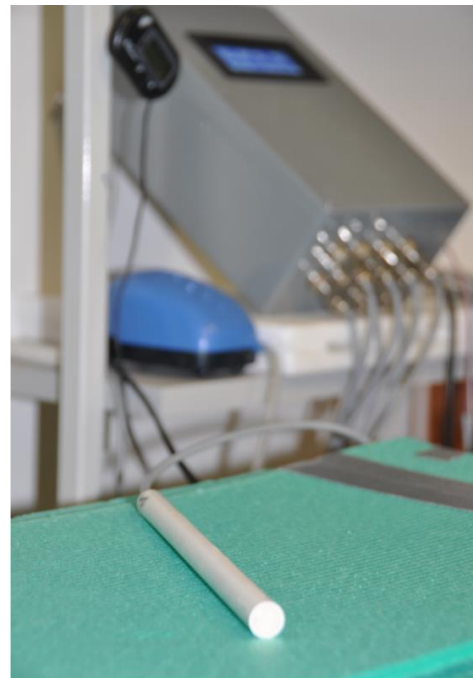
transmisję drgań z podłoża, akwarium testowe o pojemności 60 litrów posadowione było na elastycznej podstawie, aby ograniczyć fluktuacje oświetlenia, jego ściany były osłonięte. Za pomocą chłodziarki akwariowej Teco 200 i systemu pomp w akwarium utrzymywany był stały słaby przepływ wody i temperatura  $16\pm 2^{\circ}\text{C}$  imitująca warunki termiczne panujące w głębszej strefie litoralu w okresie letnim. Za pomocą aeratorów akwariowych woda była napowietrzana utrzymując nasycenie tlenem na poziomie powyżej 90%. By uniknąć problemów z interpretacją wyników (zamykanie się małży wynikać może z naturalnego cyklu życiowego) do interpretacji testów używano uśrednionego wyniku z populacji 8 osobników. W związku z tym, że cykle aktywności i spoczynku u małży nie są zsynchronizowane, tak liczna grupa badawcza pozwala uniknąć tego błędu (Kramer i Fokema 2021).

W początkowym etapie badań zastosowano system oparty o rejestrację wideo aktywności małży i analizę obrazu (Salanki i in. 2003). Ze względu na bardzo dyskretne różnice w położeniu skorup (zwłaszcza w przypadku skójki zaostrzonej charakteryzującej się małymi rozmiarami ciała), osadzaniem się pęcherzy powietrza na ściankach akwarium, metoda ta okazała się nieskuteczna. W związku z tym w oparciu o urządzenie skonstruowane w latach 90 XX wieku w Zakładzie Ochrony Wód zbudowano system elektromagnetyczny do analizy rozwarcia muszli (Rys. 1).



**Rys. 1.** Schemat elektromagnetycznego systemu do analizy aktywności małży. Małż z czujnikiem Hala i doczepionym magnesem (A), sterownik (B) oraz komputer (C).

Każdy z ośmiu małży przytwierdzony był jedną skorupą do postumentu wykonanego z PVC za pomocą nietoksycznego kleju INNOTEK Adheseal, a do drugiej skorupy na wysięgniku przytwierdzony był magnes neodymowy (Rys. 2). Do stojaka przytwierdzono czujniki Halla mierzące natężenia pola magnetycznego emitowanego przez magnes. Zmiany pola magnetycznego spowodowane ruchem skorupy (i magnesu), rejestrowane przez czujnik, przetwarzane na sygnał o częstotliwości 120 kHz i napięciu 10 V był wysyłany do interfejsu. Napięcie odbieranego sygnału było proporcjonalną do odległości między magnesem a czujnikiem i zawierało się w przedziale  $\sim 0$  V (magnes w pozycji odległej od czujnika – oznaczający znaczne rozwarście skorup i intensywną filtrację) do  $\sim 10$  V (magnes dotyka czujnika – skorupy zamknięte).



**Rys. 2.** Małż na postumencie z przytwierdzonym magnesem (po lewej) oraz czujnik pola magnetycznego Halla i interfejs (po prawej).

Każdy eksperyment rozpoczynał się od 24 godzinnej kalibracji systemu z małżami, kiedy określany był maksymalny poziom otwarcia każdej z małży zapamiętywany przez system jako 100% otwarcia. Zamknięte skorupy muszli oznaczały 0% otwarcia (Rys. 3).





**Rys. 3.** Małż w trakcie kalibracji systemu. Widoczne maksymalne otwarcie i zamknięcie skorup.

Po kalibracji w ciągu 24 godzin zapisywano dane dotyczące naturalnej aktywności małży w układzie eksperymentalnym, a następnie dodawano badaną substancję i przez zadany czas prowadzono obserwację aktywności małży. Dane dotyczące rozwarcia skorup zapisywane były jako średnia z 5 minutowych interwałów pomiarowych. W trakcie eksperymentu monitorowano temperaturę wody i saturację wody tlenem (Rys. 4).



**Rys. 4.** Populacja małży przygotowana do rozpoczęcia eksperymentu.

### 5.3. Metodyka badań fizycznych i chemicznych cech wody i ciał małży

Prowadzono monitoring podstawowych parametrów fizycznych i chemicznych wody, w której przetrzymywano małże oraz wody wykorzystywanej do eksperymentów. Przewodnictwo elektrolityczne, odczyn wody oraz pH mierzono za pomocą wieloparametrycznego urządzenia pomiarowego Elmetron CX 401. Zawartość oraz nasycenie wody tlenem mierzono za pomocą przenośnej sondy Pro ODO YSI. Koncentracje wybranych substancji chemicznych w wodzie określano za pomocą analizatora wstrzykowo-przepływowego FIAcompact (MLE GmbH) z mineralizatorem. Glin wg normy APHA 3500Al, żelazo ogólne metodą ferrozynową po redukcji z kwasem askorbinowym (DIN 38406), azot amonowy wg normy EN ISO 11732, azot azotanowy oraz azotyny wg normy ISO 13395, azot ogólny wg normy EN ISO 29441, ortofosforany oraz fosfor ogólny wg normy ISO 15681.

Zawartość pierwiastków chemicznych w ciałach małży określana była w mięśniach nóg. Nogi po ekstrakcji były suszone w temperaturze 50°C. Próbkę nóg o masie 0,200-0,500 g ( $\pm 0,001$  g) do analizy fosforu (P), żelaza (Fe), wapnia (Ca), magnezu (Mg), potasu (K), manganu (Mn) i glinu (Al) trawiono w zamkniętych pojemnikach teflonowych w temperaturze 180°C kwasem azotowym (65%, Sigma-Aldrich, USA) w mikrofalowym systemie Mars 6 Xpress (Mars 6 Xpress, CEM USA). Następnie próbki były filtrowane i rozcieńczane wodą (MilliQ, Millipore, Niemcy) do objętości 15,0 mL. Do oznaczenia wybranych pierwiastków wykorzystano spektrometr ICP-hrOES PlasmaQuant 9100 Elite (Analytik Jena, Niemcy) z plazmą indukcyjnie sprzężoną o wysokiej rozdzielczości optycznej. Zastosowano ujednolicone warunki: przepływ gazu plazmowego  $12,0 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ , przepływ gazu z nebulizatora  $0,50 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ , przepływ gazu pomocniczego  $0,5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ , moc promieniowania radiowego (RF) 1,20 kW. Sygnał mierzono w 5 powtórzeniach. Jako standard wewnętrzny zastosowano argon. Granice wykrywalności wyznaczono w zakresie 0,01-0,09  $\text{mg kg}^{-1}$  suchej masy (sm) stosując kryteria 3-sigma. Ze względu na brak odpowiedniego certyfikowanego materiału odniesienia, dokładność sprawdzono poprzez analizę materiałów odniesienia CRM S-1 - gleba lessowa, CRM 667- osady estuaryjne, CRM 405 - osady estuaryjne, CRM NCSDC (73,349) - gałęzie i liście krzewów, CRM 2709 – gleba. Niepewność dla całej procedury analitycznej określono na poziomie 20%.

#### 5.4. Badania stresu oksydacyjnego

Markery stresu oksydacyjnego były analizowane w tkance skrzeli. Jest to najczęściej wykorzystywany, obok gruczołów trawiennych, organ do tego typu badań (Almeida i in. 2005, Vasanthi i in. 2021). Po ekspozycji małży, przez założony w eksperymencie czas na toksykant osobniki były uśmiercane, a skrzela preparowane. Próbkę skrzeli o wadze  $0,5 \pm 0,1$  g homogenizowano w schłodzonym 0,1% kwasie trójchlorooctowym (TCA) przy użyciu móżdziejka i tłuczka. Po odwirowaniu ( $12\ 000 \times g$ , 20 min, 4 °C), otrzymany supernatant poddawano kolorymetrycznym testom na obecność substancji reaktywnych kwasu tiobarbiturowego (TBARS) i nadtlenu wodoru ( $H_2O_2$ ) przy użyciu spektrofotometru UV-Vis Cary 100 Bio (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Dla oznaczenia TBARS, 1 mL supernatantu mieszało się z 4 mL 0,5% kwasu tiobarbiturowego (TBA) w 20% TCA. Mieszaninę ogrzewano w temp. 95°C przez 60 min., a następnie schłodzono w łaźni lodowej. Po odwirowaniu zmierzono absorbancję przy  $\lambda = 532$  i 600 nm. Zawartość TBARS obliczono poprzez odjęcie  $A_{600}$  i zastosowanie współczynnika ekstynkcji 155 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

W celu oznaczenia zawartości białka izolowano mięśnie nóg, a następnie tkanki umieszczano w 5 ml probówce typu Eppendorf wypełnionej 500  $\mu$ l świeżego buforu PBS i homogenizowano na lodzie przez 2 min. przy użyciu ręcznego homogenizatora tłoczkowego (Kimble Chase, USA). Następnie próbki odwirowano przy  $10\ 000 \times g$  przez 10 min. Supernatant posłużył do oznaczenia zawartości białek we frakcji rozpuszczalnej. Pomiar przeprowadzono za pomocą spektrometru podczerwieni Direct Detect1 (Merck Millipore). Łącznie 2  $\mu$ L supernatantu umieszczano na membranie PTFE i pozostawiano do wyschnięcia na 3 min., następnie zmierzono zawartość białka. Jako standardu użyto albuminy surowicy bydlęcej (Merck Millipore).

Do oznaczenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) użyto zestawu Superoxide Dismutase Assay Kit (706002, Cayman Chemical). W celu oznaczenia aktywności SOD, 10  $\mu$ L próbki uzyskanej w sposób opisany powyżej łączono z 200  $\mu$ L detektora rodników (sól tetrazolowa rozcieńczona w 50 mM Tris-HCl, pH=8,0 zawierająca 0,1 mM kwasu dietylenotriaminopentaoctowego (DPTA) i 0,1 mM hipoksantyny) w 96-dołkowej mikropłytkę. W celu zainicjowania reakcji do każdego dołka dodano 20  $\mu$ L oksydazy ksantynowej i inkubowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej na wytrząsarce. Po inkubacji, absorbancję próbek odczytywano przy 540 nm przy użyciu czytnika płytek Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA). Wyniki obliczono z krzywej standardowej

SOD izolowane z erytrocytów bydłych i przedstawiono jako jednostkę aktywności SOD na mililitr na  $\mu\text{g}$  białka ( $\text{U}/\text{mL}/\mu\text{g}$ ).

Następnie wykonano badania immunodetekcji. Frakcja białek rozpuszczalnych była ponownie zawieszana w buforze do próbek zawierającym 1% (w/v) SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,05% (w/v) błękitu bromofenolowego i 16%  $\beta$ -merkaptoetanolu i gotowana przez 5 min. Elektroforezę SDS-PAGE (z użyciem 14% żelu poliakrylamidowego) z użyciem 40  $\mu\text{g}$  białka na kieszonkę prowadzono przez 90 min. przy 120 mV. Rozdzielone białka przenoszono następnie na membranę nitrocelulozową. Błony były blokowane 5% mlekiem w soli fizjologicznej buforowanej Tris z 0,1% Tweenem (TBS-T) przez noc w 4°C. Królicze poliklonalne przeciwciała pierwszorzędowe przeciwko dysmutazie ponadtlenkowej 1 (SOD, ab13498 firmy Abcam) stosowano w rozcieńczeniu 1:250. Błony używane do immunodetekcji SOD były inkubowane z przeciwciałami pierwszorzędowymi przez 90 min. Po inkubacji błony przemywano trzykrotnie TBS-T i inkubowano z kozim antykróliczym przeciwciałem drugorzędowym skoniugowanym z peroksydazą chrzanową (Agrisera, AS09602) w rozcieńczeniu 1:25 000, przez 1 h w temperaturze pokojowej. Przeciwciała przeciwko  $\alpha$ -tubulinie w rozcieńczeniu 1:500 były używane jako kontrola ilości nałożonego białka. Prążki białkowe wizualizowano przy użyciu systemu Amersham ECL i oznaczano ilościowo przy użyciu oprogramowania ImageLab (Bio-Rad).

## **6. Wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych i paracetamolu na reakcję behawioralną małży z rodziny Unionidae**

### **6.1. Wstęp**

W związku ze skokowym rozwojem cywilizacji pojawiają się ciągle nowe rodzaje substancji zanieczyszczających środowisko naturalne. W ostatnich dziesięcioleciach związki farmaceutyczne zostały zidentyfikowane jako nowe źródło zanieczyszczenia środowiska, w tym ekosystemów wodnych (Rzymiski i in. 2017). Różnorodne farmaceutyki od dawna stosowane są zarówno w terapii człowieka i jak i zwierząt (Boxall i in. 2012), jednak rozwój medycyny i wzrost dostępności farmaceutyków skutkuje ciągłym wzrostem ilości zużywanych leków. O ile prognoza na rok 2020 zakładała roczne zużycie około 4,5 trylionu dawek różnych leków (Rzymiski i in. 2017), to szacunki na rok 2026 wskazują na prawie 20% wzrost ilości zastosowanych dawek farmaceutyków (EPR 2023). Obecnie istnieje ponad 4000 farmaceutyków stosowanych w praktykach medycznych i weterynaryjnych (Boxall i in. 2012, Sim i in. 2011, Mendoza i in. 2015, Cardoso i in. 2014). W samej Unii Europejskiej w leczeniu ludzi stosuje się około 3000 różnych substancji, w tym leki przeciwzapalne i przeciwbólowe, środki antykoncepcyjne, antybiotyki,  $\beta$ -blokery, regulatory lipidów, leki neuroaktywne i wiele innych (Fent i in. 2006). Farmaceutyki mogą przenikać do środowiska naturalnego, a głównymi źródłami są surowe i podczyszczone ścieki z zakładów przemysłowych produkujących leki, odpady i ścieki szpitalne, odchody zwierząt gospodarskich i domowych, odpływy z agrocenoz nawożonych zanieczyszczonymi ściekami, odchody ludzkie oraz niewłaściwa utylizacja nieużytych medykamentów (Boxal i in. 2012, Rzymiski i in. 2017, Klimaszyk i Rzymiski 2018). Spośród wszystkich stosowanych farmaceutyków do roku 2016 ponad 630 zostało zidentyfikowanych w ekosystemach wodnych na świecie (Parolini 2020). Farmaceutyki obecne są w środowisku w postaci pierwotnych związków chemicznych, a także jako ich metabolity. Współczesne procesy technologiczne stosowane w oczyszczalniach ścieków nadal charakteryzują się niewielką skutecznością usuwania farmaceutyków i w związku z tym substancje te przedostają się łatwo do wód powierzchniowych i gruntowych (Santos i in. 2010). Trwałość farmaceutyków w środowisku, w tym w wodach, jest zróżnicowana i zależy od szeregu czynników takich jak: właściwości chemicznych i farmakokinetycznych substancji, temperatura, odczyn, dostępność różnych długości światła i warunków tlenowych (Klimaszyk i Rzymiski 2018). Choć większość substancji farmaceutycznych nie utrzymuje się bardzo długo w środowisku, ich ciągły dopływ może skutkować poziomami obciążenia

przekraczającymi wskaźniki degradacji. Z tego powodu farmaceutyki uważane są za grupę pseudo trwałych zanieczyszczeń (Daughton i in. 2003). Dodatkowo informacje o występowaniu w środowisku metabolitów farmaceutyków i skutkach ich obecności są nieliczne i wymagają kolejnych badań (Klimaszyk i Rzymiski 2018). Stężenia w jakich wykrywane są substancje farmaceutyczne w naturalnych ekosystemach wodnych świata są zazwyczaj bardzo niskie i mieszczą w zakresie od  $\text{ng L}^{-1}$  do  $\text{mg L}^{-1}$  (Santos i in. 2010, Al Aukidy i in. 2014, Bagnis i in. 2018, Fekadu i in. 2019). Jednak substancje te, są tak zaprojektowane, aby miały określony sposób działania nawet przy niskich stężeniach (Fent i in. 2006). Dodatkowo organizmy wodne mogą być narażone na ich działanie przez długi czas, nawet całe życie, a efekty przewlekłego narażenia mogą manifestować się jako efekty subletalne takie jak: zahamowanie wzrostu, zmiany molekularne lub biochemiczne lub zmiany behawioralne (Parolini 2020). Tym samym obecność farmaceutyków w ekosystemach wodnych stanowi istotny i narastający problem, z którym musi się zmierzyć człowiek (Fent i in. 2006, Santos i in. 2010, Boxall i in. 2012). Ze względu na bardzo dużą liczbę, znaczne zróżnicowanie chemiczne i niewielkie stężenia, w których występują w środowisku, monitoring zanieczyszczenia jest bardzo trudny i prowadzony wyrywkowo (Bound i Voulvoulis 2006, Gomez i in. 2007, Boxall i in. 2012, Parolini 2020).

Istotnym wydaje się opracowanie narzędzi i metod pozwalających na monitorowanie w sposób ciągły obecności zanieczyszczeń farmakologicznych w wodach. Wdrożenie systemów biomonitoringu do śledzenia zanieczyszczeń farmakologicznych wymaga poznania zakresów tolerancji gatunków wobec tych substancji oraz rozpoznania efektów biochemicznych, behawioralnych narażenia na różne stężenia substancji chemicznych.

Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) i leki przeciwbólowe stanowią jedną z najbardziej istotnych terapeutycznie grup leków występujących w ekosystemach wodnych na całym świecie (aus der Beek i in. 2016). Leki te są stosowane powszechnie zarówno w terapiach ludzkich, jak i weterynaryjnych ze względu na ich właściwości przeciwbólowe, przeciwgorączkowe i przeciwzapalne. NLPZ hamują syntezę i uwalnianie prostaglandyn z kwasu arachidonowego, działają jako nieselektywne inhibitory enzymów cyklooksygenaz (Gierse i in. 1995). W związku z bardzo powszechnym stosowaniem NLPZ i leków przeciwbólowych stanowią one najczęściej wykrywaną klasę farmaceutyków w środowisku (Fekadu i in. 2019). W wielu badaniach monitoringowych odnotowano poziomy NLPZ znacznie przekraczające  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  w ściekach miejskich i nieco niższe stężenia w wodach powierzchniowych (Santos i in. 2010, aus der Beek i in. 2016, Bagnis i in. 2018, Fekadu i in. 2019). Najczęściej wykrywanymi farmaceutykami w próbkach środowiskowych spośród NLPZ

jest ibuprofen (IBU) oraz diklofenak (DCF), a wśród leków przeciwbólowych i przeciwgorączkowych paracetamol (PCM). Farmaceutyki te, zostały wykryte w wodach powierzchniowych, gruntowych i wodzie uzdatnionej do picia na wszystkich kontynentach poza Antarktydą (Parolini 2020). Stwierdzono też, że NLPZ akumulują się w bezkręgowcach wodnych i mogą wywoływać ostre i przewlekłe efekty toksyczne (Miller i in. 2018, Parolini 2020). Jednak zazwyczaj reakcje toksyczne obserwowano w eksperymentach, gdzie zastosowane dawki farmaceutyków były daleko wyższe od tych, które spotykane są w środowisku.

W niniejszej pracy przeprowadzono badania reakcji behawioralnych dla trzech gatunków małży *Anodonta anatina*, *Unio tumidus* i *Sinanodonta woodiana*. Analizowano reakcję na stężenia PCM, które wynosiły  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . Przeprowadzono także badania aktywności filtracyjnej osobników po aplikacji DCF i IBU w stężeniach  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **Celem przeprowadzonych badań było:**

- określenie wpływu NLPZ i leków przeciwbólowych na behavior filtracyjny wybranych gatunków małży z rodziny Unionidae w czasie 24 godzinnego i subchronicznego (5 dniowego) narażenia na farmaceutyki,
- określenie możliwości wykorzystania wybranych gatunków małży z rodziny Unionidae do detekcji incydentalnego zanieczyszczenia wód farmaceutykami NLPZ i środkami przeciwbólowymi w ramach systemów wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem,
- porównanie wrażliwości na NLPZ i leki przeciwbólowe rodzimych gatunków małży *Unio tumidus* i *Anodonta anatina* oraz obcego gatunku inwazyjnego *Sinanodonta woodiana*.

#### **Postawiono i testowano następujące hipotezy badawcze:**

*H1: Narażenie małży na badane farmaceutyki będzie skutkowało ograniczeniem ich aktywności filtracyjnej. Redukcja aktywności będzie występowała już przy narażeniu na niewielkie stężenia leków, a intensywność reakcji będzie się zwiększała wraz ze wzrostem koncentracji leków.*

**H2:** Reakcja małży na stężenia farmaceutyków odnotowywane w środowisku będzie wystarczająco intensywna, by mogły być one zastosowane do detekcji zanieczyszczenia wód farmaceutykami w ramach systemów wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem.

**H3:** Redukcja aktywności filtracyjnej inwazyjnego gatunku *Sinanodonta woodiana* w reakcji na zanieczyszczenie wód badanymi farmaceutykami będzie mniej intensywna w porównaniu z rodzimymi gatunkami małży skójkowatych.

## 6.2. Badane farmaceutyki

**Tabela 1.** Koncentracja (ng L<sup>-1</sup>) badanych farmaceutyków w wodach powierzchniowych

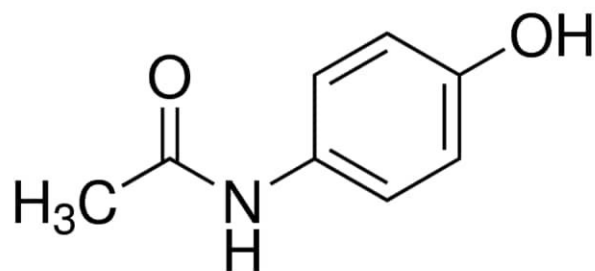
Farmaceutyk	N	Min	Max	References
Paracetamol	12	8	230	a, c, f, h
Diklofenak	25	1	931	a, b, c, d, e, f, g
Ibuprofen	26	2	928	a, c, d, e, f

a) Klimaszyk i Rzymiski (2018); b) McEneff i in. (2014); c) Gonzalez-Rey i in. (2015); d) Bayen i in. (2013); e) Carmona i in. (2014); f) Thomas i Hilton (2004); g) Szymonik i Lach (2013); h) Stackelber i in. (2004).

### 6.2.1. Paracetamol

Paracetamol N-(4-hydroksyfenylo)acetamid (Rys. 5), znany również jako acetaminofen, jest lekiem przeciwbólowym i przeciwgorączkowym. Choć PCM nie posiada działania przeciwzapalnego, to jest on czasami zaliczany do NLPZ, gdyż z toksykologicznego punktu widzenia jego mechanizm działania jest podobny do mechanizmu działania NLPZ (Misra i in. 1990). Ostatnie dane wskazują, że PCM wykryto w wodach powierzchniowych, wodach gruntowych i wodzie wodociągowej 29 krajów (Parolini 2020). Zazwyczaj odnotowuje się niewielkie stężenia rzędu kilku ng L<sup>-1</sup> (Tab. 1), a maksymalne odnotowane stężenie tego farmaceutyku w środowisku wyniosło 230 µg L<sup>-1</sup> (aus der Beek 2016).



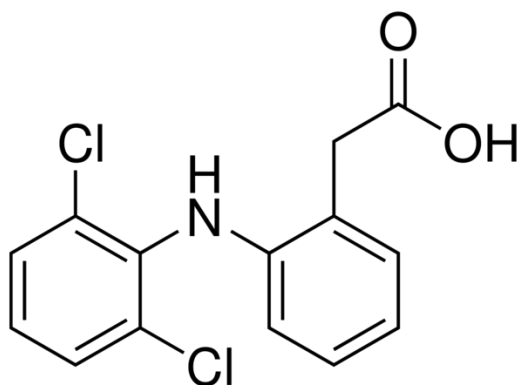


**Rys. 5.** Paracetamol - wzór strukturalny (<https://tiny.pl/cx2c8>).

Rozpuszczalność paracetamolu w wodzie jest stosunkowo niewielka i wynosi  $14 \text{ mg L}^{-1}$  w  $25^\circ\text{C}$  ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)). Niewiele wiadomo o stabilności tego związku w środowisku wodnym. Lin i in. (2010) stwierdzili 50% spadek stężenia PCM w środowisku wodnym w ciągu nieco ponad 2 dni. Jednak jak zauważają autorzy, przyczyną tak gwałtownego spadku stężenia była zarówno degradacja jak i sorpcja PCM w osadach dennych.

### 6.2.2. Diklofenak

Diklofenak 2-[(2,6-dichlorophenyl)amino] kwas fenylooctowy (Rys. 6) jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym, który hamuje enzymy cyklooksyzgenazę COX-1 i COX- 2, które są enzymami odpowiedzialnymi za produkcję prostaglandyn. Prostaglandyny przyczyniają się do stanu zapalnego i sygnalizacji bólu. Diklofenak, podobnie jak inne NLPZ, jest często stosowany jako terapia pierwszego rzutu w leczeniu ostrego i przewlekłego bólu oraz stanów zapalnych z różnych przyczyn (Todd i Sorkin 1988).

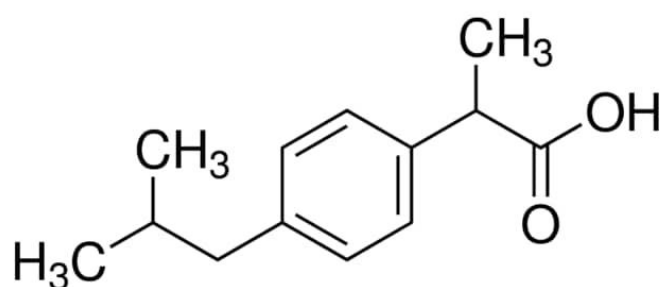


**Rys. 6.** Diklofenak - wzór strukturalny (<https://tiny.pl/cx2rr>).

Jest to jeden z głównych leków stosowanych na całym świecie. Diklofenak charakteryzuje krótki okres półtrwania w wodach, wynoszący, w zależności od warunków od < 8 do 21 dni (Bu i in. 2016) i słaba rozpuszczalność w wodzie ( $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ ). Pomimo tych cech, duża podaż powoduje, iż jest on jednym z głównych środków farmaceutycznych zanieczyszczających ekosystemy wodne. Czynnikiem sprzyjającym diklofenaku w środowisku jest fakt, iż oczyszczalnie ścieków mają ograniczoną skuteczność jego usuwania (Parolini 2020). W wodach powierzchniowych i gruntowych DCF jest wykrywany w zakresie stężeń bardzo niskich  $\text{ng L}^{-1}$  (Tab. 1), a w odpływach z oczyszczalni ścieków w Europie w stężeniach  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Roberts i Thomas 2006).

### 6.2.3. Ibuprofen

Ibuprofen [kwas 2-(4-izobutylofenylo) propionowy] (Rys. 7) jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym, pochodną kwasu propionowego. Jest stosowany do łagodzenia objawów zapalenia stawów, zaburzeń reumatycznych, bólu i obniżania temperatury (Hayashi i in. 2008). Stanowi jeden z podstawowych środków farmaceutycznych znajdujących się na "liście leków podstawowych" Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) i jest produkowany w dużych ilościach na całym świecie (Heckmann i in. 2007). Ibuprofen oddziałuje w różnych szlakach zapalnych zaangażowanych w ostry i przewlekły stan zapalny. Główne działania ibuprofenu są związane z kontrolą bólu, gorączki i ostrego stanu zapalnego poprzez hamowanie syntezy prostanoidów przez enzymy COX-1 i COX-2 (Rainsford 2009).



**Rys. 7.** Ibuprofen - wzór strukturalny (<https://tiny.pl/cx2rf>).

Ze względu na nieograniczony dostęp, dużą ilość przyjmowanych dawek, wysoki wskaźnik wydalania (około 70-80%) i stosunkowo dobrą rozpuszczalność w wodzie ( $21 \text{ mg L}^{-1}$ ) IBU jest jednym z farmaceutyków częściej stwierdzanych w ekosystemach wodnych (Parolini 2020).

IBU ma stosunkowo wysoką mobilność w środowisku naturalnym, ale niższą trwałość w porównaniu z innymi farmaceutykami (Buser i in. 1999). Yamamoto i in. (2009) wykazali, że półokres trwania IBU w środowisku wodnym, w zależności od panujących warunków, może się mieścić w szerokim zakresie od 19 do 414 dni. IBU został wykryty w umiarkowanych lub wysokich stężeniach zarówno w ściekach z oczyszczalni ścieków, jak i w wodach powierzchniowych zarówno w Europie oraz na innych kontynentach (Tab. 1) (Metcalf i in. 2004, Santos i in. 2010, Rzymski i in. 2017).

### **6.3. Metody analizy statystycznej i graficznej prezentacji wyników.**

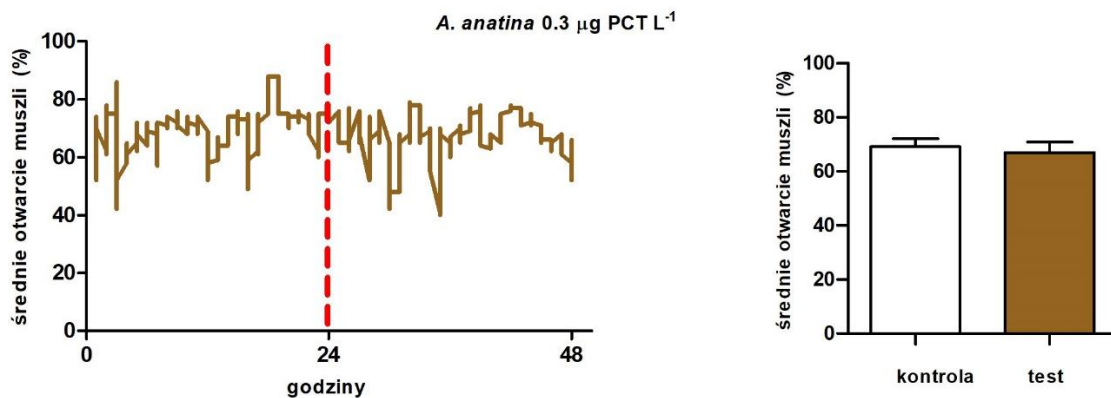
Analiza statystyczna zebranych danych i graficzna prezentacja wyników została przeprowadzona przy wykorzystaniu programów: STATISTICA (TIBCO), GRAPHPAD 8 (Prism). W przypadku testów 24 godzinnych, pierwszym etapem analizy danych było sprawdzenie normalności rozkładu danych w populacji. Jeśli dane spełniały warunek rozkładu normalnego statystyczną istotność różnic pomiędzy grupami danych porównywano za pomocą testów parametrycznych (test t-studenta dla prób zależnych). W przypadku niespełnienia warunku normalności do porównania stosowano nieparametryczny test par Wilcoxon. W badaniach subchronicznego narażenia małży na farmaceutyki (testy 5 dniowe), okres kontrolny z poszczególnymi dniami eksperymentu porównywano za pomocą testu Dunna.

## 6.4. Reakcja behawioralna małży na paracetamol

### 6.4.1. Reakcje behawioralne małży *Anodonta anatina* na wybrane stężenia paracetamolu

#### 6.4.1.1. Reakcja behawioralna *A. anatina* na paracetamol w stężeniu $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$

Najniższe stężenie PCM, dla którego testowano reakcję szczeżui pospolitej wynosiło  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Było to stężenie nawiązujące do maksymalnych koncentracji tego farmaceutyku stwierdzanych w wodach powierzchniowych.



**Rys. 8.** Reakcja małży *A. anatina* na aplikację paracetamolu w stężeniu  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (t-test,  $p > 0,05$ )

Aplikacja PCM w stężeniu  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  nie wywołała zauważalnej reakcji behawioralnej testowanego gatunku małży. Średnie otwarcie skorup populacji testowej obniżyło się na nieco ponad 40% po około 2 godzinach od aplikacji farmaceutyku, ale było to załamanie aktywności krótkotrwałe i następnie otwarcie muszli ponownie oscylowało wokół średniej dla całego okresu testowego (Rys. 8). Po kolejnej godzinie średnie otwarcie skorup małży ponownie spadło na krótko do poziomu 40%. Krótkotrwałe obniżenie aktywności filtracyjnej (średnie otwarcie skorup w zakresie 40-50%) stwierdzono także w okresie kontrolnym poprzedzającym zadanie paracetamolu (Rys. 8). Obniżenia wartości średniej wynikały z przechodzenia pojedynczych osobników w okres spoczynkowy. Średnie otwarcie skorup małży w okresie kontrolnym, kiedy małże nie były narażone na farmaceutyk, było zbliżone do okresu testowego (Rys. 8, Tab. 2).

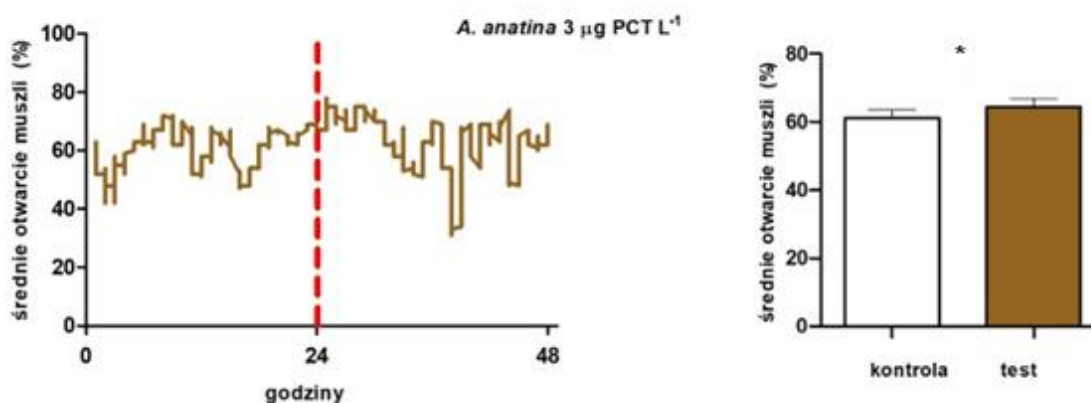
**Tabela 2.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu paracetamolu w stężeniu  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	spoczynek %
kontrola	70,5	0	100	16,8	2,3
test	68,2	0	102	18,4	2,9

Analiza statystyczna (t-test) nie wykazała statystycznie istotnych różnic w otwarciu skorup i aktywności filtracyjnej w okresie kontrolnym w stosunku do okresu po zadaniu farmaceutyku. Podobny był także średni czas, kiedy małże pozostawały w spoczynku redukując swoją aktywność (Tab. 2).

#### 6.4.1.2. Reakcja behawioralna *A. anatina* na paracetamol w stężeniu $3 \mu\text{g L}^{-1}$

Kolejnym stężeniem PCM, które analizowano pod kątem wpływu na behawior filtracyjny małży była koncentracja dziesięciokrotnie wyższa i wynosiła  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Rys. 9.** Reakcja małży *A. anatina* na aplikację paracetamolu w stężeniu  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test, \*  $p < 0,05$ )

Podanie PCM w ilości  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , podobnie jak w przypadku stężenia dziesięciokrotnie niższego, nie wywołało zauważalnej reakcji stresowej u małży (Rys. 9). W przeciągu pierwszych godzin po aplikacji substancji średnie otwarcie skorup populacji testowej wzrosło

o około 10% i stan taki utrzymywał się przez około 2 godziny. Potem nastąpił stopniowy spadek średniej aktywności małży, a na przełomie 13 i 14 godziny eksperymentu odnotowano minimalne rozwarcie skorup – nieznacznie przekraczające 30%. Stan ten trwał krótko i średnie otwarcie skorup ponownie wzrosło do poziomu ponad 60% (Rys. 9). Stan ten utrzymywał się do końca eksperymentu. Porównując średnie rozwarcie skorup w okresie kontrolnym i testowym możemy zauważyć, nieznaczny wzrost średniej (Rys. 9, Tab. 3). Analiza statystyczna (test Wilcoxon) wykazała istotną różnicę w otwarciu skorup małży w porównywanych okresach

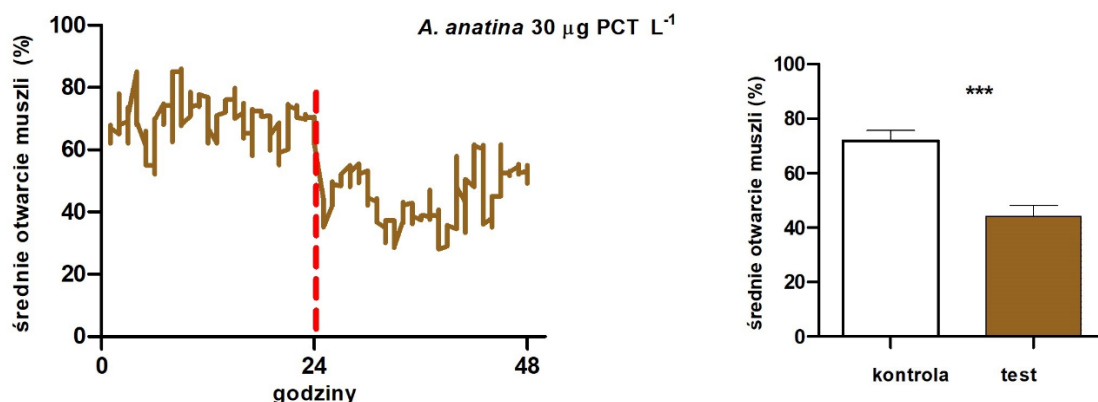
**Tabela 3.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu paracetamolu w stężeniu 3 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	60,8	0	101	18,2	1,6
test	62,6	0	98	20,1	3,2

Zarówno w okresie kontrolnym jak i w czasie testu wszystkie osobniki małży filtrowały z dużą intensywnością (otwarcie skorup zbliżone do maksymalnego) oraz okresowo przechodziły w stan spoczynku. Warto odnotować, że udział procentowy czasu spoczynku był dwukrotnie dłuższy (choć nadal krótki) w porównaniu do kontroli, kiedy małże nie były poddane wpływowi paracetamolu (Tab. 3).

### 6.4.1.3. Reakcja behawioralna *A. anatina* na paracetamol w stężeniu $30 \mu\text{g L}^{-1}$

W kolejnym badaniu analizowano wpływ PCM w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  - stukrotnie wyższym niż koncentrację uznaną za reprezentatywną dla ekosystemów wodnych zanieczyszczonych tą substancją.



**Rys. 10.** Reakcja małży *A. anatina* na aplikację paracetamolu w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \*\*\*  $p < 0,001$ )

W okresie kontrolnym, kiedy małże nie były poddane oddziaływaniu farmaceutyka średnie otwarcie skorup małży wynosiło nieco ponad 70%, fluktuując pomiędzy 50% a 85%. Aplikacja PCM w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  spowodowała gwałtowne ograniczenie aktywności filtracyjnej. Już w ciągu 30 minut po aplikacji średnie otwarcie skorup spadło do około 35% (Rys. 10). Po około godzinie od aplikacji średnie otwarcie skorup wzrosło do poziomu 50-55%, pomimo że 2 osobniki pozostawały cały czas zamknięte. Po kolejnych 3 godzinach średnie otwarcie skorup spadło znacząco osiągając minimalnie wartość 30% (Rys. 10). Od około 15 godziny po aplikacji średnie otwarcie skorup stopniowo wzrastało charakteryzując się dużymi fluktuacjami w krótkich interwałach czasu. W ciągu całego czasu testu maksymalne średnie otwarcie muszli było niższe niż maksymalne średnie otwarcie w trakcie okresu kontrolnego (Rys. 10, Tab. 4).

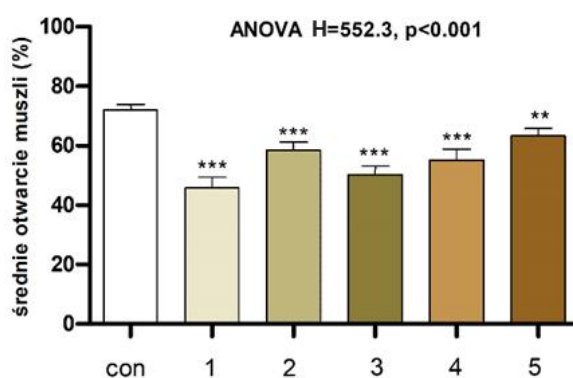
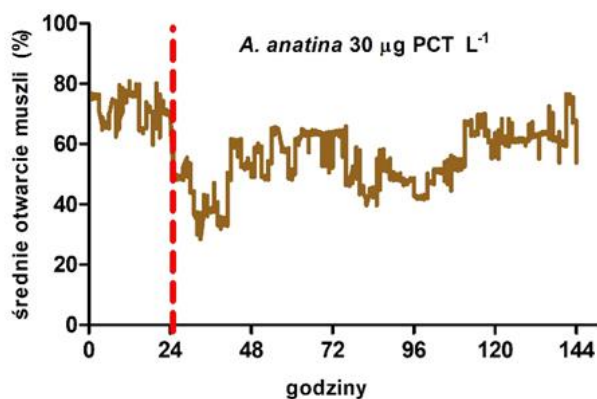
**Tabela 4.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu PCM w stężeniu 30 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	73,6	0	102	18,2	2,6
test	43,8	0	86	25,8	16,9

Porównując średnie otwarcie muszli w całym okresie kontrolnym z testem zauważamy istotną redukcję. Analiza statystyczna wykazała, że otwarcie skorup małży w okresie, kiedy były narażone na oddziaływanie PCM w dawce 30 µg L<sup>-1</sup> było istotnie statystycznie niższe niż otwarcie skorup w okresie kontrolnym (Wilcoxon test,  $p < 0,001$ ). Czas, kiedy małże miały muszle zamknięte w okresie testu był ponad sześciokrotnie dłuższy w porównaniu do kontroli (Tab. 4).

Dla najwyższego spośród badanych stężeń PCM (30 µg L<sup>-1</sup>) przeprowadzono także obserwację długotrwałych pięciodniowych efektów behawioralnych. Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że negatywne efekty oddziaływania PCM na małże utrzymują się przez długi czas. W ciągu pięciu dób po aplikacji substancji odnotowano spadek aktywności filtracyjnej. Najsilniejszy efekt wystąpił w pierwszej dobie po podaniu PCM. Podobnie jak w eksperymencie z narażeniem 24 godzinnym, małże gwałtownie zareagowały na obecność PCM. Minimalne średnie otwarcie skorup muszli (poniżej 30%) stwierdzono w połowie pierwszej doby. Pod koniec pierwszej doby po aplikacji średnie otwarcie wzrosło do około 60% i fluktuując w niewielkim zakresie utrzymywało się na takim poziomie przez następną dobę.





**Rys. 11.** Średnie otwarcie skorup populacji małży *A. anatina* w poszczególnych dobach eksperymentu narażenia paracetamol w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . con - okres kontrolny, 1 - 5 dni po aplikacji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (post-hoc test Dunna, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

Następnie średnie otwarcie skorup muszli stopniowo rosło osiągając okresowo w ostatniej dobie eksperymentu wartość ponad 70% (Rys. 11). Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w otwarciu skorup małży w czasie trwania eksperymentu. Test post-hoc Dunna wykazał, że we wszystkich dobach po podaniu PCM otwarcie skorup małży było statystycznie istotnie niższe niż w okresie kontrolnym.

**Tabela 5.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym (con) i kolejnych dniach (1-5) po podaniu paracetamolu w stężeniu 30 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%. SD - odchylenie standardowe.

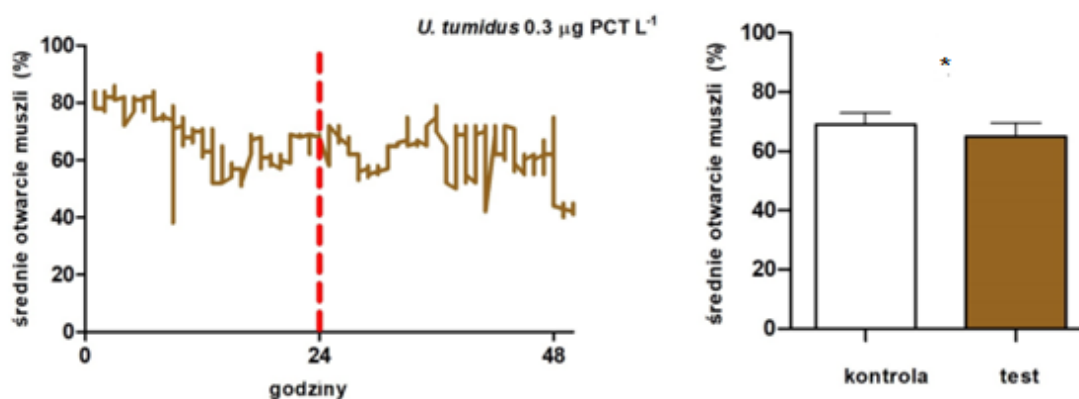
	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
<b>con</b>	71,5	0	102	14,2	3,5
<b>1</b>	44,4	0	88	25,6	22,6
<b>2</b>	57,8	0	98	15,1	9,2
<b>3</b>	50,6	0	100	16,3	11,4
<b>4</b>	53,9	0	92	18,4	9,6
<b>5</b>	60,2	0	97	11,8	8,2

W ciągu całego testu, kiedy małże były narażone na oddziaływanie PCM stwierdzono dłuższy czas, kiedy małże całkowicie redukowały aktywność filtracyjną, a ich skorupy pozostawały zamknięte (Tab. 5).

## 6.4.2. Reakcje behawioralne małży *Unio tumidus* na wybrane stężenia paracetamolu

### 6.4.2.1. Reakcja behawioralna *U. tumidus* na paracetamol w stężeniu $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$

Stężenie  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  analizowane pod kątem wpływu na behavior filtracyjny małży było najniższym z testowanych dawek dla *U. tumidus*. Analizowane stężenie nawiązuje do maksymalnych koncentracji tej substancji w wodach powierzchniowych.



**Rys. 12.** Reakcja małży *U. tumidus* na aplikację paracetamolu w stężeniu  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test, \*  $p < 0,05$ )

Dodanie farmaceutyku w stężeniu  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  początkowo nie spowodowało zauważalnej reakcji behawioralnej u małży. Największe spadki średniego otwarcia muszli u testowanej populacji, były zauważalne w 36 godzinie od aplikacji PCM. Wartości oscylowały w okolicy 50% a około 40 godziny chwilowe załamanie aktywności osiągnęło wartość 42%. Następnie średnie otwarcie muszli ponownie wzrastało. Najniższy spadek aktywności obserwowano pod koniec trwania badania, kiedy to średnie otwarcie skorup osiągnęło wartość 40% (Rys. 12). Na początku trwania okresu kontrolnego średnia aktywność filtracyjna małży była najwyższa i wahała się od 75% do 87%, później w 12 godzinie nastąpił nagły i krótkotrwały spadek aktywności w populacji, wtedy to średnie otwarcie muszli wynosiło 38%. Po tym spadku aktywność filtracyjna małży nie wróciła już do początkowej wartości z okresu kontrolnego (Rys. 12). Średnie otwarcie skorup małży w okresie kontrolnym, kiedy małże nie były narażone na farmaceutyk było wyższe, jednak zbliżone do okresu testowego, w którym wyniosło ponad 64 % (Rys. 12, Tab. 6).

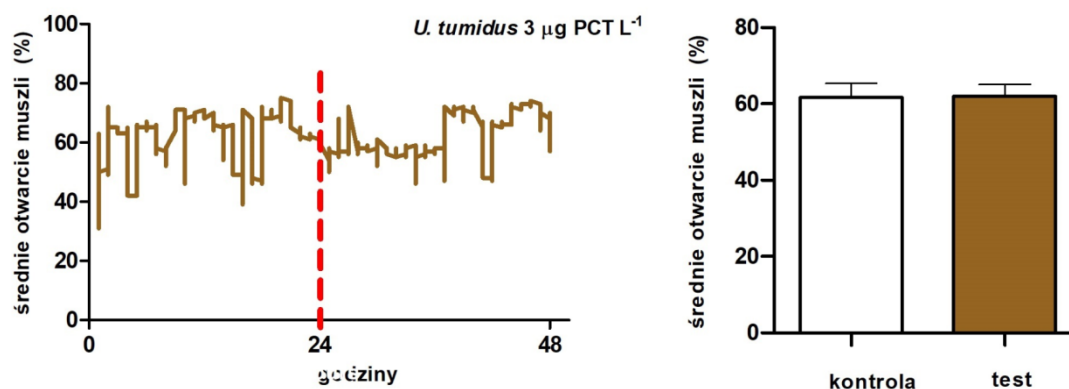
**Tabela 6.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu paracetamolu w stężeniu  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	Spoczynek %
kontrola	69,1	0	101	21,3	2,4
test	64,2	0	102	15,2	3,2

Przeprowadzona analiza statystyczna (test Wilcozona) wykazała statystycznie istotne różnice w otwarciu skorup i aktywności filtracyjnej małży w okresie kontrolnym w stosunku do okresu po aplikacji farmaceutyku. Podobny był także średni czas, w którym osobniki pozostawały w spoczynku redukując swoją aktywność (Tab. 6).

#### 6.4.2.2. Reakcja behawioralna *U. tumidus* na paracetamol w stężeniu $3 \mu\text{g L}^{-1}$

W kolejnym badaniu stężenie PCM było dziesięciokrotnie wyższe niż w poprzednim. Jego koncentracja wynosiła  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Rys. 13.** Reakcja małży *U. tumidus* na aplikację paracetamolu w stężeniu  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąż - błąd standardowy (Wilcoxon test,  $p > 0,05$ )

Aplikacja farmaceutyku w ilości  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  nie wpłynęła znacząco na aktywność filtracyjną testowanej populacji małży. Średnie otwarcie muszli, podobnie jak w przypadku stężenia  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$  nie spowodowało zauważalnej reakcji stresowej u małży, jednak średnie otwarcie

skorup tuż po dodaniu PCM spadło w porównaniu do końcowego okresu kontrolnego. Następnie parę godzin po aplikacji farmaceutyku wystąpiły dwa momenty, w których średnie otwarcie muszli z 55% wzrosło do 65% i 70%. W trakcie badania zaobserwowano trzy spadki aktywności filtracyjnej małży do poziomu 45%. W drugiej połowie eksperymentu aktywność wzrosła i wahała się na poziomie 70%, następnie pod koniec badania spadła do 57% (Rys. 13). W trakcie trwania całego doświadczenia średnie otwarcie skorup wynosiło prawie 62% i było nieznacznie wyższe od średniej z okresu kontrolnego (Rys. 13, Tab. 7).

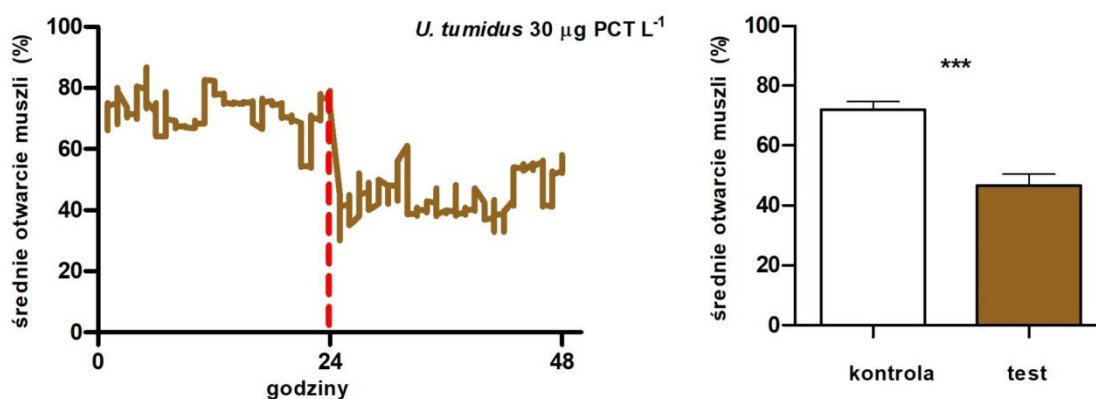
**Tabela 7.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu paracetamolu w stężeniu 3  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	61,2	0	100	20,3	5,2
test	61,9	1	103	19,8	2,9

W okresie kontrolnym aktywność filtracyjna małży była niższa w porównaniu do poprzedniego stężenia. Osobniki okresowo przechodziły w stan spoczynku. Udział procentowy czasu spoczynku był prawie dwukrotnie dłuższy w porównaniu do kontroli, kiedy małże nie były poddane wpływowi farmaceutyku (Tab. 7).

### 6.4.2.3. Reakcja behawioralna *U. tumidus* na paracetamol w stężeniu 30 µg L<sup>-1</sup>

W kolejnym badaniu analizowano wpływ PCM w stężeniu 30 µg L<sup>-1</sup>, które było najwyższą testowaną dawką.



**Rys. 14.** Reakcja małży *U. tumidus* na aplikację paracetamolu w stężeniu 30 µg L<sup>-1</sup>.

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \*\*\* p < 0,001)

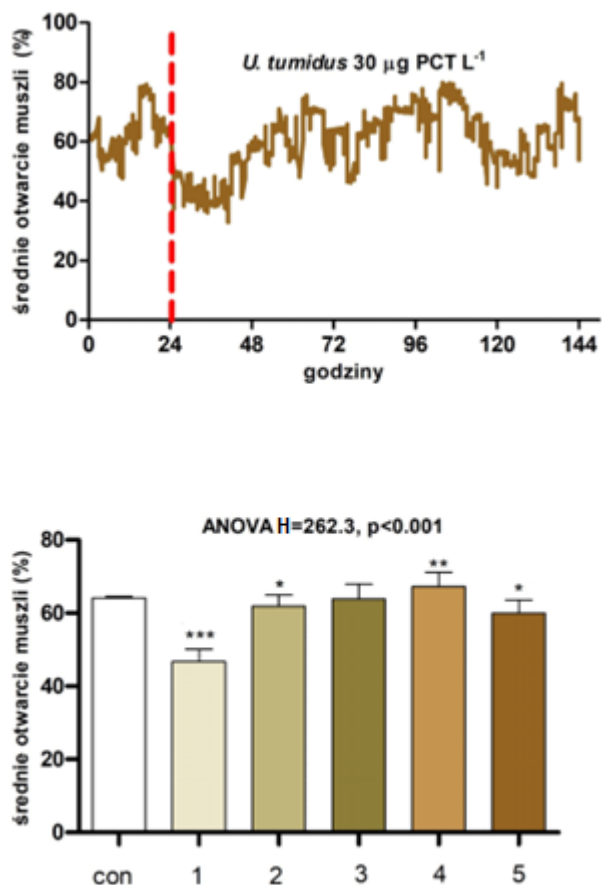
W okresie kontrolnym, w którym osobniki nie były poddane działaniu PCM średnie otwarcie skorup muszli wyniosło 70%. Najwyższa aktywność filtracyjna była po 6 godzinach od aplikacji substancji, a jej wartość wyniosła niecałe 90% natomiast najniższa aktywność pojawiła się po 20 godzinach, wtedy średnie otwarcie muszli spadło do 50%. Aplikacja PCM w stężeniu 30 µg L<sup>-1</sup> znacząco wpłynęła na aktywność filtracyjną, która z poziomu 75% spadła gwałtownie poniżej 30%. Następnie po około 8 godzinach od aplikacji farmaceutyku średnie otwarcie muszli wzrosło do 60%. Była to najwyższa aktywność filtracyjna małży w trakcie badania z tym stężeniem PCM. W 32 godzinie po aplikacji substancji średnie otwarcie skorup spadło znacząco osiągając wartości na poziomie 40%. Po tym czasie, po około 40 godzinach od aplikacji PCM średnie otwarcie muszli wzrosło do ponad 50% i utrzymywało się tak przez około 4 godziny. W końcowym etapie doświadczenia aktywność filtracyjna małży zmalała, po czym na sam koniec zaczęła wzrastać (Rys. 14). W ciągu całego badania średnie otwarcie muszli wyniosło 43% i było niższe niż średnie otwarcie skorup w trakcie okresu kontrolnego (Rys. 14, Tab. 8).

**Tabela 8.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu paracetamolu w stężeniu 30 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	72,4	0	102	10,7	1,6
test	43,8	0	89	21,9	15,2

Średnie otwarcie skorup w całym okresie kontrolnym było znacząco wyższe, w porównaniu z testem, w którym zauważalna była istotna redukcja aktywności filtracyjnej. Z analizy statystycznej wynika, że otwarcie muszli małży w okresie, w którym były narażone na oddziaływanie PCM w dawce 30 µg L<sup>-1</sup> było istotnie statystycznie niższe, niż otwarcie skorup w okresie kontrolnym (test Wilcoxona,  $p < 0,001$ ). Czas, kiedy małże miały muszle zamknięte w okresie testu był prawie dziesięciokrotnie dłuższy w porównaniu z okresem kontrolnym (Tab. 8).

Dla najwyższego spośród badanych stężeń PCM (30 µg L<sup>-1</sup>) dla gatunku *U. tumidus* również przeprowadzono obserwację pięciodobowych efektów behawioralnych. Największy spadek aktywności filtracyjnej nastąpił w pierwszej dobie po aplikacji substancji. Minimalne średnie otwarcie muszli wyniosło wtedy 30%. Pod koniec pierwszej doby po aplikacji średnie otwarcie wzrosło do 60%. Przez następną dobę aktywność filtracyjna wzrastała i osiągnęła najwyższą wartość, która była na poziomie 75%. Początek 72 godziny charakteryzował się spadkiem średniego otwarcia muszli, po czym powoli następował wzrost aktywności aż do 96 godziny. W połowie czwartej doby aktywność małży zaczęła spadać, jednak właśnie tego dnia nastąpiło najwyższe średnie otwarcie muszli w przeciągu wszystkich pięciu dni trwania badania. Pod koniec ostatniej doby aktywność filtracyjna zaczęła wzrastać, jednak w momencie zakończenia badania, w 144 godzinie spadła do poziomu 50% (Rys. 15).



**Rys. 15.** Średnie otwarcie skorup populacji małży *U. tumidus* w poszczególnych dobach eksperymentu narażenia paracetamol w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . con - okres kontrolny, 1 - 5 dni po aplikacji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (post-hoc test Dunna, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

Wykonana analiza statystyczna wykazała istotne różnice w otwarciu skorup małży w czasie trwania eksperymentu. Test post-hoc Dunna wykazał, że w pierwszej, drugiej i piątej dobie po aplikacji PCM otwarcie muszli małży było statystycznie istotnie niższe niż w okresie kontrolnym. Natomiast w dobie czwartej eksperymentu było istotnie wyższe (Rys. 15).



**Tabela 9.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym (con) i kolejnych dniach (1-5) po podaniu paracetamolu w stężeniu 30 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%. SD - odchylenie standardowe.

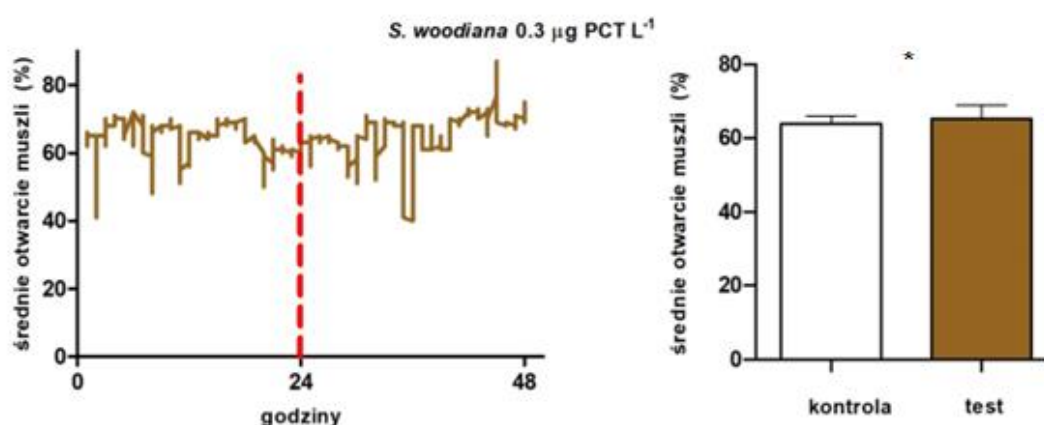
	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek (%)</b>
<b>con</b>	63,5	0	103	5,8	0,6
<b>1</b>	46	0	85	22,5	19,2
<b>2</b>	59,8	0	102	16,5	7,5
<b>3</b>	61,1	0	102	25,1	8,7
<b>4</b>	65,9	0	100	20,3	7,9
<b>5</b>	58,2	0	98	21,3	9,2

W ciągu całego testu, kiedy małże były narażone na oddziaływanie PCM stwierdzono dłuższy czas, kiedy małże całkowicie redukowały aktywność filtracyjną, a ich skorupy pozostawały zamknięte (Tab. 9).

### 6.4.3. Reakcje behawioralne małży *Sinanodonta woodiana* na wybrane stężenia paracetamolu

#### 6.4.3.1. Reakcja behawioralna *S. woodiana* na paracetamol w stężeniu $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$

Najniższym stężeniem PCM, na którym testowano reakcję *S. woodiana* było  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Dawka ta nawiązywała do maksymalnych koncentracji farmaceutyku stwierdzanych w wodach powierzchniowych.



**Rys. 16.** Reakcja małży *S. woodiana* na aplikację paracetamolu w stężeniu  $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test, \*  $p < 0,05$ )

Aplikacja farmaceutyku w stężeniu  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  nie wywołała znaczącej reakcji behawioralnej u małży. Po 2 godzinach od aplikacji PCM średnie otwarcie muszli testowanej populacji spadło do 55%. Ograniczenie aktywności było jednak krótkotrwałe, a następnie wzrosło do 60% i na tym poziomie pozostawało przez kilka kolejnych godzin. Po tym czasie, średnie otwarcie skorup małży krótkotrwałe spadło do poziomu 52%. Następnie nieznacznie wzrosło, po czym osiągnęło wartość 50%. Mniej więcej w połowie czasu trwania doświadczenia z zaaplikowaną substancją nastąpił spadek aktywności filtracyjnej małży do 40%, który trwał przez 2 godziny. Krótkotrwałe obniżenie aktywności filtracyjnej zauważono także 3 godziny po rozpoczęciu badania okresu kontrolnego, w którym średnie otwarcie muszli wyniosło 40%. Był to najniższy spadek aktywności filtracyjnej dla badania kontrolnego (Rys. 16). Spadek średniej wartości był spowodowany przechodzeniem pojedynczych osobników w okres spoczynkowy. Średnie

otwarcie muszli dla populacji w okresie kontrolnym, kiedy małże nie były narażone na działanie PCM, przypominało wartości z okresu testowego (Rys. 16, Tab. 10).

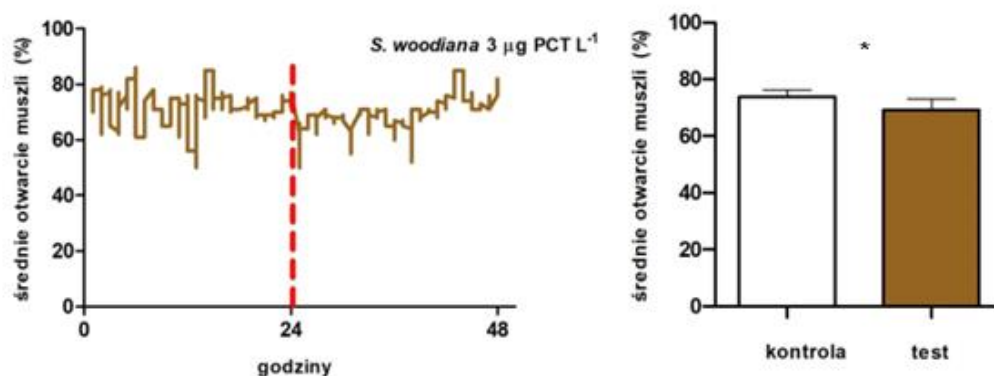
**Tabela 10.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu paracetamolu w stężeniu 0,3 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	63,5	5	107	11,6	0,9
test	64,8	2	103	16,2	1,5

Pomimo tego, analiza statystyczna (test Wilcoxona) wykazała statystycznie istotne różnice w otwarciu muszli małży i aktywności filtracyjnej w okresie kontrolnym w stosunku do okresu po aplikacji substancji. Średni czas, kiedy małże pozostawały w spoczynku, drastycznie redukując swoją aktywność, był ponad dwukrotnie dłuższy w teście w porównaniu do okresu kontrolnego (Tab. 10).

### 6.4.3.2. Reakcja behawioralna *S. woodiana* na paracetamol w stężeniu $3 \mu\text{g L}^{-1}$

Kolejnym stężeniem PCM, które analizowano pod kątem wpływu na behavior filtracyjny małży była koncentracja dziesięciokrotnie wyższa, która wynosiła  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Rys. 17.** Reakcja małży *S. woodiana* na aplikację paracetamolu w stężeniu  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test, \*  $p < 0,05$ )

Aplikacja PCM w dawce  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  spowodowała natychmiastowy spadek aktywności filtracyjnej populacji małży. Średnie otwarcie muszli tuż po dodaniu substancji spadło z ponad 75% do 50%. Była to najniższa wartość średniego otwarcia skorup od momentu dodania farmaceutyku. Spadek był jednak krótkotrwały, po czym wartość wzrosła do prawie 70% i przez dłuższy czas utrzymywała się na tym poziomie. Największe średnie otwarcie skorup muszli nastąpiło w 40 godzinie badania, wyniosło 83% i utrzymywało się przez 2 godziny, po czym aktywność filtracyjna małży zmalała. Następnie w 48 godzinie badania nieznacznie wzrosła powyżej 80% (Rys. 17). Porównując otwarcie muszli w okresie kontrolnym i teście możemy zauważyć, że średnie otwarcie skorup było niższe w części badania z aplikacją farmaceutyku (Rys. 17, Tab. 11).

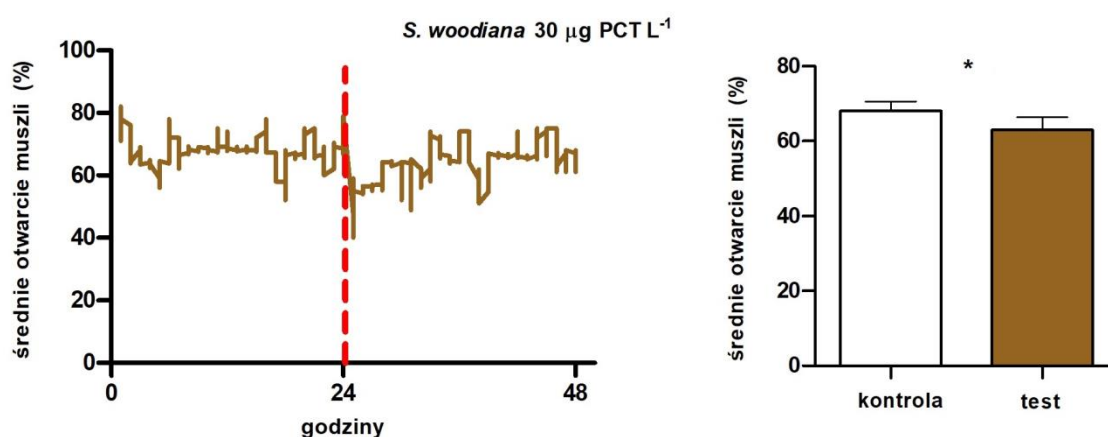
**Tabela 11.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu paracetamolu w stężeniu  $3 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	spoczynek %
kontrola	75,5	0	106	7,6	0,2
test	71,1	2	100	12,1	2,1

W okresie kontrolnym jak i w czasie testu wszystkie osobniki małży filtrowały z dużą intensywnością oraz okresowo przechodziły w stan spoczynku. Należy stwierdzić, że udział procentowy czasu spoczynku w teście był ponad dziesięciokrotnie dłuższy w porównaniu do kontroli, kiedy to osobniki nie były poddane wpływowi substancji (Tab. 11). Analiza statystyczna (test Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) wykazała statystycznie istotne różnice w otwarciu muszli małży i aktywności filtracyjnej w okresie kontrolnym w stosunku do okresu po aplikacji substancji.

#### 6.4.3.3. Reakcja behawioralna *S. woodiana* na paracetamol w stężeniu $30 \mu\text{g L}^{-1}$

W kolejnym badaniu analizowano wpływ PCM w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Rys. 18.** Reakcja małży *S. woodiana* na aplikację paracetamolu w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąż - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \*  $p < 0,05$ )

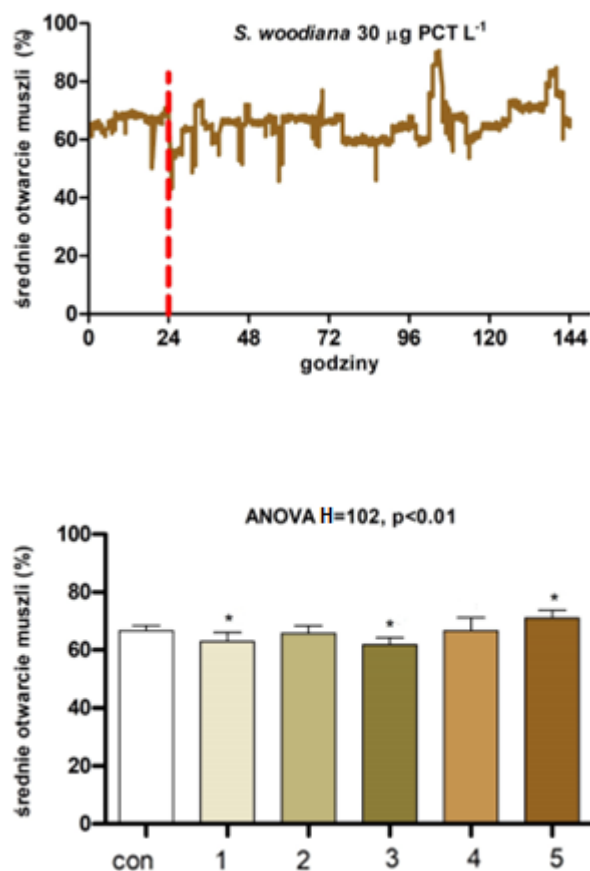
W okresie kontrolnym, kiedy małże nie były poddane wpływowi PCM średnie otwarcie skorup małży wynosiło niecałe 70%. Najwyższa odnotowana wartość średniej aktywności filtracyjnej małży osiągnęła wartość 81%, a najniższa 50%. Aplikacja PCM w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  spowodowała gwałtowne ograniczenie aktywności małży. Już w ciągu 30 minut po aplikacji średnie otwarcie muszli spadło z 68% do 40% (Rys. 18). Po około godzinie od dodania substancji, średnie otwarcie skorup wzrosło do poziomu 55% i na tym poziomie utrzymywało się przez 3 godziny, po czym wzrosło do 65%. Po tym czasie w niewielkich odstępach nastąpiły dwa spadki aktywności filtracyjnej, pierwszy do 50% a kolejny do 48%. Od około 13 godziny po aplikacji PCM średnie otwarcie skorup stopniowo wzrastało i zmniejszało się. Następnie w połowie badania aktywność wzrosła. W drugiej części eksperymentu z paracetamolem, około 38 godziny, sytuacja ustabilizowała się i średnie otwarcie skorup u małży wynosiło 65%. Pod koniec badania wzrosło, po czym na sam koniec w 48 godzinie spadło do 59% (Rys. 18). W ciągu całego czasu testu maksymalne średnie otwarcie muszli było wyższe w okresie kontrolnym niż w teście (Rys. 18, Tab. 12).

**Tabela 12.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu paracetamolu w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	67,8	0	102	8,9	1,1
test	62,2	4	106	15,8	4,6

Porównując średnie otwarcie muszli w całym okresie kontrolnym z testem zauważamy istotną redukcję. Analiza statystyczna wykazała, że otwarcie skorup małży w czasie, kiedy były narażone na oddziaływanie PCM w dawce  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  było istotnie statystycznie niższe niż otwarcie skorup w okresie kontrolnym (test Wilcozona,  $p < 0,05$ ). Czas, w którym małże miały muszle zamknięte w okresie testu był ponad 4 krotnie dłuższy w porównaniu do kontroli (Tab. 12).

Dla najwyższego spośród badanych stężeń PCM ( $30 \mu\text{g L}^{-1}$ ) przeprowadzono także obserwację długotrwałych efektów behawioralnych. Badanie trwało 5 dób. Najsilniejszy spadek aktywności filtracyjnej nastąpił tuż po dodaniu farmaceutyku. Wtedy średnie otwarcie muszli u *S. woodiana* spadło do 42% i było ono najmniejszym średnim otwarciem skorup w przeciągu trwania całego eksperymentu. Najwyższa aktywność filtracyjna nastąpiła w czwartej dobie po aplikacji PCM i wyniosła aż 90%. Okres kontrolny charakteryzował się bardzo zbliżonymi wartościami średniego otwarcia muszli i wynosił od 60% do 70% z wyjątkiem spadku aktywności filtracyjnej w populacji w około 20 godzinie do 49% (Rys. 19).



**Rys. 19.** Średnie otwarcie skorup populacji małży *S. woodiana* w poszczególnych dobach eksperymentu narażenia paracetamol w stężeniu  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ . con - okres kontrolny, 1 - 5 dni po aplikacji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (post-hoc test Dunna, \*  $p < 0,05$ )

Najwyższe średnie otwarcie skorup muszli testowanej populacji małży zaobserwowano w ostatniej dobie eksperymentu i wyniosło 70% (Rys. 19). Analiza statystyczna (ANOVA  $p < 0,01$ ) wykazała istotne różnice w otwarciu skorup małży w czasie trwania eksperymentu. Test post-

hoc Dunna wykazał, że dobach 1, 3 oraz 5 badania średnie otwarcie skorup muszli testowanej populacji *S. woodiana* było statystycznie odmienne.

**Tabela 13.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym (con) i kolejnych dniach (1-5) po podaniu paracetamolu w stężeniu 30 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%. SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek (%)</b>
<b>con</b>	65,3	2	111	3,2	0,2
<b>1</b>	62,1	2	102	18,5	4,8
<b>2</b>	63,8	5	100	9,6	2,5
<b>3</b>	60,5	4	106	5,2	3,5
<b>4</b>	65,8	4	104	20,3	2,8
<b>5</b>	68,1	4	110	14,2	3,2

W ciągu całego testu, kiedy małże były narażone na oddziaływanie PCM stwierdzono dłuższy czas, w którym osobniki całkowicie redukowały aktywność filtracyjną, a ich skorupy pozostawały zamknięte (Tab. 13).

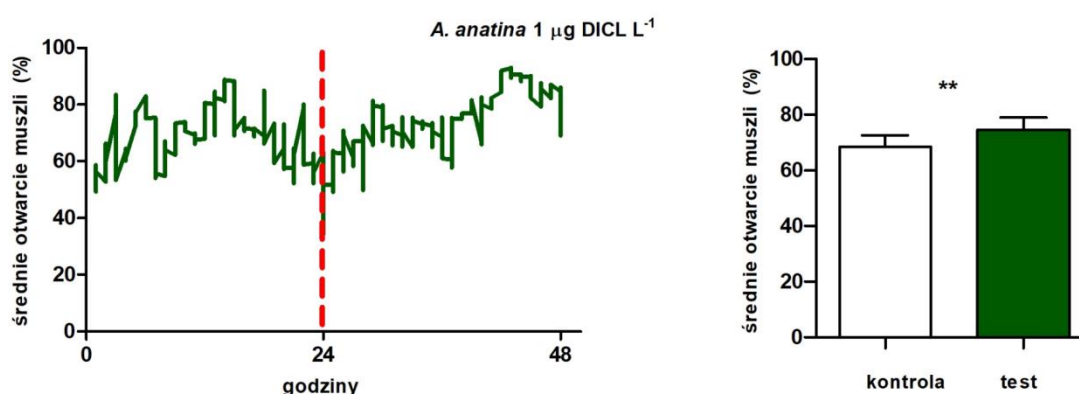


## 6.5. Reakcja behawioralna małży na diklofenak

### 6.5.1. Reakcje behawioralne małży *Anodonta anatina* na wybrane stężenia diklofenaku

#### 6.5.1.1. Reakcja behawioralna *A. anatina* na diklofenak w stężeniu $1 \mu\text{g L}^{-1}$

Najniższym stężeniem DCF, na którym testowano reakcję szczeżui pospolitej było  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Zastosowana dawka nawiązywała do maksymalnych koncentracji tego farmaceutyku notowanych w wodach powierzchniowych.



**Rys. 20.** Reakcja małży *A. anatina* na aplikację diklofenaku w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąż - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \*\*  $p < 0,01$ )

Aplikacja DCF w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  nie wpłynęła znacząco na zachowanie filtracyjne badanej populacji. Co prawda dodanie farmaceutyku wywołało natychmiastową reakcję małży, lecz średnie otwarcie muszli populacji małży spadło zaledwie o 10% (Rys. 20). Następnie otwarcia skorup małży ponownie oscylowały w okolicy średniej dla całego okresu testowego. W drugiej połowie badania, po dodaniu DCF, średnie otwarcie muszli małży stopniowo rosnąc przekraczając nawet 90%, co było wartością wyższą od maksimum dla okresu kontrolnego (Rys. 20). Średnie otwarcie muszli w okresie kontrolnym, kiedy małże nie były narażone na farmaceutyk było niższe od okresu testowego (Rys. 20, Tab. 14). Przeprowadzona analiza statystyczna (test Wilcoxon) wykazała statystycznie istotne różnice w średnim otwarciu muszli i aktywności filtracyjnej małży w okresie kontrolnym, w stosunku do okresu po aplikacji DCF.

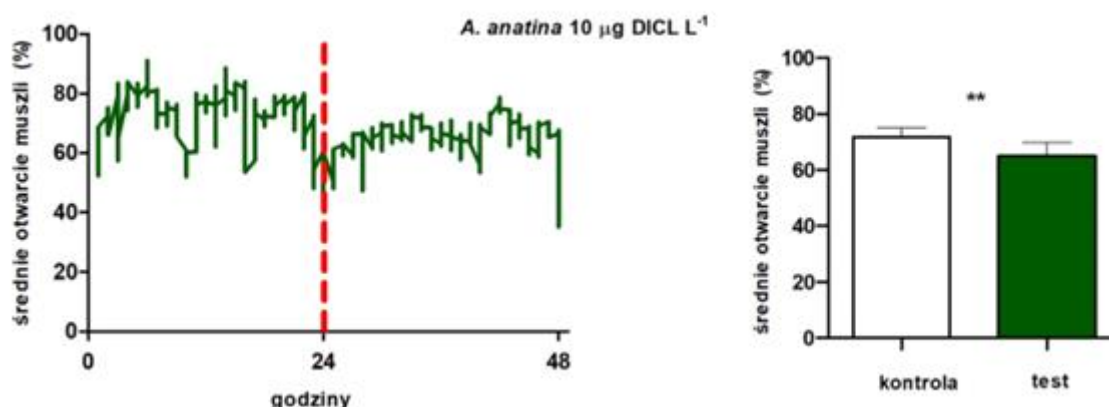
**Tabela 14.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu diklofenaku w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	spoczynek %
kontrola	68,5	0	103	20,6	1,5
test	74,8	0	100	18,5	1,7

Czas, kiedy małże pozostawały w spoczynku redukując swoją aktywność był podobny (Tab. 14).

#### 6.5.1.2. Reakcja behawioralna *A. anatina* na diklofenak w stężeniu $10 \mu\text{g L}^{-1}$

Kolejną testowaną dawką DCF analizowaną pod kątem wpływu na behawior filtracyjny małży była koncentracja dziesięciokrotnie wyższa, która wynosiła  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Rys. 21.** Reakcja małży *A. anatina* na aplikację diklofenaku w stężeniu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \*\*  $p < 0,01$ )

Aplikacja farmaceutyku w ilości  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  wywołała reakcję stresową u małży powodując obniżenie aktywności filtracyjnej w populacji. Pierwsze godziny po aplikacji DCF charakteryzowały się spadkiem średniego otwarcia muszli. Stan ten utrzymywał się przez cały okres badania po aplikacji substancji. W 6 oraz 24 godzinie po aplikacji DCF zaobserwowano znaczący (45 i 35% odpowiednio) choć krótkotrwały spadek rozwarcia skorup i aktywności

filtracyjnej małży (Rys. 21). Okres kontrolny charakteryzował się wyższym średnim otwarciem muszli w porównaniu z testem (Rys. 21, Tab. 15). Różnica pomiędzy okresem kontroli a testem po dodaniu DCF była statystycznie istotna (test Wilcoxon,  $p < 0,01$ ).

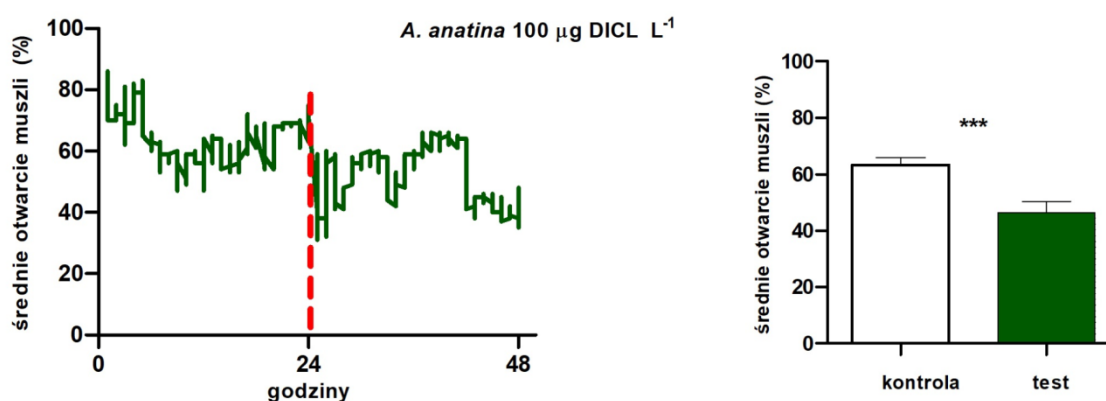
**Tabela 15.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu diklofenaku w stężeniu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	spoczynek %
kontrola	73,8	2	110	18,2	0,9
test	64,3	0	101	11,6	4,6

Po dodaniu farmaceutyku udział procentowy czasu spoczynku małży był ponad pięciokrotnie dłuższy w porównaniu do kontroli (Tab. 15).

### 6.5.1.3. Reakcja behawioralna *A. anatina* na diklofenak w stężeniu $100 \mu\text{g L}^{-1}$

W kolejnym badaniu analizowano stężenie  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Była to dawka stukrotnie wyższa od koncentracji występującej naturalnie w ekosystemach wodnych zanieczyszczonych diklofenakiem.



**Rys. 22.** Reakcja małży *A. anatina* na aplikację diklofenaku w stężeniu  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (test Wilcoxon, \*\*\*  $p < 0,001$ )

Początek okresu kontrolnego charakteryzował się wysoką aktywnością filtracyjną małży. Najwyższe średnie otwarcie muszli wystąpiło na samym początku badania i wyniosło prawie 90%. W 8 godzinie okresu kontrolnego aktywność małży zaczęła spadać fluktuując pomiędzy 48% a 72%. Pod koniec tego okresu aktywność wzrosła do 74%. Aplikacja farmaceutyku w stężeniu  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  wywołała natychmiastowy spadek aktywności filtracyjnej małży do 30%, a następnie średnie otwarcie skorup nieznacznie wzrosło, po czym obniżyło się do poziomu, który wystąpił tuż po aplikacji substancji. W pierwszej części badania po aplikacji farmaceutyku średnie otwarcia muszli wahały się w granicach 30% do 60%. W drugiej części aktywność małży wzrosła i przez kilka godzin osiągała wartość 65%. W kolejnych godzinach spadła do 40% i fluktuowała w okolicach tej wartości, aż do zakończenia badania (Rys. 22). Średnie otwarcie muszli małży w okresie, kiedy małże nie były narażone na farmaceutyk było wyższe do okresu testowego (Rys. 22, Tab. 16). Wykonana analiza statystyczna pokazała, że otwarcie skorup małży w okresie, kiedy były poddane wpływowi DCF w dawce  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  było istotnie statystycznie niższe, niż otwarcie skorup w okresie kontrolnym (Wilcoxon test,  $p < 0,001$ ).

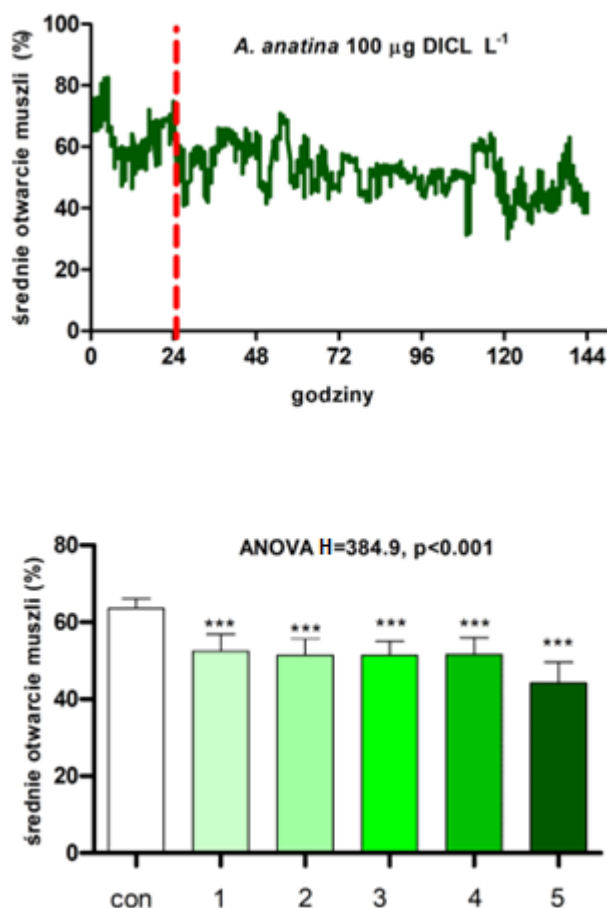
**Tabela 16.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu diklofenaku w stężeniu  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	62,2	2	102	27,6	1,8
test	47,5	0	97	22,8	12,8

Udział procentowy czasu spoczynku w teście z farmaceutykiem był ponad siedmiokrotnie dłuższy w porównaniu do kontroli (Tab. 16).

Dla najwyższego spośród badanych stężeń DCF ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) przeprowadzono także pięciodniowe badania reakcji behawioralnej. Uzyskane wyniki wykazały, że aktywność filtracyjna małży w okresie kontrolnym była wyższa w porównaniu z testem. Najwyższe średnie otwarcie muszli dla tego okresu wystąpiło kilka godzin po rozpoczęciu badania i

wyniosło ponad 80%. Średnie otwarcie muszli w przeciągu pierwszych czterech dób po aplikacji farmaceutyku było do siebie bardzo zbliżone. W ostatniej dobie testu substancja spowodowała największy spadek średniego otwarcia skorup w populacji małży (*Rys. 23*), średnie otwarcie skorup wyniosło 40%. W trakcie całego badania minimalne średnie otwarcie muszli zaobserwowano na początku piątego dnia badania, jego wartość wyniosła 30%.



**Rys. 23.** Średnie otwarcie skorup populacji małży *A. anatina* w poszczególnych dobach eksperymentu narażenia na diklofenak w stężeniu 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . con - okres kontrolny, 1 - 5 dni po aplikacji, słupki - średnia, wąż - błąd standardowy (post-hoc test Dunna, \*\*\* p < 0,001)

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w otwarciu muszli małży w czasie trwania eksperymentu. Test post-hoc Dunna wykazał, że we wszystkich dobach po aplikacji DCF otwarcie skorup małży było statystycznie istotnie niższe niż w okresie kontrolnym.

**Tabela 17.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym (con) i kolejnych dniach (1-5) po podaniu diklofenaku w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

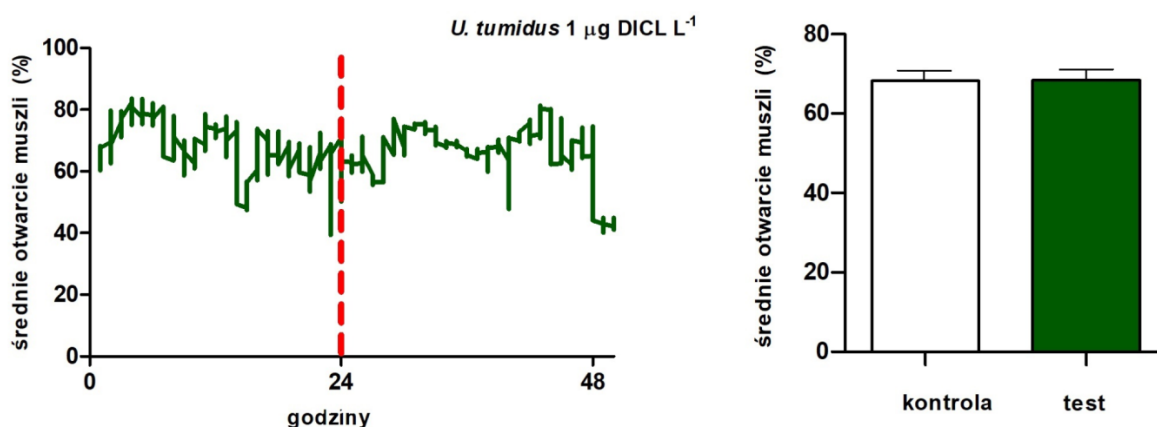
	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek (%)</b>
<b>con</b>	64	2	104	22,2	2,1
<b>1</b>	54	0	95	21,4	9,4
<b>2</b>	50	0	98	20,1	12,2
<b>3</b>	51	0	100	12,6	11,2
<b>4</b>	51	0	99	18,7	10,8
<b>5</b>	42	0	85	11,2	25,6

W ciągu wszystkich dni testu, kiedy małże były narażone na oddziaływanie DCF, odnotowano dłuższy czas całkowitej redukcji aktywności filtracyjnej osobników (Tab. 17).

## 6.5.2. Reakcje behawioralne małży *Unio tumidus* na wybrane stężenia diklofenaku

### 6.5.2.1. Reakcja behawioralna *U. tumidus* na diklofenak w stężeniu $1 \mu\text{g L}^{-1}$

Najniższym stężeniem DCF, na którym testowano reakcję *U. tumidus* było  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Stężenie nawiązywało do maksymalnych koncentracji farmaceutyku w wodach powierzchniowych.



**Rys. 24.** Reakcja małży *U. tumidus* na aplikację diklofenaku w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąż - błąd standardowy (Wilcoxon test,  $p > 0,05$ )

Aplikacja DCF w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  nie wywołała zauważalnej reakcji behawioralnej w populacji. Średnie otwarcie muszli u małży osiągało najwyższe wartości kilka godzin po rozpoczęciu doświadczenia. W kolejnych godzinach aktywność filtracyjna obniżała się, a na godzinę przed aplikacją DCF gwałtownie spadła poniżej 40%. Dodanie substancji nie spowodowało zauważalnej reakcji u małży. Średnie otwarcie muszli oscyloowało w przedziale 55% do 75%. Dopiero w 40 godzinie aktywność filtracyjna małży spadła poniżej 50%. Spadek był krótkotrwały i w kolejnych minutach średnie otwarcie skorup wzrastało. Na zakończenie badania, w 48 godzinie aktywność filtracyjna spadła do poziomu około 40% (Rys. 24). Średnie otwarcie muszli małży w okresie kontrolnym, kiedy małże nie były narażone na farmaceutyk, było prawie takie samo jak w okresie testowym (Rys. 24, Tab. 18). Analiza statystyczna (test Wilcoxona) nie wykazała statystycznie istotnych różnic w otwarciu muszli i aktywności filtracyjnej w okresie kontrolnym w stosunku do czasu po aplikacji farmaceutyku.

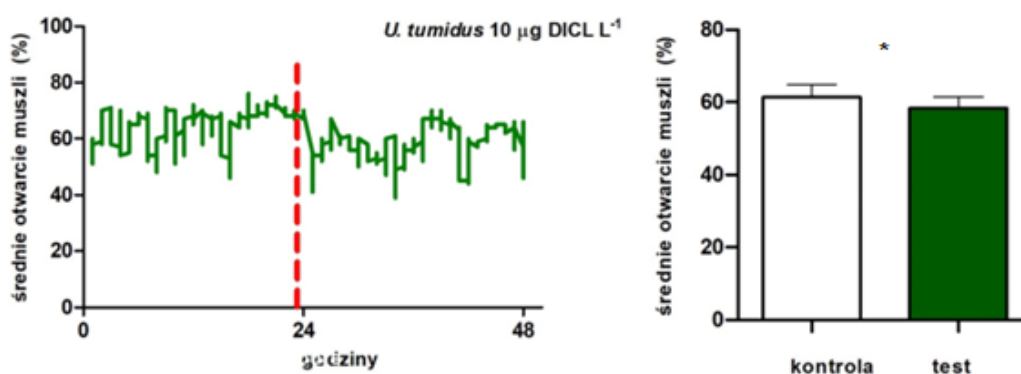
**Tabela 18.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu diklofenaku w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	spoczynek %
kontrola	68,8	4	100	15,6	0,9
test	69,2	0	104	14,9	1,2

Czas, w którym małże pozostawały w spoczynku redukując swoją aktywność zarówno w teście jak i w okresie kontrolnym był zbliżony (Tab. 18).

### 6.5.2.2. Reakcja behawioralna *U. tumidus* na diklofenak w stężeniu $10 \mu\text{g L}^{-1}$

Kolejnym stężeniem DCF, które analizowano pod kątem wpływu na behavior filtracyjny małży była koncentracja dziesięciokrotnie wyższa i wynosiła  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Rys. 25.** Reakcja małży *U. tumidus* na aplikację diklofenaku w stężeniu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test, \*  $p < 0.05$ )

Aplikacja DCF w ilości  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  wywołała nieznaczną reakcję stresową u małży (Rys. 25). Największy spadek aktywności filtracyjnej obserwowano zaraz po dodaniu farmaceutyku, wtedy średnie otwarcie muszli spadło prawie do poziomu 40%. Następnie aktywność filtracyjna wzrosła i otwarcie skorup populacji testowej wahało się w granicach 48% do 68%. Taki stan utrzymywał się aż do 33 godziny badania, kiedy to odnotowano najniższe średnie



otwarcie skorup w trakcie trwania całego doświadczenia. Osiągnęło ono próg 39%. W kolejnych godzinach nastąpił wzrost aktywności filtracyjnej i rozwarcia (Rys. 25). Średnie otwarcie muszli w okresie kontrolnym było nieznacznie wyższe od średniej dla testu (Rys. 25, Tab. 19) i analiza statystyczna (test Wilcoxon) wykazała statystycznie istotną różnicę w otwarciu muszli pomiędzy okresem kontrolnym, a czasem po zadaniu farmaceutyku.

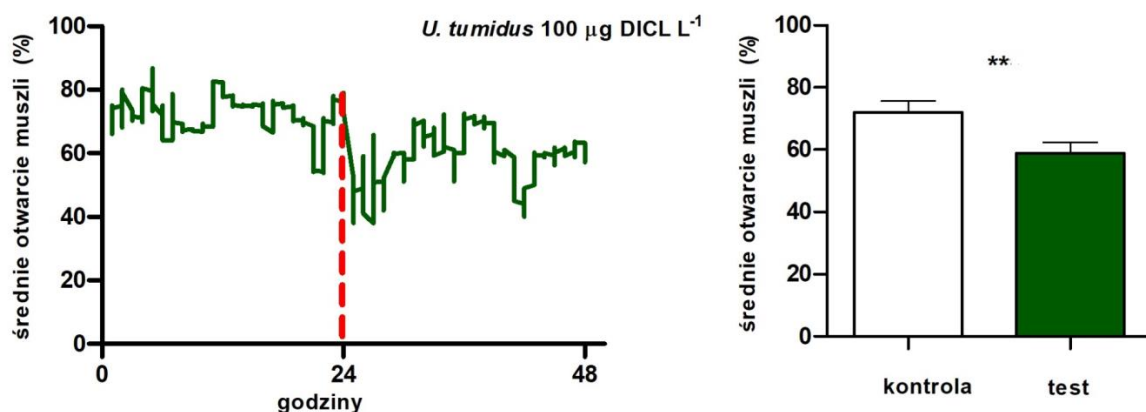
**Tabela 19.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu DCF w stężeniu 10 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	61,2	2	100	18,6	1,2
test	59,4	2	101	11,2	1,7

W okresie kontrolnym oraz w czasie testu wszystkie osobniki filtrowały wodę z dużą intensywnością, a także na krótko przechodziły w stan spoczynku. Udział procentowy czasu spoczynku w teście był nieznacznie dłuższy w porównaniu z czasem okresu kontrolnego (Tab. 19).

### 6.5.2.3. Reakcja behawioralna *U. tumidus* na diklofenak w stężeniu $100 \mu\text{g L}^{-1}$

W kolejnym badaniu analizowano wpływ DCF w stężeniu  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , które było stukrotnie wyższe od notowanej koncentracji w ekosystemach wodnych zanieczyszczonych tą substancją.



**Rys. 26.** Reakcja małży *U. tumidus* na aplikację diklofenaku w stężeniu  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \*\*  $p < 0,01$ )

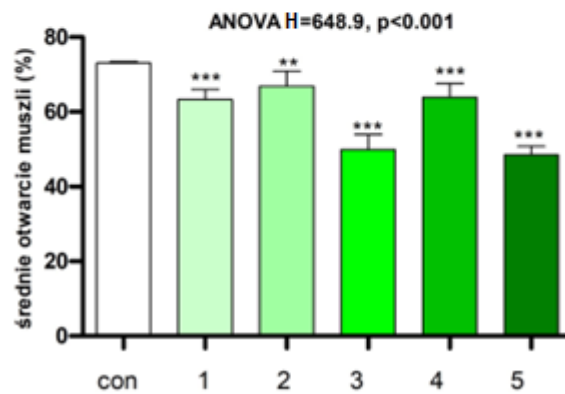
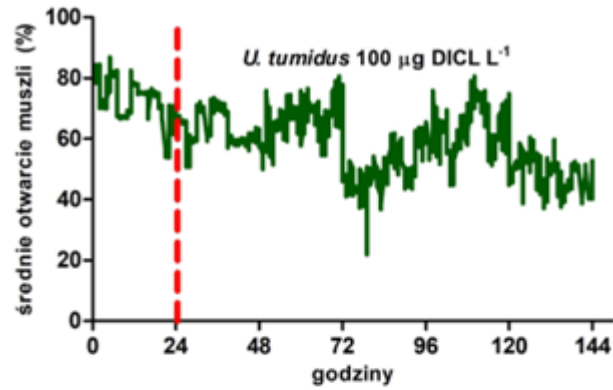
Średnie otwarcie skorup małży w okresie kontrolnym osiągnęło wysoką wartość. Osobniki aktywnie filtrowały wodę. Wartości fluktuowały w granicach od 53% do 88%. Aplikacja farmaceutyku w stężeniu  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  wywołała gwałtowny spadek aktywności filtracyjnej małży. W przeciągu kilku minut po dodaniu DCF średnie otwarcie muszli obniżyło się do 38%. Po godzinie od aplikacji średnie otwarcie skorup zaczęło wzrastać osiągając poziom 58%. Po kolejnych 3 godzinach aktywność filtracyjna spadła na ponad godzinę, po czym wzrosła do 66%. (Rys. 26). W trakcie całego badania średnie otwarcie muszli dla okresu kontrolnego było wyższe od testu z dodaną substancją (Rys. 26, Tab. 20). Analiza statystyczna wykazała, że różnica była istotna statystycznie (test Wilcoxona,  $p < 0,01$ ).

**Tabela 20.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu diklofenaku w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	72,4	2	100	11,3	2,2
test	58,7	0	103	19,8	6,8

Czas, w którym małże miały zamknięte skorupy w okresie testu był ponad trzykrotnie dłuższy w porównaniu z okresem kontrolnym (Tab. 20).

Dla najwyższego spośród badanych stężeń paracetamolu (100 µg L<sup>-1</sup>) przeprowadzono także obserwację długotrwałych pięciodniowych efektów behawioralnych. Okres kontrolny charakteryzował się wysoką aktywnością filtracyjną małży. Najwyższe średnie otwarcia muszli notowano w ciągu kilkunastu godzin po rozpoczęciu badania. W ciągu pięciu dób po aplikacji farmaceutyku odnotowano spadek aktywności u małży. Najsilniejsza reakcja wystąpiła w trzeciej dobie po aplikacji DCF, wtedy to minimalne średnie otwarcie skorup muszli wyniosło 21%. Jednak reakcja małży na zadawaną substancję była zauważalna w każdym z pięciu dni trwania doświadczenia (Rys. 27). Najwyższa aktywność filtracyjna wystąpiła w drugiej i czwartej dobie badania, osiągając wartość 80%.



**Rys. 27.** Średnie otwarcie skorup populacji małży *U. tumidus* w poszczególnych dobach eksperymentu narażenia na diklofenak w stężeniu  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . con - okres kontrolny, 1 - 5 dni po aplikacji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (post-hoc test Dunna, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ )

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w otwarciu skorup małży w czasie pięciodniowego badania. Test post-hoc Dunna wykazał, że we wszystkich dobach po podaniu DCF otwarcie skorup małży było statystycznie istotnie niższe, niż w okresie kontrolnym.

**Tabela 21.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym (con) i kolejnych dniach (1-5) po podaniu diklofenaku w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

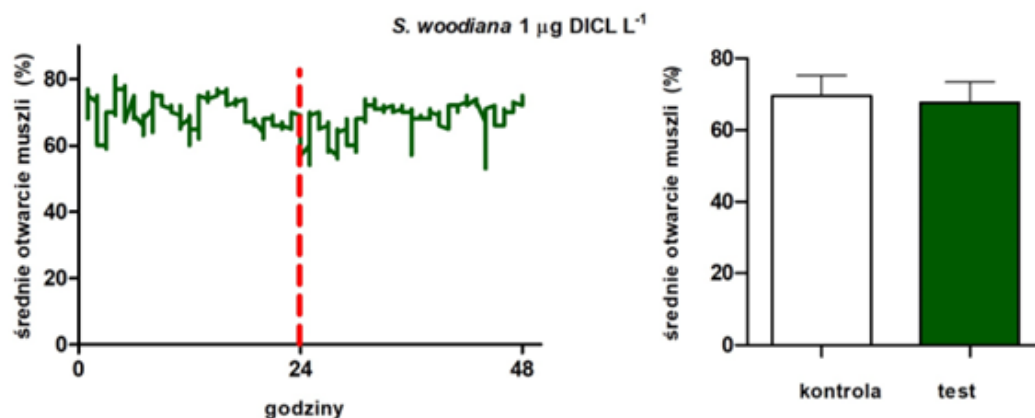
	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek (%)</b>
<b>con</b>	72,5	2	106	19,4	1,1
<b>1</b>	62	0	98	16,5	5,1
<b>2</b>	66	1	100	17,8	4,8
<b>3</b>	50	0	102	22,4	16,7
<b>4</b>	61	3	99	24,6	5,9
<b>5</b>	48	0	92	14,2	17,9

W ciągu całego testu, kiedy małże były narażone na oddziaływanie DCF stwierdzono dłuższy czas, kiedy małże całkowicie redukowały aktywność filtracyjną, a ich skorupy pozostawały zamknięte (Tab. 21).

### 6.5.3. Reakcje behawioralne małży *Sinanodonta woodiana* na wybrane stężenia diklofenaku

#### 6.5.3.1. Reakcja behawioralna *S. woodiana* na diklofenak w stężeniu $1 \mu\text{g L}^{-1}$

Najniższym stężeniem DCF wykorzystywanym do badań był  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Dawka ta nawiązywała do maksymalnych koncentracji farmaceutyku stwierdzanych w wodach powierzchniowych.



**Rys. 28.** Reakcja małży *S. woodiana* na aplikację diklofenaku w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (t-test,  $p > 0,05$ )

Aplikacja DCF w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  nie wywołała zauważalnej reakcji behawioralnej u testowanego gatunku. Jednak dodanie substancji spowodowało, że średnie otwarcie skorup małży obniżyło się z poziomu prawie 70% do 58%. Spadek był krótkotrwały, po czym aktywność filtracyjna osobników nieznacznie wzrosła. Największe fluktuacje pojawiły się w pierwszych 10 godzinach od aplikacji substancji. Kilka godzin później małże dość aktywnie filtrowały wodę, a ich średnie otwarcie skorup było zbliżonego do okresu kontrolnego. Najmniejsza aktywność populacji wystąpiła pod koniec trwania doświadczenia i osiągnęła wartość 52% (Rys. 28). Średnie otwarcie skorup małży w okresie kontrolnym, kiedy osobniki nie były narażone na farmaceutyk było zbliżone do okresu testowego (Rys. 28, Tab. 22). Wykonana analiza statystyczna (t-test) wykazała brak statystycznie istotnej różnicy w otwarciu skorup i aktywności filtracyjnej w okresie kontrolnym w stosunku do czasu po zadaniu farmaceutyku.

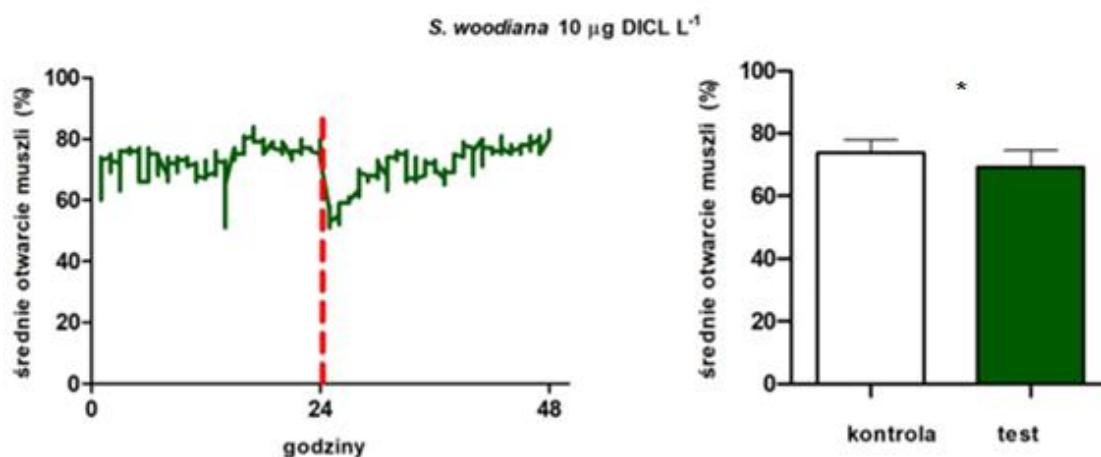
**Tabela 22.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu diklofenaku w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	spoczynek %
kontrola	70,6	4	112	12,4	2,3
test	68,5	6	106	14,8	1,5

Średni czas, kiedy małże pozostawały w spoczynku redukując swoją aktywność był wyższy w badaniu kontrolnym (Tab. 22).

### 6.5.3.2. Reakcja behawioralna *S. woodiana* na diklofenak w stężeniu $10 \mu\text{g L}^{-1}$

Kolejnym stężeniem DCF, które analizowano pod kątem wpływu na behavior filtracyjny populacji małży była koncentracja dziesięciokrotnie wyższa. Aplikowana dawka wynosiła  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Rys. 29.** Reakcja małży *S. woodiana* na aplikację diklofenaku w stężeniu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test, \*  $p < 0,05$ )

Dodanie DCF w ilości  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , podobnie jak w przypadku stężenia dziesięć razy niższego, nie wywołało istotnej reakcji stresowej u osobników, z wyjątkiem czasu tuż po aplikacji substancji. Wtedy to wartość średniego otwarcia muszli gwałtownie spadła z 80% do 50%. Przez kolejne 4 godziny aktywność filtracyjna utrzymywała się na niskim poziomie, po czym

znacząco zaczęła rosnać osiągając średnie wartości otwarcia z okresu kontrolnego (Rys. 29). Porównując średnie rozwarcie skorup w okresie kontrolnym i teście możemy zaobserwować wyższą średnią w okresie przed zaaplikowaniem substancji (Rys. 29, Tab. 23). Analiza statystyczna (test Wilcoxon) wykazała istotną różnicę w otwarciu muszli małży w badanych okresach.

**Tabela 23.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu DCF w stężeniu 10 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

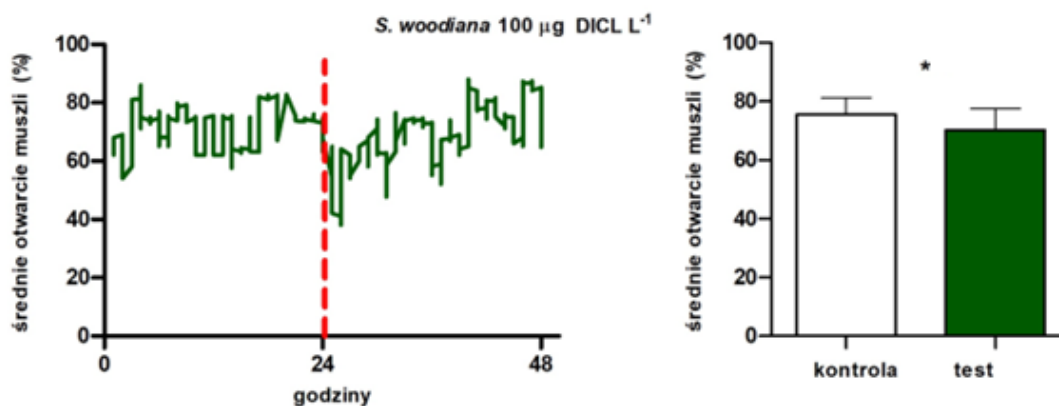
	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	74,1	0	105	9,9	1,3
test	70,4	3	111	10,6	0,9

Biorąc pod uwagę udział procentowy czasu spoczynku w teście i w okresie kontrolnym był on na zbliżonym, krótkim poziomie (Tab. 23).



### 6.5.3.3. Reakcja behawioralna *S. woodiana* na diklofenak w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>

W następnym doświadczeniu analizowano wpływ DCF w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Było ono stukrotnie wyższe od koncentracji notowanych w ekosystemów wodnych zanieczyszczonych tą substancją.



**Rys. 30.** Reakcja małży *S. woodiana* na aplikację diklofenaku w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \* p < 0,05)

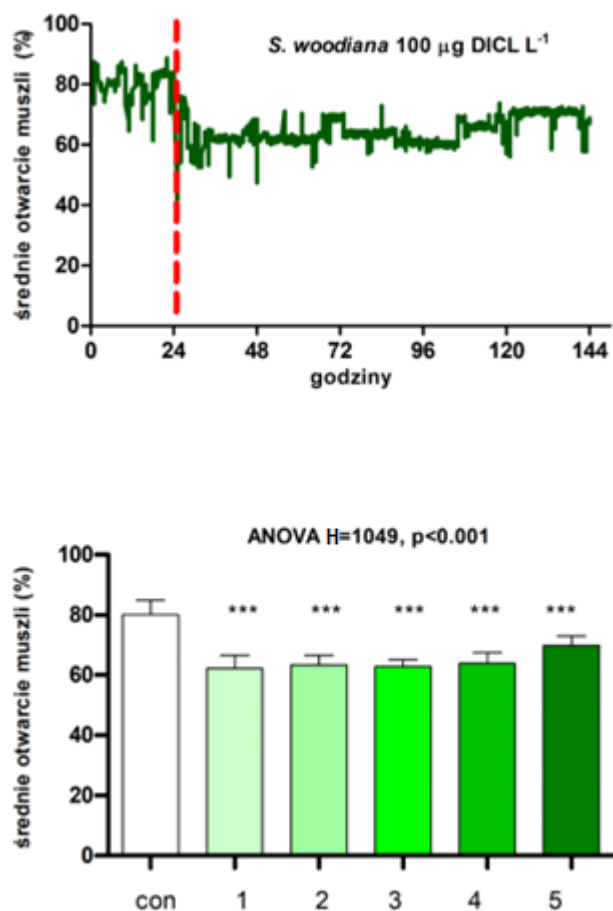
W okresie kontrolnym, kiedy małże nie były narażone na działanie DCF średnie otwarcie skorup w populacji wynosiło 75% i fluktuowało pomiędzy 54% a 88%. Aplikacja farmaceutyku w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup> wywołała gwałtowne ograniczenie aktywności filtracyjnej małży. W ciągu 30 minut od aplikacji substancji średnie otwarcie muszli spadło do poziomu 55%. Po około godzinie od dodania DCF wartość obniżyła się nieco poniżej 40%, następnie przez kolejnych 10 godzin wartość procentowa średniego otwarcia muszli wzrastała. (Rys. 30). Porównując otwarcie muszli w okresie kontrolnym i teście możemy zauważyć, że średnie otwarcie skorup było wyższe w części kontrolnej badania (Rys. 30, Tab. 24).

**Tabela 24.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu diklofenaku w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	74,8	2	106	12,5	1,2
test	70,6	0	107	18,9	0,6

Pomimo, że w trakcie całego badania małże filtrowały wodę z dużą intensywnością to wykonana analiza statystyczna wykazała, że otwarcie skorup małży w okresie, kiedy były narażone na oddziaływanie DCF w dawce 100 µg L<sup>-1</sup> było statystycznie istotnie niższe niż otwarcie skorup w okresie kontrolnym (test Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). Czas, w którym małże miały muszle zamknięte w okresie testu był dwukrotnie dłuższy w porównaniu do kontroli (Tab. 24).

Dla najwyższego spośród badanych stężeń DCF (100 µg L<sup>-1</sup>) przeprowadzono również obserwację pięciodniowych efektów behawioralnych. Przez cały okres kontrolny małże aktywnie filtrowały wodę, a ich średnie otwarcie muszli osiągnęło poziom 80%. W ciągu pięciu dób po aplikacji substancji zaobserwowano spadek średniego otwarcia skorup. Najsilniejszy efekt wystąpił w pierwszej oraz trzeciej dobie po aplikacji substancji (Rys. 31). Tak samo jak w eksperymencie z narażeniem 24 godzinnym, małże gwałtownie zareagowały na obecność farmaceutyku, ale redukcja aktywności filtracyjnej była bardziej długotrwała. Minimalne średnie otwarcia skorup małży odnotowano w pierwszej dobie badania. Pod koniec pierwszego dnia testu z diklofenakiem średnie otwarcie muszli spadło poniżej 50%. Pozostałe dni charakteryzowały się zbliżonymi wartościami średniego otwarcia, dopiero w 5 dobie trwania doświadczenia aktywność filtracyjna nieznacznie wzrosła.



**Rys. 31.** Średnie otwarcie skorup populacji małży *S. woodiana* w poszczególnych dobach eksperymentu narażenia na diklofenak w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. con - okres kontrolny, 1 - 5 dni po aplikacji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (post-hoc test Dunna, \*\*\* p < 0,001)

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w otwarciu skorup małży w czasie trwania eksperymentu. Test post-hoc Dunna wykazał, że we wszystkich dobach po podaniu DCF średnie otwarcie muszli było statystycznie istotnie niższe, niż w okresie kontrolnym.

**Tabela 25.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym (con) i kolejnych dniach (1-5) po podaniu diklofenaku w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek (%)</b>
<b>con</b>	80,6	5	109	19,2	0,2
<b>1</b>	60,4	1	101	20,1	4,1
<b>2</b>	61,1	0	103	19,8	3,6
<b>3</b>	60,9	1	99	11,8	1,8
<b>4</b>	61,4	1	107	19,6	2,4
<b>5</b>	69,6	2	108	18,9	1,4

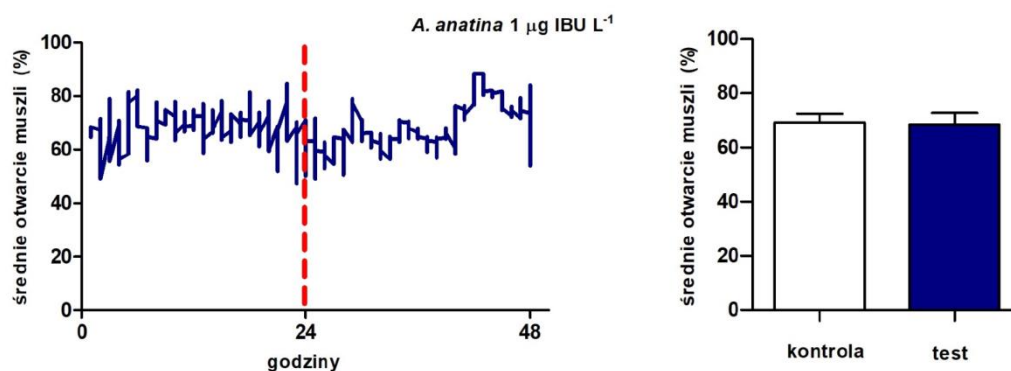
W ciągu całego testu, kiedy małże były narażone na oddziaływanie diklofenaku stwierdzono dłuższy czas, w którym małże całkowicie redukowały aktywność filtracyjną, a ich skorupy pozostawały zamknięte (Tab. 25).

## 6.6. Reakcja behawioralna małży na ibuprofen

### 6.6.1. Reakcje behawioralne małży *Anodonta anatina* na wybrane stężenia ibuprofenu

#### 6.6.1.1. Reakcja behawioralna *A. anatina* na ibuprofen w stężeniu $1 \mu\text{g L}^{-1}$

Najniższym stężeniem IBU, na którym testowano reakcję *A. anatina* był  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Stężenie to odpowiada maksymalnej, spotykanej koncentracji tego farmaceutyku w wodach powierzchniowych.



**Rys. 32.** Reakcja małży *A. anatina* na aplikację ibuprofenu w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (t-test,  $p > 0,05$ )

Po dodaniu IBU w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  nie zaobserwowano zauważalnej reakcji behawioralnej u małży. Kilka minut po aplikacji substancji aktywność filtracyjna wyniosła 62%. Następnie obniżyła się do 50% i jeszcze w tej samej godzinie wzrosła do 70%. Chwilę później wartość średniego otwarcia muszli obniżyła się i oscylowała wokół średniej dla całego okresu testowego z farmaceutykiem. Znaczący wzrost aktywności filtracyjnej skorup małży w teście nastąpił kilkanaście godzin po aplikacji substancji, wtedy to wartość wyniosła prawie 90%. Wartość ta utrzymywała się przez 2 godziny, a następnie zaczęła spadać osiągając 50% w momencie zakończenia badania. Okres kontrolny oraz testowy z ibuprofenem charakteryzowały się zbliżonymi średnimi otwarciami muszli badanej populacji małży (Rys. 32, Tab. 26), a wykonana analiza statystyczna (t-test) nie wykazała istotnych statystycznie różnic w średnim otwarciu muszli w obydwu okresach.

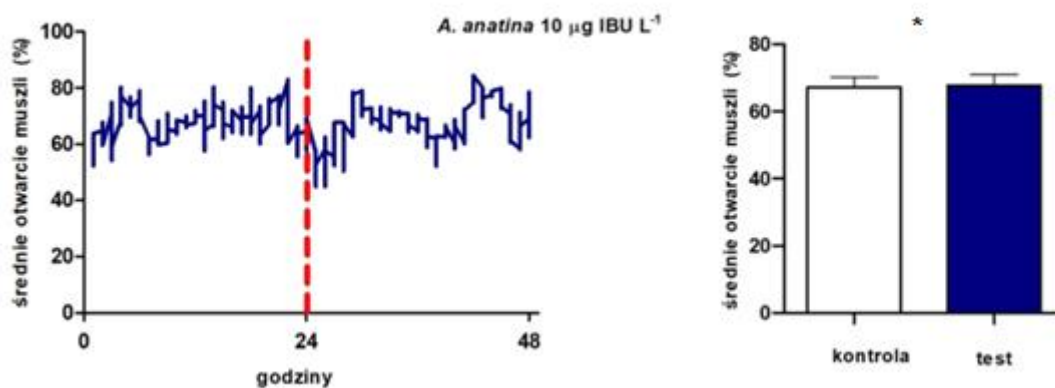
**Tabela 26.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu IBU w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	spoczynek %
kontrola	68,7	1	102	14,2	4,2
test	68,5	0	101	18,1	3,1

Średni czas, w którym osobniki pozostawały w spoczynku redukując swoją aktywność również był zbliżony (Tab. 26).

#### 6.6.1.2. Reakcja behawioralna *A. anatina* na ibuprofen w stężeniu $10 \mu\text{g L}^{-1}$

W kolejnym badaniu analizowano dziesięciokrotnie wyższą koncentrację IBU, która wynosiła  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . W doświadczeniu również obserwowano wpływ substancji na behavior filtracyjny małży.



**Rys. 33.** Reakcja małży *A. anatina* na aplikację ibuprofenu w stężeniu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test, \*  $p < 0,05$ )

Aplikacja IBU w ilości  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , podobnie jak w przypadku poprzedniego stężenia ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) nie wywołała zauważalnej reakcji stresowej u małży. W trakcie pierwszej godziny po podaniu farmaceutyku zaobserwowano najwyższy spadek aktywności filtracyjnej w populacji. Wartość średniego otwarcia muszli obniżyła się z 68% do 45%. Przez około 10 godzin po aplikacji IBU wystąpiły znaczne fluktuacje średniego otwarcia muszli. W kolejnych godzinach aktywność

filtracyjna utrzymywała się na poziomie średniego otwarcia skorup z całego badania, a maksymalne średnie otwarcie muszli populacji małży osiągnęło poziom 85% (Rys. 33). Średnie otwarcie muszli małży w okresie kontrolnym, kiedy osobniki nie były narażone na działanie IBU było zbliżone do wartości z okresu testowego (Rys. 33, Tab. 27). Pomimo tego analiza statystyczna (test Wilcoxona) wykazała statystycznie istotną różnicę w otwarciu skorup pomiędzy okresem kontrolnym i testowym.

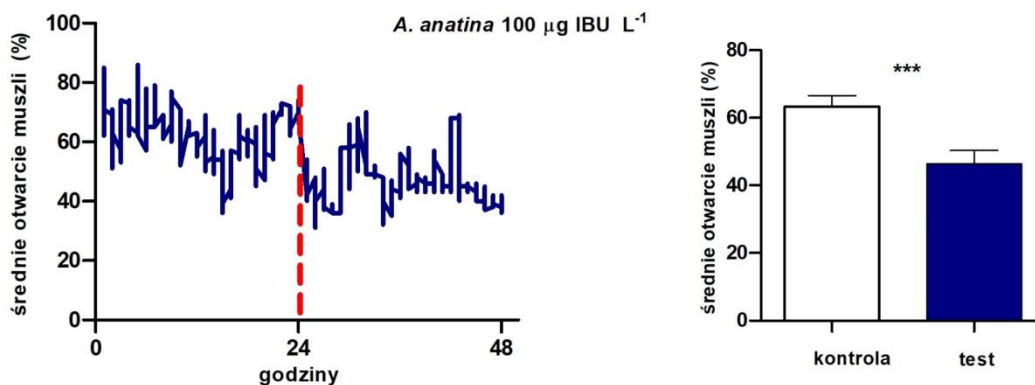
**Tabela 27.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu ibuprofenu w stężeniu 10 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	66,8	0	102	16,2	2,1
test	67,5	2	100	12,4	2,8

Udział procentowy czasu spoczynku w teście w porównaniu do kontroli, kiedy małże nie były poddane wpływowi IBU był podobny (Tab. 27).

### 6.6.1.3. Reakcja behawioralna *A. anatina* na ibuprofen w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>

Kolejnym analizowanym stężeniem, pod kątem wpływu na behavior filtracyjny małży był ibuprofen w dawce stukrotnie wyższej od koncentracji uznanej za reprezentatywną w wodach powierzchniowych. Jego stężenie w badaniu wynosiło 100 µg L<sup>-1</sup>.



**Rys. 34.** Reakcja małży *A. anatina* na aplikację ibuprofenu w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>.

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \*\*\*  $p < 0,001$ )

Średnie otwarcie skorup w okresie kontrolnym, kiedy małże nie były narażone na oddziaływanie IBU wynosiło nieco ponad 65%. Aplikacja farmaceutyku w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup> spowodowała gwałtowne ograniczenie aktywności filtracyjnej małży. Już w ciągu 30 minut po dodaniu farmaceutyku średnie otwarcie skorup spadło do 40%, po czym w kolejnych godzinach nieznacznie wzrosło. Minimalne średnie otwarcie muszli wystąpiło w 3 godzinie po aplikacji IBU, wtedy to wartość wyniosła 30%. Największą aktywność filtracyjną w części badania z testowaną substancją zaobserwowano w 6 i 16 godzinie po aplikacji substancji. Wtedy średnie rozwarcie skorup zbliżone było do 70%. (Rys. 34). W trakcie całego doświadczenia maksymalne średnie otwarcie muszli było znacznie wyższe w okresie kontrolnym niż w teście (Rys. 34, Tab. 28). Wynik analizy statystycznej wykazał, że otwarcie skorup małży w okresie narażenia na IBU w dawce 100 µg L<sup>-1</sup> było istotnie statystycznie niższe niż w okresie kontrolnym (test Wilcozona,  $p < 0,001$ ).

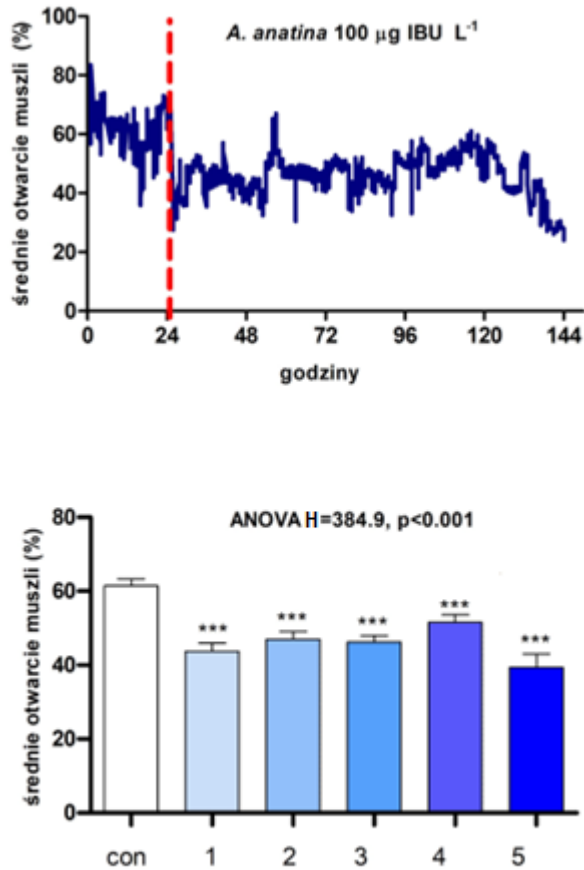


**Tabela 28.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu ibuprofenu w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	62,5	0	100	20,6	2,6
test	48,6	0	87	15,8	18,3

Czas, w którym małże miały zamknięte muszle w okresie testu był ponad siedmiokrotnie dłuższy w porównaniu z kontrolą (Tab. 28).

Dla najwyższego spośród badanych stężeń IBU (100 µg L<sup>-1</sup>) przeprowadzono także obserwację reakcji behawioralnej w trakcie subchronicznego – pięciodniowego narażenia na farmaceutyk. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że negatywne efekty oddziaływania IBU na populację utrzymują się przez długi czas. W okresie kontrolnym osobniki aktywnie filtrowały wodę, a ich największa aktywność przypadła na pierwsze 8 godzin od rozpoczęcia badania. W przeciągu pierwszych 24 godzin (kontrola) wartości średniego otwarcia muszli wahały się w przedziale od 85% do 34%. W trakcie pięciu dób po aplikacji substancji zaobserwowano spadek aktywności filtracyjnej małży. Najsilniejsze działanie IBU na populację wystąpiło w pierwszej i piątej dobie po aplikacji farmaceutyku (Rys. 35). Porównując zmiany behawioru filtracyjnego małży do doświadczenia 24 godzinnego, tu również stwierdzono gwałtowną reakcję stresową po dodaniu IBU. Minimalne średnie otwarcie skorup stwierdzono na koniec 5 doby badania, wtedy średnie rozwarcie skorup populacji spadło do 25%.



**Rys. 35.** Średnie otwarcie skorup populacji małży *A. anatina* w poszczególnych dobach eksperymentu narażenia ibuprofen w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. con - okres kontrolny, 1 - 5 dni po aplikacji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (post-hoc test Dunna, \*\*\* p < 0,001)

Analiza statystyczna wykazała istotne różnice w otwarciu skorup małży w trakcie trwania pięciodniowego eksperymentu. Test post-hoc Dunna wykazał, że we wszystkich dobach po podaniu IBU otwarcie skorup małży było statystycznie istotnie niższe, niż w okresie kontrolnym.

**Tabela 29.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *A. anatina* w okresie kontrolnym (con) i kolejnych dniach (1-5) po podaniu ibuprofenu w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%. SD - odchylenie standardowe.

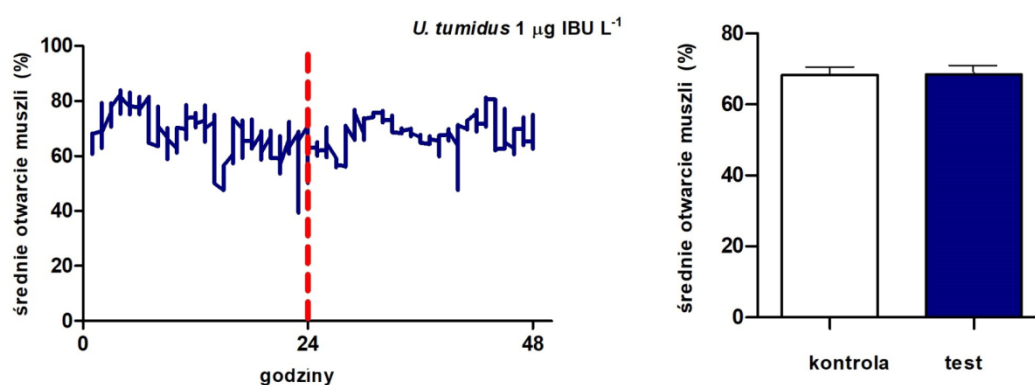
	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek (%)</b>
<b>con</b>	61	0	100	25,1	5,5
<b>1</b>	42	0	100	16,4	9,8
<b>2</b>	43	0	95	18,9	12,5
<b>3</b>	41,8	0	92	19,2	15,4
<b>4</b>	47,8	0	97	16,6	21,5
<b>5</b>	38,9	0	88	35,1	38,4

W ciągu całego testu, kiedy małże były narażone na oddziaływanie IBU stwierdzono dłuższy czas, kiedy małże całkowicie redukowały aktywność filtracyjną a ich skorupy pozostawały zamknięte (Tab. 29).

## 6.6.2. Reakcje behawioralne małży *Unio tumidus* na wybrane stężenia ibuprofenu

### 6.6.2.1. Reakcja behawioralna *U. tumidus* na ibuprofen w stężeniu $1 \mu\text{g L}^{-1}$

Najniższym stężeniem IBU, na którym testowano reakcję *U. tumidus* był  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Stężenie to nawiązywało do maksymalnych koncentracji tego farmaceutyku stwierdzanych w wodach powierzchniowych.



**Rys. 36.** Reakcja małży *U. tumidus* na aplikację ibuprofenu w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test,  $p > 0,05$ )

Aplikacja IBU w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  nie wywołała zauważalnych zmian w reakcji behawioralnej testowanego gatunku małży. Zaraz po aplikacji farmaceutyku średnie otwarcie skorup muszli obniżyło się o 10%, jednak załamanie aktywności było krótkotrwałe. Minimalną wartość stwierdzono w 14 godzinie badania, wtedy to średnie otwarcie spadło poniżej 50%. Krótkotrwałe, jednak gwałtowne obniżenie aktywności filtracyjnej (do 40%) stwierdzono także w okresie kontrolnym poprzedzającym dodanie substancji (Rys. 36). Średnie otwarcie muszli małży w okresie kontrolnym było bardzo zbliżone do okresu testowego z ibuprofenem (Rys. 36, Tab. 30). Analiza statystyczna (test Wilcozona) nie wykazała statystycznie istotnych różnic w otwarciu muszli i aktywności filtracyjnej w okresie kontrolnym, w stosunku do okresu po zadaniu IBU.

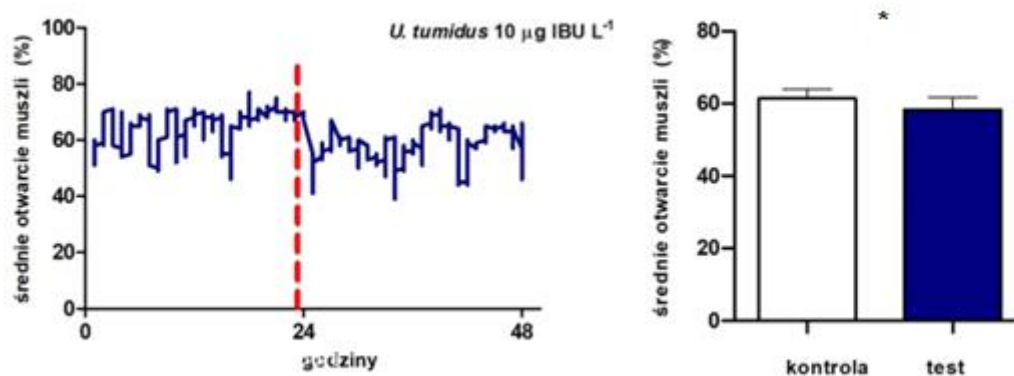
**Tabela 30.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu ibuprofenu w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	spoczynek %
kontrola	68,5	0	101	17,4	2,5
test	68,7	2	1,4	15,2	1,3

Średni czas, kiedy małże pozostawały w spoczynku redukując swoją aktywność w okresie kontrolnym był ponad dwukrotnie dłuższy od okresu po aplikacji substancji (Tab. 30).

#### 6.6.2.2. Reakcja behawioralna *U. tumidus* na ibuprofen w stężeniu $10 \mu\text{g L}^{-1}$

Kolejnym testowanym stężeniem IBU, które analizowano pod kątem wpływu na behawior filtracyjny małży była koncentracja dziesięciokrotnie wyższa, która wynosiła  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Rys. 37.** Reakcja małży *U. tumidus* na aplikację ibuprofenu w stężeniu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test, \*  $p < 0,05$ )

Badanie kontrolne charakteryzowało się dużymi wahaniami średniego otwarcia muszli. Dopiero na kilka godzin przed podaniem IBU aktywność filtracyjna małży ustabilizowała się. Minimalna wartość dla tego okresu wyniosła 45% (Rys. 37). Podanie IBU w dawce  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  wpłynęło znacząco na zachowanie filtracyjne małży. W przeciągu kilku godzin po aplikacji

leku, średnie otwarcie skorup małży uległo redukcji o około 30%. W kolejnych godzinach aktywność filtracyjna (wyrażona stopniem otwarcia skorup) wzrastała osiągając wartość 70%. Porównując średnie otwarcie skorup w okresie kontrolnym i w teście możemy zauważyć nieznacznie większą średnią dla okresu bez substancji (Rys. 37, Tab. 31) analiza statystyczna (test Wilcoxon) wykazała istotne statystycznie różnice w otwarciu muszli w porównywanych okresach.

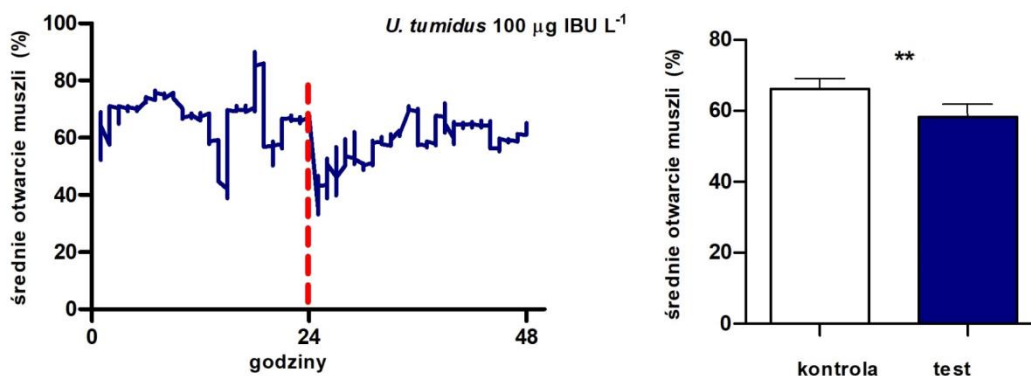
**Tabela 31.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu ibuprofenu w stężeniu 10 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	61,7	4	103	16,6	11,6
test	57,2	0	96	12,9	15,3

Udział procentowy czasu spoczynku był dość długi i osiągnął wyższą wartość dla okresu testowego z ibuprofenem (Tab. 31).

### 6.6.2.3. Reakcja behawioralna *U. tumidus* na ibuprofen w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>

W kolejnym badaniu analizowano wpływ IBU na małże w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Było ono stukrotnie wyższe od koncentracji stwierdzanych w ekosystemach wodnych zanieczyszczonych tą substancją.



**Rys. 38.** Reakcja małży *U. tumidus* na aplikację ibuprofenu w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>.

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \*\* p < 0,01)

W okresie kontrolnym, w którym małże nie były poddane wpływowi IBU średnie otwarcie skorup muszli wynosiło 65%. W czasie 24 godzin aktywność filtracyjna małży fluktuowała pomiędzy 58% a 90%. Dodanie IBU w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup> wywołało nagłą reakcję u małży obniżając ich aktywność filtracyjną i rozwarcie skorup do poziomu nieco powyżej 30%. W kolejnych godzinach po aplikacji substancji wartość średniego otwarcia skorup wzrastała, jednak obserwowano liczne fluktuacje w krótkich interwałach czasowych (Rys 38). Najwyższa aktywność filtracyjna po narażeniu na IBU wystąpiła w 11 i 17 godzinie eksperymentu i obu przypadkach wyniosła ponad 70%. Następnie średnie otwarcie muszli oscylowało w okolicy średniej dla całego badania (Rys. 38). W trakcie całego okresu testu z farmaceutykiem średnie otwarcie muszli było niższe, niż dla okresu kontrolnego (Rys. 38, Tab. 32). Analiza statystyczna wykazała, że otwarcie skorup muszli w okresie, kiedy były narażone na oddziaływanie IBU w dawce 100 µg L<sup>-1</sup> było istotnie statystycznie niższe, niż otwarcie skorup w okresie kontrolnym (test Wilcoxona, p < 0,01).

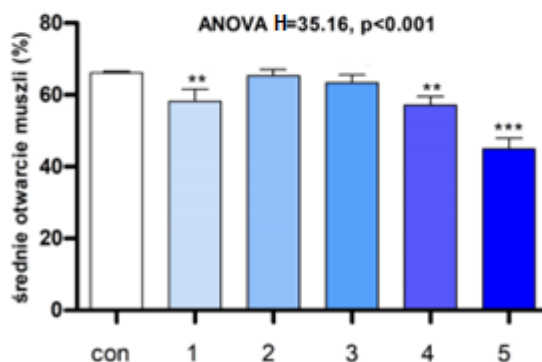
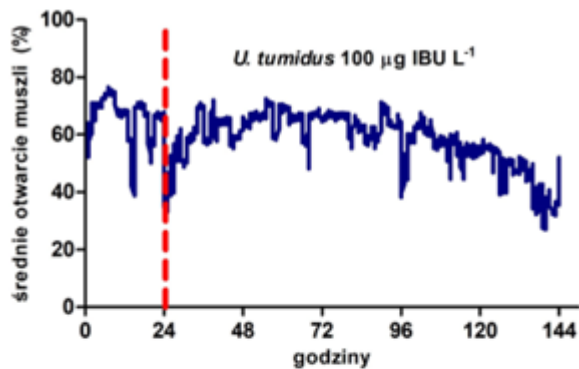
**Tabela 32.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu ibuprofenu w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	67,2	0	100	18,9	0,3
test	57,5	0	98	16,9	2,6

Porównując średnie otwarcie muszli w całym okresie kontrolnym z testem zauważamy redukcję aktywności u małży. Okres, w którym małże miały zamknięte muszle w czasie testu z farmaceutykiem był ponad ośmiokrotnie dłuższy w porównaniu do badania kontrolnego (Tab. 32).

Dla najwyższego spośród badanych stężeń IBU (100 µg L<sup>-1</sup>) przeprowadzono także obserwację pięciodniowych efektów behawioralnych. Wyniki badań pokazały, że negatywne efekty oddziaływania IBU utrzymują się u małży przez długi czas. Podobnie jak w doświadczeniu z narażeniem 24 godzinnym małże gwałtownie zareagowały na obecność substancji. Zaraz po aplikacji ich aktywność filtracyjna bardzo szybko spadła osiągając próg nieznacznie powyżej 30%. W kolejnych godzinach średnie otwarcie muszli wzrastało i charakteryzowało się licznymi wahaniami aktywności filtracyjnej małży. Następnie w 70 godzinie obniżyło się do 50%, po czym wzrosło i fluktuowało w niewielkim zakresie różnic. Dopiero na początku 4 doby badania nastąpił ponowny spadek poniżej 40%, następnie aktywność wzrosła. (Rys. 39).





**Rys. 39.** Średnie otwarcie skorup populacji małży *U. tumidus* w poszczególnych dobach eksperymentu narażenia na ibuprofen w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. con - okres kontrolny, 1 - 5 dni po aplikacji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (post-hoc test Dunna, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001)

Wyniki analizy statystycznej pokazały istotne różnice w otwarciu skorup małży podczas trwania eksperymentu. Test post-hoc Dunna wykazał, że w 1, 4 i 5 dobie po podaniu IBU otwarcie skorup małży było statystycznie istotnie niższe, niż w okresie kontrolnym.

**Tabela 33.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *U. tumidus* w okresie kontrolnym (con) i kolejnych dniach (1-5) po podaniu ibuprofenu w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

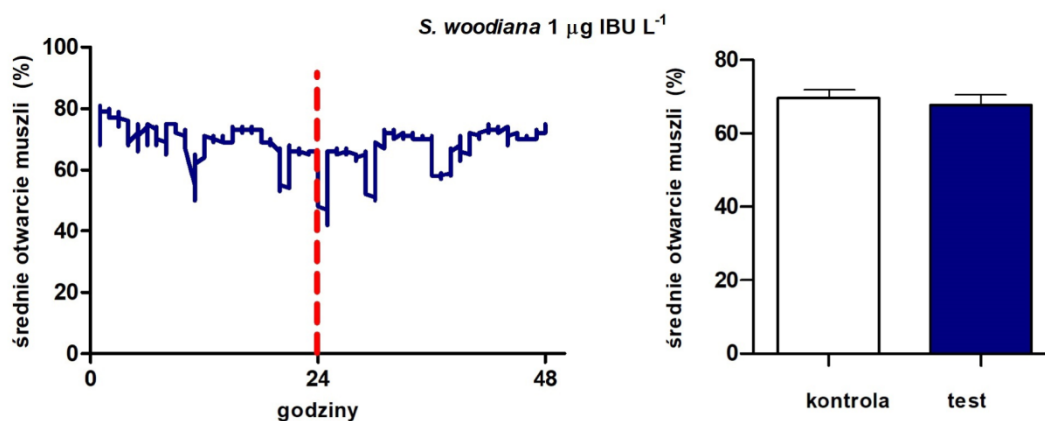
	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek (%)</b>
<b>con</b>	65,5	14	102	4,2	0
<b>1</b>	57,2	0	106	22,6	10,9
<b>2</b>	64,4	0	100	14,6	5,4
<b>3</b>	62	0	102	19,2	5,6
<b>4</b>	56,4	0	100	15,6	12,4
<b>5</b>	48	0	89	26,8	22,7

W ciągu całego testu, kiedy małże były narażone na oddziaływanie IBU stwierdzono dłuższy czas, kiedy małże całkowicie redukowały aktywność filtracyjną a ich skorupy pozostawały zamknięte (Tab. 33).

### 6.6.3. Reakcje behawioralne małży *Sinanodonta woodiana* na wybrane stężenia ibuprofenu

#### 6.6.3.1. Reakcja behawioralna *S. woodiana* na ibuprofen w stężeniu $1 \mu\text{g L}^{-1}$

Najniższym stężeniem IBU, na którym testowano reakcję *S. woodiana* był  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Stężenie to stanowiło maksymalną koncentrację substancji, która była stwierdzana w wodach powierzchniowych.



**Rys. 40.** Reakcja małży *S. woodiana* na aplikację ibuprofenu w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (Wilcoxon test,  $p > 0,05$ )

Aplikacja IBU w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  nie wywołała zauważalnej reakcji behawioralnej u gatunku *S. woodiana*. W momencie aplikacji farmaceutyku średnie otwarcie skorup populacji testowej spadło z 70 do 50% i utrzymywało się na tym poziomie przez 2 godziny po czym średnie otwarcie skorup obniżyło się na krótko 40%. Później średnie otwarcie muszli testowej populacji małży wzrosło powyżej 65% i przez kilka godzin pozostawało na tym poziomie. W 10 godzinie odnotowano nieznaczne obniżenie się średniej wartości rozwarcia skorup. W kolejnych średnia wartość wzrosła i oscylowała wokół średniej wartości dla całego badania (Rys. 40). Średnie otwarcie skorup małży w okresie kontrolnym, kiedy małże nie były narażone na farmaceutyk było zbliżone do okresu testowego (Rys. 40, Tab. 34).

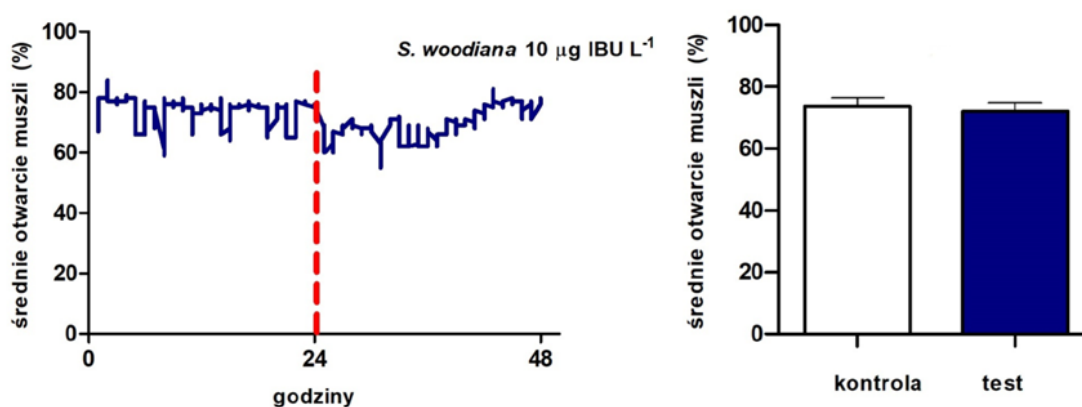
**Tabela 34.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu ibuprofenu w stężeniu  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	średnia	min	max	SD	spoczynek %
kontrola	68,2	2	106	10,2	0,8
test	67,5	1	102	16,8	1,6

Wykonana analiza statystyczna (t-test) nie wykazała statystycznie istotnych różnic w średnim otwarciu muszli i aktywności filtracyjnej w okresie kontrolnym, w stosunku do okresu po zadaniu farmaceutyku. Średni czas, w którym małże pozostawały w spoczynku obniżając swoją aktywność był dwukrotnie dłuższy dla okresu z badaną substancją (Tab. 34).

#### 6.6.3.2. Reakcja behawioralna *S. woodiana* na ibuprofen w stężeniu $10 \mu\text{g L}^{-1}$

Kolejnym stężeniem IBU, które analizowano pod kątem wpływu na behavior filtracyjny małży była koncentracja dziesięciokrotnie wyższa i wynosiła  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .



**Rys. 41.** Reakcja małży *S. woodiana* na aplikację ibuprofenu w stężeniu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupki - średnia, wąż - błąd standardowy (Wilcoxon test,  $p > 0,05$ )

Okres kontrolny charakteryzował się dużymi wahaniami aktywności filtracyjnej u małży. Średnie otwarcia muszli fluktuowały w przedziale od 58% do 85% (Rys. 41). Aplikacja IBU w ilości  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , podobnie jak w przypadku stężenia dziesięciokrotnie niższego, spowodowała

tylko nieznaczną reakcję stresową u małży. W przeciągu pierwszej godziny po aplikacji farmaceutyku średnie otwarcie skorup populacji testowej spadło do poziomu nieco powyżej 60%. Następnie średnie otwarcie skorup wzrastało oscylując wokół średniej dla części badania z substancją. Analizując średnie rozwarście skorup w okresie kontrolnym i teście możemy zauważyć nieznaczny spadek średniego rozwarścia skorup po aplikacji IBU w porównaniu do okresu kontrolnego (Rys. 41, Tab. 35) jednak analiza statystyczna (test Wilcoxon) nie wykazała istotnych różnic w średnim otwarciu muszli i aktywności filtracyjnej w okresie kontrolnym, w stosunku do okresu po zadaniu farmaceutyku.

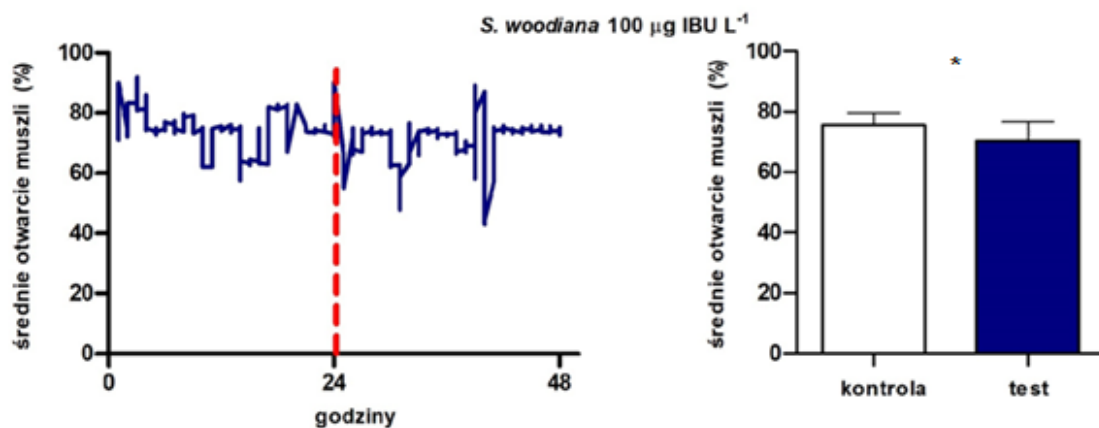
**Tabela 35.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu IBU w stężeniu  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>Min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	73,6	4	102	16,8	1,5
test	70,6	2	112	15,8	2,3

Warto odnotować, że udział procentowy czasu spoczynku w teście z IBU był dłuższy w porównaniu do kontroli, kiedy małże nie były poddane wpływowi substancji (Tab. 35).

### 6.6.3.3. Reakcja behawioralna *S. woodiana* na ibuprofen w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>

W kolejnym badaniu analizowano wpływ IBU w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>, które było stukrotnie wyższe od koncentracji uznanej za reprezentatywną dla ekosystemów wodnych zanieczyszczonych tą substancją.



**Rys. 42.** Reakcja małży *S. woodiana* na aplikację ibuprofenu w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>.

Czerwona linia oznacza moment podania substancji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy, statystyczna istotność różnic (Wilcoxon test, \* p < 0,05)

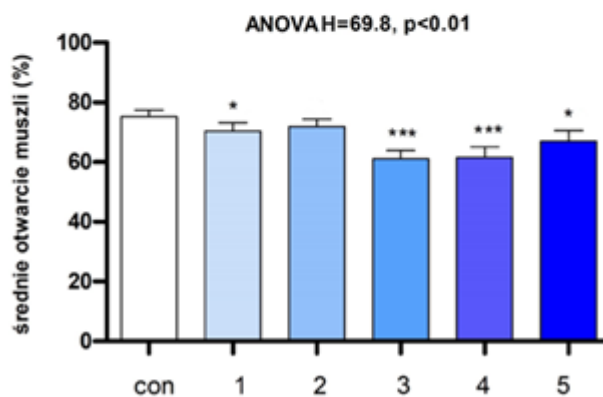
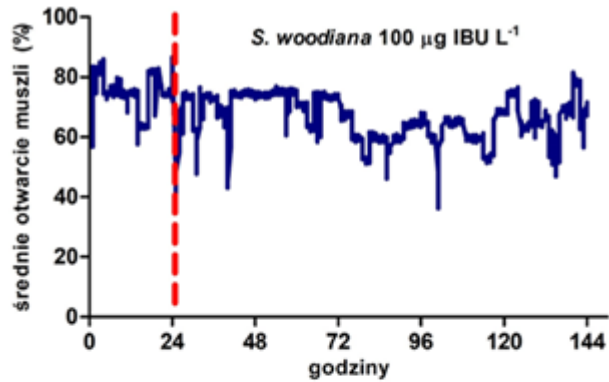
W badaniu kontrolnym, kiedy osobniki nie były poddane oddziaływaniu farmaceutyka, średnie otwarcie skorup muszli wynosiło prawie 76%. Dodanie IBU w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup> spowodowało gwałtowne ograniczenie aktywności filtracyjnej. W przeciągu kilku minut po aplikacji substancji średnie otwarcie skorup spadło z ponad 90% do 56%. W kolejnej godzinie aktywność filtracyjna małży wzrosła osiągając wartość 75%. Wzrost jednak był krótkotrwały i średnie otwarcie skorup ponownie obniżyło się do 65%. Wartość ta utrzymywała się przez 2 godziny, a następnie wzrosła osiągając średnią wartość dla całego okresu testowego (Rys. 42). W ciągu całego czasu badania reakcji behawioralnych małży dla stężenia 100 µg L<sup>-1</sup> maksymalne średnie otwarcie muszli w okresie kontrolnym było nieznacznie wyższe, niż w części testowej z IBU (Rys. 42, Tab. 36) a analiza statystyczna (test Wilcoxona) wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy okresem kontrolnym i testem kiedy małże narażone były na farmaceutyk.

**Tabela 36.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym i testowym po podaniu ibuprofenu w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek %</b>
kontrola	75,8	3	106	17,9	3,2
test	71,2	3	103	24,6	7,4

Czas, kiedy małże miały muszle zamknięte w okresie testu był ponad dwukrotnie dłuższy w porównaniu do kontroli (Tab. 36).

Dla najwyższego spośród badanych stężeń IBU (100 µg L<sup>-1</sup>) przeprowadzono również obserwację długotrwałych pięciodniowych efektów behawioralnych. Otrzymane wyniki badań pokazały, że negatywne efekty oddziaływania IBU na małże utrzymują się przez długi czas. W badaniu kontrolnym małże aktywnie filtrowały wodę. Wartości średniego otwarcia muszli fluktuowały w przedziale od 55% do 88%. Najsilniejszy efekt spadku aktywności filtracyjnej małży wystąpił tuż po podaniu farmaceutyku. Podobnie jak w 24 godzinnym eksperymencie z narażeniem na farmaceutyk, małże gwałtownie zareagowały na pojawienie się IBU. Minimalne średnie otwarcie muszli zaobserwowano w pierwszej połowie czwartej doby, natomiast maksymalne wystąpiło pod koniec piątej doby badania (Rys. 43).



**Rys. 43.** Średnie otwarcie skorup populacji małży *S. woodiana* w poszczególnych dobach eksperymentu narażenia na ibuprofen w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. con - okres kontrolny, 1 - 5 dni po aplikacji, słupek - średnia, wąs - błąd standardowy (post-hoc test Dunna, \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001)

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotne różnice w otwarciu skorup małży w czasie trwania eksperymentu. Test post-hoc Dunna wykazał, że prawie we wszystkich dobach po podaniu IBU otwarcie skorup małży było statystycznie istotnie niższe, niż w okresie kontrolnym. Wyjątek stanowiła druga doba badania.



**Tabela 37.** Podstawowe statystyki otwarcia skorup *S. woodiana* w okresie kontrolnym (con) i kolejnych dniach (1-5) po podaniu ibuprofenu w stężeniu 100 µg L<sup>-1</sup>. Spoczynek oznacza udział procentowy czasu, kiedy małże miały otwarte skorupy mniej niż 5%, SD - odchylenie standardowe.

	<b>średnia</b>	<b>min</b>	<b>max</b>	<b>SD</b>	<b>spoczynek (%)</b>
<b>con</b>	76,2	2	109	18,4	1,3
<b>1</b>	72,1	0	116	22,6	0,2
<b>2</b>	73,6	4	100	16,2	6,5
<b>3</b>	60,2	0	109	15,8	5,8
<b>4</b>	61,1	0	103	18,1	14,6
<b>5</b>	64,2	1	105	26,3	7,2

W ciągu całego testu, kiedy małże były narażone na oddziaływanie IBU stwierdzono dłuższy czas, kiedy małże całkowicie redukowały aktywność filtracyjną a ich skorupy pozostawały zamknięte z wyjątkiem pierwszego dnia badania (Tab. 37).

## 6.6. Dyskusja

Niesteroidowe leki przeciwzapalne, antypiretyki oraz środki przeciwbólowe, ze względu na masowe użycie w terapiach ludzkich i weterynarii, są najczęściej wykrywanymi farmaceutykami w środowiskach wodnych (aus der Beek i in. 2016, Rzymski i in. 2017, Fekadu i in. 2019). Choć zazwyczaj w środowisku występują w niewielkich stężeniach rzędu ng czy sporadycznie  $\mu\text{g L}^{-1}$ , to ich obecność może w istotny sposób modyfikować funkcjonowanie naturalnych ekosystemów (Santos i in. 2010, Bagnis i in. 2018, Klimaszuk i Rzymski 2018, Parolini 2020). Farmaceutyki te hamują aktywność enzymów COX-1 i COX-2, a w konsekwencji zmniejszają syntezę prostaglandyn (Gierse i in. 1995). Enzymy COX i prostaglandyny biorą udział w wielu procesach fizjologicznych, takich jak zwalczanie stanów zapalnych i obniżanie progu pobudliwości receptorów bólu, redukcja podwyższonej temperatury, regulacja przepływu krwi w nerkach oraz procesów koagulacji (Klimaszuk i Rzymski 2018, Parolini 2020). Również paracetamol hamuje aktywność cyklooxygenaz, choć działanie to nie zachodzi w tkankach obwodowych (Graham i Scot 2005). Enzymy i homologi enzymów COX wykryte zostały u kręgowców lądowych i ryb. U różnych grup organizmów sterować mogą odmiennymi procesami np. u ryb wpływają na proces reprodukcji poprzez stymulację owulacji, produkcję estradiolu i pobudzenie behawioru seksualnego (Corcoran i in. 2010), czy modyfikację procesów osmoregulacji (Gravel i in. 2009). Izoformy cyklooxygenaz wykryte zostały także u wielu wodnych zwierząt bezkręgowych, takich jak stawonogi, mięczaki, w tym małże czy przydełkowce (Kawamura i in. 2014). Liczne badania toksykologiczne dokumentują różnorodne efekty toksyczne manifestujące się u bezkręgowców wodnych, w wyniku narażenia na paracetamol i niesteroidowe leki przeciwzapalne. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż w większości badań organizmy eksponowane były na stężenia farmaceutyków wielokrotnie wyższe niż te, spotykane w naturalnym środowisku i te, które testowane były w przeprowadzonym badaniu.

W niniejszym eksperymencie narażenie na stężenia PCM, DCF i IBU odpowiadające środowiskowym i ich 10 i 100 krotności nie powodowały śmiertelności małży zarówno w narażeniu 24 godzinnym jak i subchronicznym - 5 dniowym. Szereg badań demonstruje, że letalne efekty tych farmaceutyków w stosunku do bezkręgowców wodnych występują po narażeniu na znacznie wyższe stężenia. Stężenia letalne (LC50) *Daphnia magna* dla 21 dniowego narażenia na paracetamol, diklofenak i ibuprofen wynosiły odpowiednio  $5,32 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $2,00 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $3,97 \text{ mg L}^{-1}$ , a dla 24 godzinnego odpowiednio  $224 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $486 \text{ mg L}^{-1}$  i  $200 \text{ mg L}^{-1}$  (Du i in. 2016). Wartości te znacznie przekraczają stężenia spotykane

w ekosystemach wodnych. Nunes i inni (2014) na podstawie badań przeprowadzonych na *D. magna* i *D. longispina* stwierdzili, że toksyczność paracetamolu wobec nawet blisko spokrewnionych gatunków skorupiaków wodnych może być istotnie odmienna – *D. magna* wykazywała toksyczne efekty przy stężeniach paracetamolu ponad 15 krotnie niższych niż *D. longispina*. W niniejszych badaniach zaobserwowano także odmienną wrażliwość testowanych gatunków małży w odniesieniu do wszystkich testowanych farmaceutyków, ale różnice te nie były znaczące. Porównując uzyskane wyniki stwierdzić można, że najsilniejszym efektem unikania – ograniczeniem aktywności filtracyjnej i zamykaniem skorup charakteryzowała się *Anodonta anatina* potem *Unio tumidus*, a najmniejszym *Sinanodonta woodiana*. W przypadku ostatniego gatunku nawet narażenie subchroniczne na najwyższe testowane stężenia PCM, DCF oraz IBU nie wywoływało istotnego ograniczenia aktywności filtracyjnej, co miało miejsce w przypadku *A. anatina* i *U. tumidus*. Wcześniejsze obserwacje również potwierdzają wysoką tolerancję *S. woodiana* na chemiczne zanieczyszczenie wody (Corsi i in. 2007, Liu i in. 2015, Bielen i in. 2016). Odporność na zanieczyszczenie wody wraz z odpornością tego gatunku na stres termiczny i brak preferencji siedliskowych (Urbańska i in. 2021) są czynnikami sprzyjającymi inwazji tego gatunku. Dodatkowo wzrost temperatury wody wynikający z globalnych zmian klimatu, który magnifikuje toksyczne efekty obecności farmaceutyków (Khoma i in. 2021) może powodować zwiększenie presji konkurencyjnej ze strony *S. woodiana* na rodzime gatunki małży.

Chociaż efekty letalne narażenia bezkręgowych organizmów wodnych na niesteroidowe leki przeciwzapalne obserwowane są zazwyczaj przy stężeniach rzędu mg L<sup>-1</sup>, to cyto czy genotoksyczne zaburzenia występują w wyniku chronicznego czy subchronicznego narażenia na stężenia odpowiadające tym, które spotykane są w środowisku. Brandão i in. (2014) badając biochemiczne skutki ekspozycji na środowiskowe stężenia PCM u małża słodkowodnego *Corbicula fluminea* stwierdził znaczący spadek transferazy glutationu i reduktazy glutationowej oraz wzrost peroksydacji lipidów i zmiany komórkowego statusu redox zarówno w przypadku krótko, jak i długotrwałej ekspozycji. Zależne od zastosowanej dawki, cytogenotoksyczne efekty ekspozycji na środowiskowe dawki paracetamolu zostały stwierdzone także dla racicznicy zmiennej (*Dreissena polymorpha*) (Parolini i in. 2010). Również narażenie na środowiskowe dawki DCF i IBU wywoływało u słodkowodnych małży stres oksydacyjny i efekty genotoksyczne (Parolini i in. 2011, Khoma i in. 2021, Martyniuk i in. 2022). Wyniki te jednoznacznie udowadniają, że nawet krótkotrwałe narażenie na niewielkie dawki farmaceutyków może zaburzać stabilne funkcjonowanie osobników i populacji małży. Małże mają jednak zdolność unikania ekspozycji na stresory chemiczne,

a także biologiczne poprzez czasowe zamykanie muszli i ograniczanie aktywnej filtracji i respiracji, zwane efektem unikania (Kramer i Fokema 2001, Hartmann i in. 2016, Dzierżyńska-Białończyk i in. 2019). W niniejszym badaniu, w 24 godzinnych testach stwierdzono ten efekt w przypadku narażenia badanych gatunków małży na wszystkie testowane leki. Zauważyć jednak należy, że reakcja małży na najniższe zastosowane dawki (odpowiadające stężeniom środowiskowym) była najczęściej niewielka i manifestowała się krótkotrwałym przymknięciem muszli i ograniczeniem aktywności filtracyjnej populacji małży. Podobnie ograniczoną reakcją unikania wykazywały testowane gatunki na stężenia 10 krotnie wyższe. W kilku eksperymentach z niskimi testowanymi dawkami farmaceutyków (np. *S. woodiana* 0,3 µg PCM L<sup>-1</sup>, *A. anatina* 10 µg IBU L<sup>-1</sup>) rozwarcie skorup i aktywność filtracyjna małży po narażeniu na farmaceutyki była nieznacznie wyższa niż w okresie kontrolnym. W eksperymencie z narażeniem *A. anatina* na 1 µg DCF L<sup>-1</sup> średnie rozwarcie skorup populacji małży było nawet istotnie statystycznie wyższe niż w okresie kontrolnym. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być fakt, iż niesteroidowe leki przeciwzapalne wydają się mieć zdolność hamowania stanów zapalnych u mięczaków (Żbikowska i in. 2017). Narażenie na najwyższe stężenia badanych farmaceutyków wywoływało gwałtowne zmniejszenie średniego rozwarcia muszli oraz ograniczenie aktywności filtracyjnej i oddechowej testowych populacji małży. Zwłaszcza w przypadku rodzimych gatunków *A. anatina* i *U. tumidus* narażenie na najwyższe stężenia PCM, DCF oraz IBU powodowało istotne statystycznie ograniczenie średniego rozwarcia skorup. Subchroniczne - pięciodniowe testy z najwyższymi stężeniami farmaceutyków udowodniły, że efekt unikania stresu chemicznego utrzymuje się przez dłuższy czas. Podobne efekty oddziaływania IBU na skójkę zaostrzoną (*U. tumidus*) uzyskali Chmist-Sikorska i in. (2020). Wzrastające stężenie farmaceutyku w wodzie powodowało intensywniejszą reakcję unikania stresu chemicznego – ograniczenie średniego otwarcia skorup populacji.

Podstawowym celem badań było określenie możliwości wykorzystania małży z rodzaju *Unio* do detekcji zanieczyszczenia wód niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi w ramach biologicznego systemu wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniami. Małże są uważane za idealne wskaźniki biologiczne do monitorowania antropogenicznego zanieczyszczenia wód (Beyer i in. 2017, Li i in. 2019), ponieważ spełniają prawie wszystkie wymagane kryteria dla przydatnych gatunków bioindykatorów. W systemach monitoringowych opartych o analizę zmian otwarcia skorup małży w odpowiedzi na pojawienie się stresu chemicznego, reakcją na ekspozycję na substancje toksyczne, uważaną za poziom alarmowy, jest zmniejszenie średniego otwarcia skorup populacji poniżej 20% (Kramer i Fokema 2001, Iummato i in,

2018). Przyjmując to kryterium należy stwierdzić, że badane gatunki małży nie są dobrymi indykatorami zanieczyszczenia wody paracetamolem, diklofenakiem i ibuprofenem. Dotyczy to zarówno stężeń środowiskowych tych farmaceutyków, jak i stężeń 10 i 100 krotnie wyższych. Dla stężeń stukrotnie przekraczających wartości środowiskowe, minimalne średnie wartości rozwarcia skorup małży nie były nigdy niższe niż 27% (*Anodonta anatina* eksponowana na 30 µg PCM L-1). Najczęściej odnotowywane minimalne wartości przekraczały 30% i często występowały kilka godzin po dodaniu farmaceutyku.

### **Weryfikacja hipotez badawczych**

*H1: Narażenie małży na badane farmaceutyki będzie skutkowało ograniczeniem ich aktywności filtracyjnej. Redukcja aktywności będzie występowała już przy narażeniu na niewielkie stężenia leków, a intensywność reakcji będzie się zwiększała wraz ze wzrostem koncentracji leków.*

Hipoteza została częściowo zweryfikowana pozytywnie. Stwierdzono bowiem reakcję w postaci redukcji aktywności filtracyjnej małży w reakcji na narażenie na badane farmaceutyki. Ponadto wzrost stężenia leku magnifikował reakcję unikania. Jednak w przypadku najniższych testowanych stężeń farmaceutyków, odpowiadających koncentracjom obserwowanym w środowisku wodnym, ograniczenie aktywności filtracyjnej nie występowało bądź było bardzo nieznaczne.

*H2: Reakcja małży na stężenia farmaceutyków odnotowywane w środowisku będzie wystarczająco intensywna, by mogły być one zastosowane do detekcji zanieczyszczenia wód farmaceutykami w ramach systemów wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem.*

Hipoteza została zweryfikowana negatywnie, gdyż narażenie badanych gatunków małży na paracetamol, ibuprofen i diklofenak w stężeniach, które odnotowywane są w wodach powierzchniowych oraz ich 10 i 100 krotnej multiplikacji nie wywoływało istotnej reakcji w postaci gwałtownego i silnego (poniżej 20%) ograniczania aktywności filtracyjnej. Oznacza to, że małże nie mogą być wykorzystane do detekcji zanieczyszczenia wód tymi farmaceutykami w ramach systemów wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem.

*H3: Redukcja aktywności filtracyjnej inwazyjnego gatunku *Sinanodonta woodiana* w reakcji na zanieczyszczenie wód badanymi farmaceutykami będzie mniej intensywna w porównaniu z rodzimymi gatunkami małży skójkowatych.*

Hipoteza została zweryfikowana pozytywnie: reakcja ograniczenia aktywności filtracyjnej *S. woodiana* w odpowiedzi na narażenie na różne stężenia paracetamolu, ibuprofenu i diklofenaku była mniej intensywna w porównaniu do reakcji *A. anatina* oraz *U. tumidus*.

## 7. Wpływ koagulantu żelazowego na behavior, stechiometrię chemiczną i biochemię małży z rodziny Unionidae

### 7.1. Wstęp

Ponad 50% akwenów wodnych w Europie znajduje się w złym stanie ekologicznym i chemicznym, a w Europie Środkowej szacuje się, że liczba ta przekracza nawet 80% (Rücker i in. 2019, Klimaszyk i Gołdyn 2020, Wuijts i in. 2021). Ciągłe pogarszający się stan chemiczny i ekologiczny ekosystemów wodnych budzi globalne obawy i doprowadził do powstania i implementacji międzynarodowych regulacji prawnych mających na celu ochronę i przywracanie zasobów wodnych, np. Europejska Ramowa Dyrektywa Wodna, Europejska Dyrektywa Ramowa w sprawie Strategii Morskiej, Ustawa o Czystej Wodzie w Stanach Zjednoczonych oraz Ustawa o Oceanach w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie (Amiard-Triquet i in. 2015). W Unii Europejskiej najważniejszym aktem prawnym koordynującym istniejące przepisy dotyczące wód jest Ramowa Dyrektywa Wodna. Zgodnie z nią, wszystkie wody w krajach Unii Europejskiej (UE) powinny osiągnąć dobry stan ekologiczny do 2027 roku (Rücker i in. 2019). By spełnić założenia Dyrektywy: poprawić jakość wody i jednocześnie stan ekologiczny ekosystemów słodkowodnych, konieczne jest zastosowanie skutecznych środków rekultywacyjnych. Metody rekultywacji są bardzo zróżnicowane, począwszy od biologicznych, które ingerują w łańcuchy troficzne, przez metody techniczne – dostarczanie tlenu do głębokich warstw jezior lub usuwanie osadów, aż po metody chemiczne (Cooke i in. 2005, Gołdyn i in. 2014). Często stosuje się jednocześnie wiele metod, aby osiągnąć główny cel – obniżenie trofii ekosystemu (Flaim i in. 2016, Rosińska i in. 2017).

Wśród metod chemicznych, jedną z najczęściej stosowanych jest inaktywacja fosforu poprzez dawkowanie kwaśnych roztworów soli żelaza ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeCl}_2$  i  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) i rzadziej glinu (Al) do wody lub osadów. Celem głównym tych zabiegów jest wytrącenie fosforanów z toni wodnej lub wód nadosadowych i związanie ich w złożone, trudno rozpuszczalne związki chemiczne (Dunalska i Wiśniewski 2016, Lürling i Oosterhout 2013). Chemiczna inaktywacja fosforu prowadzi do niemal natychmiastowej poprawy jakości wody przy stosunkowo niskich kosztach (Jančula i Maršálek 2011). Jednakże, efekty stosowania koagulantów nie są dokładnie rozpoznane, a skala ryzyka środowiskowego wynikająca z dostarczania do ekosystemu wodnego allochtonicznych substancji chemicznych nie jest w pełni zrozumiana (Hilt i in. 2006, Rosińska i in. 2017). Obserwacje wskazują, że zastosowanie koagulantów może drastycznie zmieniać właściwości chemiczne wody – obniżając jej odczyn. Oprócz zakwaszenia,

dozowanie koagulantów zaburzać może także warunki świetlne (w wyniku tworzenia i sedymentacji koagulującej materii) i zwiększać zasolenie w wyniku dostawy znacznych ilości jonów, na których opiera się koagulant.

Podczas gdy żelazo jest niezbędnym pierwiastkiem dla producentów pierwotnych (uczestniczy w fotosyntezie i syntezie chlorofilu) oraz organizmów heterotroficznych (składnik wielu enzymów i hemoglobiny), po przekroczeniu limitu staje się toksyczne (Bakker i in. 2016). Nieliczne badania wskazują, że zabiegi chemiczne mogą mieć negatywny wpływ na biocenozę wodne (Bonisławska i in. 2021, 2012, Piasecki i Zacharzewski 2010, Rybak i in. 2020a, Rybak i Joniak 2018). W roślinach, narażenie na wysokie stężenia Fe prowadzi do stresu oksydacyjnego objawiającego się uszkodzeniem błon komórkowych, odpowiada za chlorozy i zmiany o charakterze nekrotycznym, prowadzi do zahamowania wzrostu oraz pogorszenia statusu troficznego, a w konsekwencji do śmierci osobników (Immers i in. 2014, Rybak i in. 2020a). U zwierząt nadmiar Fe może zaburzać integralność błon komórkowych, powodować uszkodzenia DNA oraz generować peroksydację lipidów. Może to prowadzić do zmian behawioralnych, zmniejszenia liczby potomstwa i ich żywotności (Slaninova i in. 2014, Sotero-Santos i in. 2007). Zaburzenia spowodowane przez koagulanty występujące w organizmach wodnych mogą wpływać na kondycję całych populacji i w konsekwencji prowadzić do przebudowy całej sieci troficznej ekosystemu (Bakker i in. 2016).

**Celem badania** było określenie, czy zastosowanie zróżnicowanych dawek (stosowanych w praktyce rekultywacyjnej) koagulantu żelazowego może:

- zakłócać behavior filtracyjny i oddechowy małży skójkowatych
- wywoływać stres oksydacyjny w komórkach małży skójkowatych
- prowadzić do zmian w stechiometrii ich ciał.

**Postawiono i weryfikowano następujące hipotezy badawcze:**

**H1:** *Koagulant żelazowy ( $FeCl_3$ ) stosowany w rekultywacji zbiorników wodnych będzie zaburzał aktywność filtracyjną małży *Unio tumidus* i *Anodonta cygnea*. Stopień redukcji aktywności filtracyjnej małży będzie zależny od dawek zastosowanego koagulantu.*

**H2:** *Koagulant żelazowy będzie wywoływał stres oksydacyjny w komórkach małży narażonych na jego działanie.*

**H3:** *Narażenie małży na koagulant żelazowy będzie wywoływało zaburzenia stechiometrii chemicznej ciał małży.*



## 7.2. Metodyka

Badania prowadzono na dwóch gatunkach małży: szczeżui wielkiej *Anodonta cygnea* oraz skóje zaostrzonej *Unio tumidus*. Testowano reakcje behawioralną (zmiany aktywności filtracyjnej) w 5 dniowym teście na różne stężenia koagulantu żelazowego. Chlorek żelazowy ( $\text{FeCl}_3$ ) był dawkowany w stężeniach: 2, 5, 10, 15, 20 g Fe m<sup>-2</sup>, w eksperymentach opisanych jako C1, C2, C3, C4, C5. Stężenia dobrano według danych odnotowanych w opisach rzeczywistych zabiegów rekultywacyjnych.

Badania zmian w stechiometrii ciał osobników i analizy stresu oksydacyjnego wykonano po narażeniu małży na te same stężenia koagulantu.

## 7.3. Wyniki

Dawkowanie koagulantu żelazowego znacząco zmieniło właściwości fizyczne i chemiczne wody. Po jednym dniu od zastosowania, pH wody obniżyło się proporcjonalnie do dawki. W eksperymentach z obydwoma gatunkami małży pH spadło z  $8,4 \pm 0,1$  w kontroli do  $7,19 \pm 0,21$  w badaniu C1 *A. cygnea* i do  $7,70 \pm 0,13$  u *U. tumidus*. Przy najwyższym stężeniu koagulantu pH spadło odpowiednio do  $2,98 \pm 0,01$  i  $2,84 \pm 0,01$ . Powrót do neutralnego odczynu nastąpił w ciągu 8 dni w wariantach *A. cygnea* i po 12 dniach w wariantach *U. tumidus*. Również przewodność elektryczna wody po dodaniu koagulantu żelazowego wzrosła znacząco w porównaniu do próby kontrolnej. Wzrost przewodnictwa był proporcjonalny do zastosowanych dawek. Dodanie koagulantu spowodowało także całkowitą redukcję fosforu z toni wodnej i oprócz eksperymentu z najniższą dawką koagulantu stan ten utrzymywał się do końca badania. W trakcie trwania eksperymentu zaobserwowano wytrącanie się kłaczków, które ulegały sedymentacji pokrywając dno zbiornika rdzawą warstwą.

Badania aktywności filtracyjnej wykazały, że zastosowanie koagulantu żelazowego może modyfikować behawior filtracyjny małży. W eksperymencie z *A. cygnea*, średni stopień otwarcia muszli podczas okresu kontrolnego w wariacie C1 był niemal równy temu z okresu badawczego (~60%). Niemniej jednak analiza statystyczna wykazała istotną różnicę między okresem kontrolnym a badawczym ( $H = 6,88$ ,  $p < 0,05$ ). W wariacie C2, procent otwarcia muszli stopniowo zmniejszał się w okresie badawczym do około 40% trzeciego dnia. W wariacie C3 wszystkie osobniki gwałtownie zmniejszyły otwarcie muszli po zastosowaniu koagulantu z ~80% do 20%. W kolejnych dniach eksperymentu wszystkie osobniki okresowo otwierały muszle, aby filtrować wodę, jednak średnie otwarcie populacji tylko nieznacznie przekraczało 25%. Po zastosowaniu najwyższych dawek koagulantu (C4 i C5) zamknięcie

muszli i redukcja aktywności filtracyjnej były natychmiastowe i gwałtowne. Dla większości testowanych osobników muszle pozostawały zamknięte a średnie otwarcie skorup dla wszystkich małży wynosiło poniżej 10%. (Publikacja 1, Rys. 2). Podobny wzór zachowań w reakcji na zastosowanie koagulantu żelazowego zaobserwowano u *U. tumidus* (Publikacja 1, Rys. 3). Przy najniższym stężeniu (C1) reakcja małży na zastosowanie koagulantu była niewielka, ale istotna statystycznie ( $p < 0,001$ ). W kolejnych eksperymentach (C2 - C5) stopień otwarcia muszli znacząco się zmniejszył. W wariantach C2 i C3 średnie otwarcie małży w trakcie całego eksperymentu było mniejsze o ~50% w porównaniu z okresem kontrolnym. Przy najwyższych stężeniach (C4 i C5) reakcja małży na zastosowanie koagulantu była gwałtowna. W pierwszych godzinach wszystkie osobniki zamknęły swoje muszle i pozostawały zamknięte przez 24 godziny. Po jednym dniu pojedyncze osobniki próbowały filtrować wodę, ale średnie otwarcie w badanej populacji nie przekroczyło ~10% i 25% odpowiednio dla C4 i C5 (Publikacja 1, Rys. 3).

Pomimo pewnych różnic między testowanymi gatunkami małży, zaobserwowano podobne wzorce zmian w składzie pierwiastkowym ich ciała w odpowiedzi na różne stężenia koagulantu (Publikacja 1, Rys. 4). Najbardziej wyraźne zmiany zaobserwowano w przypadku zawartości żelaza. Ekspozycja na różne stężenia koagulantu spowodowała znaczący wzrost zawartości Fe w mięśniach zarówno *A. cygnea*, jak i *U. tumidus*. Stężenie Fe w mięśniach małży, które nie były wystawione na działanie koagulantu, wynosiło około 0,3 g Fe kg<sup>-1</sup> suchej masy. Natomiast u osobników narażonych na najwyższe stężenie koagulantu wynosiło średnio około 1,7 g Fe kg<sup>-1</sup> suchej masy, a znaczący wzrost zawartości Fe w mięśniach odnotowano dla dwóch najwyższych dawek koagulantu zastosowanych w eksperymencie (Publikacja 1, Rys. 4). Ekspozycja na wysokie dawki koagulantu Fe spowodowała znaczący spadek zawartości fosforu w tkance mięśniowej zarówno *A. cygnea* i *U. tumidus*. Podobnie jak w przypadku Fe, najbardziej znaczące zmiany odnotowano przy najwyższym stężeniu koagulantu. Podobny trend zaobserwowano w przypadku wapnia.

Pomimo zaburzeń behawioru filtracyjnego oraz zmian w stechiometrii ciała przeprowadzone badania nie wykazały wzrostu poziomu markerów stresu oksydacyjnego po narażeniu zarówno *A. cygnea* jak i *U. tumidus* na koagulant żelazowy.

#### 7.4. Dyskusja i konkluzje

Poprzednie nieliczne badania dotyczące stosowania koagulantów żelazowych wykazały, że mają one znaczący wpływ na organizmy wodne. W przypadku roślin zanurzonych wpływają one bezpośrednio poprzez toksyczność Fe (martwica, zmniejszenie rozmnażania generatywnego, zaburzenie homeostazy stechiometrycznej) oraz pośrednio poprzez silną zmianę warunków środowiskowych, prowadzącą do zaburzeń wzrostu (Immers i in. 2014, Rybak i in. 2020b, 2020a). W przypadku zooplanktonu wykazano, że koagulanty żelazowe wywołują zależną od dawki redukcję wzrostu i zwiększają śmiertelność *Daphnia magna* (Piasecki i Zacharzewski 2010, van Anholt i in. 2002). U ryb stwierdzono zaś zwiększoną częstotliwość występowania wad rozwojowych larw i zaburzenia embriogenezy, a także zmniejszoną przeżywalność zarodków po ekspozycji na koagulant żelazowy (Bonisławska i in. 2021, 2012). Dodatkowo, udowodniono że Fe gromadzące się na skrzelach ryb i makrobezkręgowców mogą prowadzić do zaburzenia wymiany gazowej (Gerhardt 1992). Pośrednie skutki działania koagulantów obejmują zmiany struktury i jakości siedlisk dennych z powodu sedymentacji nierozpuszczalnych związków Fe, co prowadzi do zniszczenia miejsc rozrodu, a co za tym idzie wpływa na sukces reprodukcyjny zwierząt (Rasmussen i Lindegaard 1988). Choć żelazo, będące podstawowym składnikiem koagulantów jest niezbędne dla wszystkich organizmów żywych. Jednak powyżej „okna niezbędności” staje się toksyczne i powoduje stres oksydacyjny, uszkodzając błony komórkowe, białka, barwniki i DNA (Keller i in. 2012). Na poziomie komórkowym u zwierząt zakłóca procesy trawienne, wpływa na zachowanie, zmienia strategię cyklu życiowego oraz zmniejsza liczbę potomstwa i jego przeżywalność (van Anholt i in. 2002). Niniejsze badania wykazały, że narażenie małży na wysokie dawki żelaza dostarczanego wraz z koagulantem powoduje zaburzenie homeostazy stechiometrycznej w tkankach, co skutkuje dalszymi zaburzeniami biochemicznymi czy fizjologicznymi. Zaobserwowano także spadek zawartości stężenia wapnia w tkance mięśniowej małży narażonych na kontakt z koagulantem. Przyczyną tego zjawiska może być fakt, iż małże w warunkach stresu kwasowego zwiększają stężenie Ca w hemolimfie i uwalniają jego jony do wody, co jednocześnie prowadzi do zaburzeń w pobieraniu wapnia (Pynnönen 1990, Wood i Rogano 1986). Mechanizm ten prawdopodobnie przeciwdziała kwasicy hemolimfy, a źródłem jonów Ca jest płaszcz lub muszla, które stanowią rezerwuar materiałów buforujących. Małże pozyskują pewną ilość Ca z pożywienia, jednak większość jest pobierana przez skrzela z wody (Pynnönen 1991).

W niniejszym badaniu dowiedziono, że zastosowanie koagulantu żelazowego powoduje transformacje środowiska abiotycznego, charakterystyczne dla tej metody rekultywacji – okresowe zakwaszenie wody i wzrost zasolenia, które są nierozzerwalnie związane z koagulacją fosforanów (Immers i in. 2013, Rybak i in. 2020b). Efekty zakwaszenia w środowisku jeziornym są wielowymiarowe. Obejmują one głównie zwiększenie rozpuszczalności i toksyczności metali na skutek ich uwolnienia z osadów dennych oraz zmiany hydrochemiczne w bilansie dwutlenku węgla i wodorowęglanów (Brouwer i in. 2002). Nadmiar jonów  $H^+$ , prowadzący do zakwaszenia, może przenikać do ciała małży i powodować kwasicę, utratę elektrolitów oraz problemy oddechowe związane z nadmierną produkcją śluzu (Pynnönen 1990, Wood i Rogano 1986). Jako wolno poruszające się organizmy, małże mogą unikać niekorzystnych warunków środowiskowych jedynie przez zamknięcie skorup. Jednak zamknięcie muszli jako ochrona przed nadmiarem jonów  $H^+$  powoduje przejście na metabolizm beztlenowy, co prowadzi do akumulacji kwaśnych metabolitów i spadku pH hemolimfy (Holwerda i Veenhof 1984, Pynnönen 1991). Ponadto zakwaszenie i związane z tym zwiększone wydzielanie śluzu, który pokrywa skrzela, ogranicza wymianę gazową, co powoduje niedotlenienie i postępującą kwasicę. Długotrwałe zamknięcie skorup skutkuje również zmniejszonym pobieraniem pokarmu. W niniejszym badaniu wykazano, że zmiana warunków środowiskowych wynikająca z dawkowania koagulantów wywołuje reakcję unikania - zamknięcie muszli i ograniczenie procesu filtracji wody. Gwałtowność, nasilenie i czas trwania tej reakcji zależy od zastosowanej dawki koagulantu. Przy najwyższych testowanych dawkach obserwowano długotrwałe, niemal całkowite ograniczenie procesu filtracyjnego.

Konkludując stwierdzić należy, że chemiczna rekultywacja jezior z zastosowaniem koagulantu żelazowego może negatywnie wpływać na małże z rodziny Unionidae.

### **Weryfikacja hipotez badawczych**

***H1:** Koagulant żelazowy ( $FeCl_3$ ) stosowany w rekultywacji zbiorników wodnych będzie zaburzał aktywność filtracyjną małży *U. tumidus* i *Anodonta cygnea*. Stopień redukcji aktywności filtracyjnej małży będzie zależny od dawek zastosowanego koagulantu.*

Hipoteza została zweryfikowana pozytywnie, stwierdzono zależne od zastosowanej dawki koagulantu ograniczenie aktywności filtracyjnej małży.

**H2:** *Koagulant żelazowy będzie wywoływał stres oksydacyjny w komórkach małży narażonych na jego działanie.*

Hipoteza została zweryfikowana negatywnie, nie odnotowano symptomów stresu oksydacyjnego w trakcie subchronicznego narażenia małży na badanie stężenia koagulantu żelazowego.

**H3:** *Narażenie małży na koagulant żelazowy będzie wywoływało zaburzenia stechiometrii chemicznej ciał małży.*

Hipoteza została zweryfikowana pozytywnie, odnotowano zależne od dawki zaburzenia stechiometrii chemicznej: kumulacji żelaza oraz spadku zawartości fosforu i wapnia w mięśniach małży.

## **8. Behawioralne i biochemiczne efekty herbicydu Roundup opartego na glifosacie na małże z rodziny Unionidae**

### **8.1. Wstęp**

Badania dotyczące wpływu zanieczyszczenia wód pestycydami na organizmy niebędące celem ich stosowania są liczne (Relyea 2005). Już niskie stężenia pestycydów mogą być śmiertelne lub powodować zmiany behawioralne (Adamski i in. 2023), spowolnienie wzrostu (Williams i in. 2012) lub częstsze występowanie anomalii rozwojowych (Lajmanovich i in. 2003). Dodatkowo mogą potęgować efekty innych czynników stresowych w ekosystemach wodnych (Moulton i in. 1996, Jacquin i in. 2019). Istnieje jednak szereg badań, w których nie wykazano istotnego wpływu zanieczyszczenia wód pestycydami na organizmy wodne (Relyea 2005).

Glifosat (GLY) jest powszechnie stosowanym, nieselektywnym składnikiem aktywnym w wielu pestycydach używanych do zwalczania chwastów w rolnictwie i obszarach miejskich. Jego działanie polega na hamowaniu enzymu syntazy EPSP (syntaza 5-enolopirogronianoszikimowo-3-fosforanowa), który nie występuje u zwierząt, co sprawia, że substancja jest uważana za potencjalnie dla nich nieszkodliwą. Glifosat jest dostępny na globalnym rynku w różnych formułach. Najpopularniejszym z nich jest Roundup® (RDP). Produkty tego typu zawierają nie tylko różne stężenia GLY, ale także środki pomocnicze np. surfaktanty, których zadaniem jest zwiększanie skuteczności działania herbicydu (Annett i in. 2014). Wiele badań wykazało, że to właśnie surfaktanty w dużej mierze odpowiadają u ludzi i zwierząt, w tym organizmów wodnych za toksyczne działanie środków opartych o GLY (Seok i in. 2011, Mesnage i in. 2019). Niewątpliwie toksyczność pestycydów opartych o GLY w stosunku do organizmów wodnych jest wynikiem działania zarówno samego glifosatu, jak i surfaktantów, ale także od czynników środowiskowych, takich jak temperatura i pH (Ujszegi i in. 2015, Folmar i in. 1979, Tsui i in. 2003).

Teoretycznie mobilność środowiskowa GLY jest niewielka gdyż po dostaniu się do gleby GLY trwale wiąże się z materią organiczną stając się również mniej biologicznie dostępnym (Solomon i in. 2003, Vereecken 2005, Rzymiski i in. 2013). Dodatkowo jest on szybko rozkładany przez mikroorganizmy glebowe. Jednak w związku z wysoką rozpuszczalnością GLY może być transferowany do wód powierzchniowych i gruntowych. W celu zwalczania niepożądanych makrofitów, herbicydy zawierające GLY są czasami stosowane bezpośrednio w ekosystemach słodkowodnych, co może prowadzić do występowania tam

wysokich stężeń tej substancji (Rzymiski i in. 2013, Ujszegi i in. 2015, Matozzo i in. 2019). W wodzie glifosat ulega jonizacji i jako anion jest silnie absorbowany przez seston i osady, co czyni go szczególnie toksycznym dla organizmów dennych oraz gatunków odżywiających się zawiesiną (Adamski i in. 2023). Małże jako filtratory bentosowe są więc grupą szczególnie narażoną na obecność GLY i jego metabolitów w wodach.

Celem przeprowadzonego badania było określenie wpływu różnych stężeń herbicydu Roundup 360 Plus na aktywność filtracyjną dwóch gatunków małży skójkowatych: *Anodonta anatina* i *Unio tumidus* oraz zbadanie wpływu tego herbicydu na poziom stresu oksydacyjnego w komórkach małży.

### **Postawiono i testowano następujące hipotezy badawcze:**

**H1:** *Narażenie małży na RDP będzie powodowało ograniczenie ich aktywności filtracyjnej. Redukcja aktywności będzie występowała już przy narażeniu na niewielkie stężenie herbicydu, a intensywność reakcji unikania zwiększy się wraz ze wzrostem koncentracji RDP.*

**H2:** *Reakcja małży na stężenia RDP odpowiadająca koncentracji odnotowywanej w środowisku będzie wystarczająco intensywna, by mogły być one zastosowane do detekcji zanieczyszczenia wód RDP w ramach systemów wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem.*

**H3:** *Narażenie małży na Roundup będzie wywoływało stres oksydacyjny w ich komórkach.*

## **8.2. Metodyka**

Badania prowadzono dla 3 stężeń RDP, przeliczonych na stężenie zawartego w nim glifosatu: 15  $\mu\text{g GLY L}^{-1}$  jako koncentracji spotykanej w ekosystemach wodnych zanieczyszczonych tą substancją (Brovini i in. 2021, Alexa i in. 2008) oraz 10 i 100 krotną multiplikacją (150, 1500  $\mu\text{g GLY L}^{-1}$ ). Dla obydwu gatunków małży przeprowadzono subchroniczne 5 dniowe testy narażenia na RDP.

### 8.3. Wyniki

Najniższe badane stężenie RDP ( $15 \mu\text{g GLY L}^{-1}$ ) spowodowało u *A. anatina* około 1,5 godzinny spadek średniego otwarcia muszli z 70% do 43%. Reakcja *U. tumidus* była mniej gwałtowna, po ekspozycji zaobserwowano kilkugodzinny spadek średniego otwarcia muszli z 70% do 55% (Publikacja 2, Rys. 4). W kolejnych dniach eksperymentu średnie otwarcie muszli obu gatunków fluktuowało, jednak minimalne otwarcie nie było niższe niż 40%. Pomimo, że różnice w średnim otwarciu muszli w poszczególnych dniach eksperymentu były niewielkie, to analiza statystyczna ujawniła istotną różnicę pomiędzy okresem kontrolnym a badawczym (Publikacja 2, Rys. 4).

RDP w stężeniu  $150 \mu\text{g GLY L}^{-1}$  spowodował bardzo szybki spadek aktywności filtracyjnej u *A. anatina*. Średnie otwarcie muszli w ciągu kilku minut zmniejszyło się z 82% do 14% a większość osobników całkowicie zaprzestała filtracji. Po kilku godzinach aktywność filtracyjna zaczęła rosnąć, by drugiej doby osiągnąć 40% a w kolejnych dniach około 60%. U *U. tumidus* zmniejszenie aktywności filtracyjnej było nieco mniej zauważalne, z minimalnym średnim otwarciem muszli wynoszącym 24% około godzinę po narażeniu na RDP. Analiza statystyczna ujawniła istotną różnicę w otwarciu muszli między okresem kontrolnym a badawczym.

RDP w najwyższym podanym stężeniu  $1500 \mu\text{g GLY L}^{-1}$  skutkowałam szybkim i długotrwałym spadkiem aktywności filtracyjnej u obu gatunków. Dawka herbicydu w ciągu kilku minut spowodowała całkowite zamknięcie muszli u *A. anatina* oraz *U. tumidus*. W pierwszych 24 godzinach średnie otwarcie skorup małży nie przekroczyło 20%. W ciągu kolejnych dni eksperymentów średnia aktywność filtracyjna obydwu gatunków małży stopniowo rosła. Jednak średnie otwarcie skorup małży ostatniego dnia eksperymentu (*A. anatina* 45%, *U. tumidus* 54%) było znacznie niższe w porównaniu do okresu kontrolnego, gdy małże nie były narażone na RDP. Podobnie jak w przypadku dziesięciokrotnie mniejszego stężenia, analiza statystyczna (ANOVA i test post-hoc Dunna) wykazała istotną statystycznie różnicę w średnim otwarciu muszli między okresem kontrolnym a każdym dniem po ekspozycji na RDP dla obu gatunków (Publikacja 2, Rys. 4).

Ekspozycja na herbicyd RDP zwiększyła aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) u obu badanych gatunków małży. *A. anatina*, w porównaniu do grupy kontrolnej, wykazała największy wzrost aktywności SOD przy ekspozycji na najniższe spośród badanych stężenie RDP. Natomiast w przypadku *U. tumidus* najwyższą aktywność SOD stwierdzono przy



najwyższym stężeniu RDP (Publikacja 2, Rys. 5). Analiza statystyczna nie ujawniła istotnych różnic w aktywności SOD między grupą kontrolną a grupami testowymi.

*A. anatina* miała również podwyższony poziom markerów stresu oksydacyjnego (TBARS) przy stężeniu 150 mg GLY L<sup>-1</sup> oraz 150% wzrost przy najwyższym stężeniu 1500 mg GLY L<sup>-1</sup> w porównaniu do grupy kontrolnej. U *U. tumidus* najwyższy poziom markeru TBARS odnotowano przy najniższym stężeniu RDP (Publikacja 2, Rys. 5). Tu również analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w poziomie markera między grupą kontrolną a grupami testowymi.

#### 8.4. Dyskusja

Liczne badania nad wpływem glifosatu i herbicydów opartych na jego bazie na organizmy wodne wykazały różnorodne negatywne skutki zarówno u organizmów kręgowych jak i bezkręgowców. Narażenie ryb na GLY wywołuje różne negatywne efekty, w tym: zaburzenia procesów hematologicznych i biochemicznych, efekty genotoksyczne, immunotoksyczne, kardiotoxyczne oraz różnorodne zmiany histopatologiczne. U wodnych gatunków bezkręgowych wykazano, iż narażenie na GLY może wiązać się ze zmianami w procesach biochemicznych, zmianami rozwojowymi, zmianami w zachowaniu, modyfikacjami w składzie hemolimfy czy wpływem na układ rozrodczy. (Adamski i in. 2023, Matozzo i in. 2019, Annett 2014, Folmar i in. 1979, Tresnakova i in. 2021, Sandrini i in. 2013). Jednak większość tych obserwacji pochodzi z testów z wyższymi dawkami niż te występujące naturalnie i tymi, które zostały zastosowane w niniejszym badaniu. Z drugiej strony zaznaczyć trzeba, że w prezentowanym badaniu zastosowano herbicyd Roundup 360 Plus, który jest mieszaniną GLY i środka powierzchniowo czynnego POEA. Ekspozycja na mieszaninę POEA i GLY zwiększa zarówno bioakumulację GLY w organizmach wodnych, jak i skalę jego toksycznego działania (Folmar i in. 1979, Annett i in. 2014). W porównaniu z GLY, stężenia śmiertelne (LC50) mieszaniny POEA+GLY są wielokrotnie wyższe dla ryb i płazów (Tresnakova i in. 2021). Przeprowadzone w niniejszej pracy eksperymenty wykazały, że ekspozycja na Roundup 360 Plus wpłynęła na behavior filtracyjny u obu badanych gatunków małży, a ograniczenie aktywności filtracyjnej było zależnie od dawki herbicydu. Przy najniższym badanym stężeniu herbicydu (15 µg GLY L<sup>-1</sup>) redukcja średniego otwarcia muszli, zarówno u *A. anatina* jak i *U. tumidus* była zauważalna choć stosunkowo niewielka i krótkotrwała. Podobne wyniki odnotowano w innych badaniach, gdzie zaobserwowano brak znaczącego wpływu środowiskowych stężeń pestycydów na aktywność filtracyjną małży

(Chmist 2019). Jednak przy wyższym stężeniu Roundupu ( $150 \mu\text{g GLY L}^{-1}$ ), reakcja małży była znacznie bardziej intensywna a zamknięcie muszli trwało dłużej. Filtracja stopniowo wracała do normy przed herbicydowej po jednym dniu dla *A. anatina* i po dwóch dniach dla *U. tumidus*. Wynika to prawdopodobnie ze zdolności małży do zmniejszenia ładunków GLY w wodzie (Di Fiori 2012 i in., Pizarro i in. 2016). Najwyższe stężenie herbicydu ( $1500 \mu\text{g GLY L}^{-1}$ ) spowodowało drastyczne i długotrwałe zamknięcie muszli, a także znaczące zmniejszenie tempa ich otwierania. Zmniejszona aktywność ruchowa małży po długim okresie zamknięcia muszli była związana z zmęczeniem mięśnia przywodziciela (Chmist i in. 2019, Le Bris i in. 1995, Bolton-Warberg i in. 2007). W trakcie wszystkich testów nie zaobserwowano śmiertelności małży ani całkowitego rozluźnienia mięśni przywodziciela, objawów, które występują przy długotrwałej ekspozycji małży na toksyny (Chmist 2019).

Badania wykazały, że narażenie zwierząt wodnych na glifosat i komercyjne herbicydy takie jak Roundup może wywoływać stres oksydacyjny (Tanguy i in. 2005, Cavalcante i in. 2008, Iummato i in. 2013, Uren Webster i in. 2014, Telahigue i in. 2022). W niniejszym badaniu nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w aktywności SOD ani uszkodzeń oksydacyjnych mierzonych peroksydacją lipidów pomiędzy grupą kontrolną a małżami ekspozowanymi na różne stężenia RDP. Podobne wyniki uzyskano dla *L. fortune*, gdzie aktywność katalazy, SOD i acetylocholinoesterazy nie różniła się między osobnikami narażonymi i nienarażonymi na ten herbicyd. Zamiast tego, w odpowiedzi na GLY wzrosła aktywność innych enzymów detoksykacyjnych, takich jak GST, karboksylesterazy (CES) i ALP (Iummato i in. 2018).

Subchroniczna ekspozycja małży Unionid na herbicyd Roundup wywołuje reakcje behawioralne zależne od dawki. Przy środowiskowo istotnych stężeniach herbicydu zakłócenia w zachowaniu filtracyjnym są niewielkie i krótkotrwałe. Wyższe dawki powodują drastyczne zmniejszenie aktywności filtracyjnej *A. anatina* i *U. tumidus*, wskazując na potencjalne zagrożenie dla populacji małży w sytuacji przypadkowego zanieczyszczenia ekosystemów wodnych. Ekspozycja na Roundup prowadzi do zmian w markerach stresu oksydacyjnego, choć wyniki nie są jednoznaczne *A. anatina* wykazuje bardziej nasilone zmiany behawioralne, co sugeruje większą wrażliwość tego gatunku na Roundup.

## **Weryfikacja hipotez badawczych**

***H1:** Narażenie małży na RDP będzie powodowało ograniczenie ich aktywności filtracyjnej. Redukcja aktywności będzie występowała już przy narażeniu na niewielkie stężenie herbicydu, a intensywność reakcji unikania zwiększy się wraz ze wzrostem koncentracji RDP.*

Hipoteza została zweryfikowana pozytywnie, stwierdzono że ekspozycja małży na badane stężenia herbicydu Roundup 360 Plus prowadziła do zmniejszenia ich aktywności filtracyjnej. Stopień redukcji aktywności filtracyjnej był pozytywnie skorelowany z koncentracją herbicydu

***H2:** Reakcja małży na stężenia RDP odpowiadająca koncentracji odnotowywanej w środowisku będzie wystarczająco intensywna, by mogły być one zastosowane do detekcji zanieczyszczenia wód RDP w ramach systemów wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem.*

Hipoteza zweryfikowana negatywnie gdyż ograniczenie aktywności filtracyjnej małży pod wpływem środowiskowych koncentracji RDP było zbyt małe, by mogło być użyteczne w systemach wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniem. Natomiast małże mogą być wykorzystane do wykrywania incydentalnych zanieczyszczeń wód wysokimi stężeniami Roundupu.

***H3:** Narażenie małży na Roundup będzie wywoływało stres oksydacyjny w ich komórkach.*

Hipoteza została zweryfikowana negatywnie. Choć zaobserwowano zmiany poziomu markerów stresu oksydacyjnego u małży narażonych na RDP, jednak różnice pomiędzy poziomem tych markerów w grupie kontrolnej oraz grupach testowych nie były statystycznie istotne.

## Konkluzje końcowe dysertacji

Założeniem głównym badań była ocena efektów narażenia małży na nowe typy zanieczyszczeń pojawiających się w ekosystemach wodnych. W przypadku każdej z testowanych substancji badania rozpoczynano od koncentracji, które odnotowywane są w środowisku wodnym.

- Wpływ zanieczyszczenia wody paracetamolem, ibuprofenem i diklofenakiem na behavior filtracyjny małży skójkowatych jest nieznaczny. Nawet stężenia 100 krotnie wyższe od tych, które notuje się w środowisku nie wywołują drastycznego i długotrwałego ograniczenia aktywności filtracyjnej. W związku z tym, małże te nie są użyteczne do wykrywania tego typu zanieczyszczeń w systemach wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniami wód.
- Narażenie małży skójkowatych na herbicyd Roundup zawierający czynnik aktywny glifosat już przy niskich stężeniach, które odnotowywane są w wodach powierzchniowych, powoduje zaburzenia ich aktywności filtracyjnej i objawy stresu oksydacyjnego. Ekspozycja na wyższe stężenia herbicydu magnifikuje zakłócenia aktywności filtracyjnej małży. Badane gatunki mogą być przydatne do detekcji zanieczyszczenia wody wysokimi stężeniami glifosatu w ramach systemach wczesnego ostrzegania przed zanieczyszczeniami wód.
- Chemiczna rekultywacja wód z zastosowaniem koagulantu żelazowego może negatywnie wpływać na małże. Zaobserwowano zależne od zastosowanej dawki koagulantu ograniczenie aktywności filtracyjnej i zaburzenia stechiometrii chemicznej tkanki mięśniowej małży.
- Wyniki badań przeprowadzonych na farmaceutykach potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że inwazyjny gatunek *Sinanodonta woodiana* charakteryzuje się wyższą odpornością w stosunku do zanieczyszczeń wód. Jest to cecha, która daje mu przewagę konkurencyjną w stosunku do rodzimych gatunków małży skójkowatych.

Przeprowadzone badania były próbą określenia ostrej bądź subchronicznej toksyczności kilku substancji zanieczyszczających ekosystemy wodne. Stwierdzony brak śmiertelności osobników testowanych gatunków małży, jedynie krótkotrwałe efekty behawioralne czy nieznaczne zaburzenia cykli biochemicznych nie oznaczają, że chroniczne narażenie nawet na niewielkie dawki tych substancji pozostaje obojętne dla długotrwałego zachowania homeostazy populacji małży. Ze względu na globalne i coraz bardziej intensywne stosowanie badanych substancji niezbędne jest kompleksowe zbadanie ich wpływu na małże. Należy

określić toksyczne efekty przewlekłej ekspozycji na farmaceutyki, glifosat i preparaty stosowane w rekultywacji wód oraz tempo i poziom ich akumulacji w tkankach małży. Brakuje też danych na temat wpływu badanych substancji na młodociane stadia małży, które z całą pewnością są bardziej wrażliwe na zaburzenia środowiskowe.

## 9. Bibliografia

1. Adamski, Z., Dziegielewska, A., Jakubiak, P., Klimaszuk, P., 2023. Lethal and Sublethal Effects of Exposure to Roundup 360 Plus for the *Chaoborus Flavicans* Larvae (Diptera: Chaoboridae). *Turkish Journal of Zoology* 47, 103–110; DOI10.55730/1300-0179.3120
2. Ades, M., Adler, R., Aldred, F., Allan, R. P., Anderson, J., Anneville, O., Veasey, S. W., 2022. GLOBAL CLIMATE. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 103(8), S11-S142. doi:10.1175/BAMS-D-22-0092.1
3. Al Aukidy, M., Verlicchi, P., Voulvoulis, N., 2014. A framework for the assessment of the environmental risk posed by pharmaceuticals originating from hospital effluents. *Science of The Total Environment* 493, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.128>
4. Alexa, E., Lăzureanu, A., Alda, S., Negrea, M., Bulmaga, A., 2008. Researches Regarding Elutriation Capacity of Glyphosate Herbicide and of His Methabolit AMPA in Different Types of Soil. *Lucrări Științifice* 51, 501–505
5. Almeida, E. A., Bairy, A. C. D., Dafre, A. L., Gomes, O. F., Medeiros, M. H., & Di Mascio, P., 2005. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 318(1), 21-30.
6. Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Mouneyrac, C., 2015 Predictive Ecotoxicology and Environmental Assessment. *Aquatic Ecotoxicology*, 463-496; <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00019-X>
7. Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides on the Freshwater Environment. *Journal of Applied Toxicology* 34, 458–479; <https://doi.org/10.1002/jat.2997>
8. aus der Beek, T., Weber, F., Bergmann, A., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., 2016. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35, 823–835. <https://doi.org/10.1002/etc.3339>
9. Bagnis, S., Fitzsimons, M.F., Snape, J., Tappin, A., Comber, S., 2018. Processes of distribution of pharmaceuticals in surface freshwaters: implications for risk assessment. *Environmental Chemistry Letters* 16, 1193–1216. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0742-7>
10. Bakker, E.S., Van Donk, E., Immers, A. K., 2016 Lake restoration by in-lake iron

- addition: a synopsis of iron impact on aquatic organisms and shallow lake ecosystems. *Aquatic Ecology* 50, 121-135; <https://doi.org/10.1007/s10452-015-9552-1>
11. Bayen, S., Zhang, H., Desai, M.M., Ooi, S.K., Kelly, B.C., 2013. Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: Influence of hydrodynamics and physical-chemical properties. *Environmental Pollution* 182, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.028>
  12. Benkő-Kiss, Á., Ferincz, Á., Kováts, N., Paulovits, G., 2013. Spread and distribution pattern of *Sinanodonta woodiana* in Lake Balaton. *Knowledge Management of Aquatic Ecosystems* 09. doi:10.1051/kmae/2013043
  13. Beran, L., 2008. Expansion of *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae) in the Czech Republic. *Aquatic Invasions* 3, 91–94. doi:10.3391/ai.2008.3.1.15
  14. Bespalaya, Y., Bolotov, I., Aksenova, O., Kondakov, A., Spitsyn, V., Kogut, Y., Sokolova, S., 2017. Two *Pisidium* species inhabit freshwater lakes of Novaya Zemlya Archipelago: the first molecular evidence. *Polar Biology* 40, 2119–2126. doi:10.1007/s00300-017-2119-y
  15. Beyer, J., Green, N.W., Brooks, S., Allan, I.J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I.L.N., Schøyen, M., 2017. Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Marine Environmental Research* 130, 338–365. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024>
  16. Bielen, A., Bošnjak, I., Sepčić, K., Jaklič, M., Cvitanić, M., Lušić, J., Lajtner, J., Simčić, T., Hudina, S., 2016. Differences in tolerance to anthropogenic stress between invasive and native bivalves. *Science of The Total Environment* 543, 449–459. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.049>
  17. Bogan, A.E., Bowers-Altman, J., Raley, M.E., 2011. The first confirmed record of the Chinese Pond Mussel (*Sinanodonta woodiana*) (Bivalvia: Unionidae) in the United States. *Nautilus (Philadelphia)* 125, 41–43.
  18. Bolotov, I.N., Kondakov, A.V., Konopleva, E.S. et al., 2020. Integrative taxonomy, biogeography and conservation of freshwater mussels (Unionidae) in Russia. *Scientific Reports* 10, 3072 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59867>
  19. Bolton-Warberg, M., Coen, L.D., Weinstein, J.E., 2007. Acute Toxicity and Acetylcholinesterase Inhibition in Grass Shrimp (*Palaemonetes pugio*) and Oysters (*Crassostrea virginica*) Exposed to the Organophosphate Dichlorvos: Laboratory and

- Field Studies. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 207–216; <https://doi.org/10.1007/s00244-005-0325-z>
20. Bonisławska, M., Tański, A., Nędzarek, A., Tórz, A., 2012 Effect of the Coagulants PAX and PIX on the Embryonic Development of Pike (*Esox lucius* L.). *Limnological Review* 12, 125-132; <https://doi.org/10.2478/v10194-012-0052-6>
  21. Bonisławska, M., Rybczyk, A., Tański, A., Nędzarek, A., 2021 Influence of selected precipitating agents used for restoration of water reservoirs on the embryogenesis of pike (*Esox lucius* L.). *Chemosphere* 284, 131349; <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131349>
  22. Bound, J.P., Voulvoulis, N., 2006. Predicted and measured concentrations for selected pharmaceuticals in UK rivers: Implications for risk assessment. *Water Research* 40, 2885–2892. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.036>
  23. Boxall, A.B.A., Rudd, M.A., Brooks, B.W., Caldwell, D.J., Choi, K., Hickmann, S., Innes, E., Ostapyk, K., Staveley, J.P., Verslycke, T., Ankley, G.T., Beazley, K.F., Belanger, S.E., Berninger, J.P., Carriquiriborde, P., Coors, A., DeLeo, P.C., Dyer, S.D., Ericson, J.F., Gagné, F., Giesy, J.P., Gouin, T., Hallstrom, L., Karlsson, M. V., Larsson, D.G.J., Lazorchak, J.M., Mastrocco, F., McLaughlin, A., McMaster, M.E., Meyerhoff, R.D., Moore, R., Parrott, J.L., Snape, J.R., Murray-Smith, R., Servos, M.R., Sibley, P.K., Straub, J.O., Szabo, N.D., Topp, E., Tetreault, G.R., Trudeau, V.L., Van Der Kraak, G., 2012. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? *Environmental Health Perspectives* 120, 1221–1229. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104477>
  24. Brandão, F.P., Pereira, J.L., Gonçalves, F., Nunes B., 2014. The Impact of Paracetamol on Selected Biomarkers of the Mollusc Species *Corbicula fluminea*. *Environmental Toxicology* 29(1). <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20774>
  25. Brouwer, E., Bobbink, R., Roelofs, J.G.M., 2002 Restoration of aquatic macrophyte vegetation in acidified and eutrophied softwater lakes: an overview. *Aquatic Botany* 73, 405-431; [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(02\)00033-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(02)00033-5)
  26. Brovini, E.M., Cardoso, S.J., Quadra, G.R., Vilas-Boas, J.A., Paranaíba, J.R., Pereira, R.D.O., Mendonça, R.F., 2021. Glyphosate Concentrations in Global Freshwaters: Are Aquatic Organisms at Risk? *Environmental Science and Pollution Research* 28, 60635–60648; <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14609-8>



27. Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Huang, J., Wang, B., 2016. Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs. *Emerging Contaminants* 2, 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.05.003>
28. Buser, H.-R., Poiger, T., Müller, M.D., 1999. Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology* 33, 2529–2535. <https://doi.org/10.1021/es981014w>
29. Cappelletti, C., Cianfanelli, S., Beltrami, M.E., Ciutti, F., 2009. *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Bivalvia: Unionidae): a new non-indigenous species in Lake Garda (Italy). *Aquatic Invasions* 4, 685–688. doi:10.3391/ai.2009.4.4.15
30. Cardoso, O., Porcher, J.-M., Sanchez, W., 2014. Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: Review of evidence and need for knowledge. *Chemosphere* 115, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.004>
31. Carmona, E., Andreu, V., Picó, Y., 2014. Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Science of The Total Environment* 484, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.085>
32. Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic Effects of Roundup® on the Fish *Prochilodus Lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 655, 41–46; <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.06.010>
33. Chmist, J., Szoszkiewicz, K., Drożdżyński, D., 2019. Behavioural Responses of *Unio Tumidus* Freshwater Mussels to Pesticide Contamination. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 77, 432–442; <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00649-2>
34. Chmist-Sikorska, J., Szoszkiewicz, K., Wencka, A., Szczepaniak, M., Szymczak, J., Kujawski, M., 2020. Effects of ibuprofen and venlafaxine on behavioural parameters in freshwater bivalve *Unio tumidus*. *E3S Web of Conferences* 171, 01014. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202017101014>
35. Ciutti, F., Beltrami, M.E., Confortini, I., Cianfanelli, S., Cappelletti, C., 2011. Non-indigenous invertebrates, fish and macrophytes in Lake Garda (Italy). *Journal of Limnology* 70, 315–320. doi:10.3274/JL11-70-2-N1
36. Cooke, D., Welch, E.B., Peterson, S., Nichols, S., 2005 *Restoration and Management of Lakes and Reservoirs*. p. 616; <https://doi.org/10.1201/9781420032109>

37. Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R., 2010. Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology* 40(4), 287-304. <https://doi.org/10.3109/10408440903373590>
38. Corsi, I., Pastore, A.M., Lodde, A., Palmerini, E., Castagnolo, L., Focardi, S., 2007. Potential role of cholinesterases in the invasive capacity of the freshwater bivalve, *Anodonta woodiana* (Bivalvia: Unionacea): A comparative study with the indigenous species of the genus, *Anodonta* sp. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* 145, 413–419. doi:10.1016/j.cbpc.2007.01.011
39. Daughton, C.G., 2003. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. II. Drug disposal, waste reduction, and future directions. *Environmental Health Perspectives* 111, 775–785. <https://doi.org/10.1289/ehp.5948>
40. Demayo, C.G., Cabacaba, K.M.C., Torres, M.A.J., 2012. Shell Shapes of the Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) from Lawis stream in Iligan City and Lake Lanao in Mindanao, Philippines. *Advances in Environmental Biology*. 6, 1468–1473.
41. Di Fiori, E., Pizarro, H., dos Santos Afonso, M., Cataldo, D., 2012. Impact of the Invasive Mussel *Limnoperna Fortunei* on Glyphosate Concentration in Water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 81, 106–113; <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.04.024>
42. Downing, J.A., Van Meter, P., Woolnough, D.A., 2010. Suspects and Evidence: A Review of the Causes of Extirpation and Decline in Freshwater Mussels. *Animal Biodiversity and Conservation* 33, 151–185; <https://doi.org/10.32800/abc.2010.33.0151>
43. Drewek, A., Rybak, M., Drzewiecka, K., Niedzielski, P., Polak, J., Klimaszuk, P., 2022. The Impact of Iron Coagulant on the Behavior and Biochemistry of Freshwater Mussels *Anodonta Cygnea* and *Unio Tumidus* during Lake Restoration. *Journal of Environmental Management* 318, 115535; <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115535>
44. Du, J., Mei, C.-F., Ying, G.-G., Xu, M.-Y., 2016. Toxicity Thresholds for Diclofenac, Acetaminophen and Ibuprofen in the Water Flea *Daphnia magna*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 97, 84–90. doi:10.1007/s00128-016-1806-7
45. Dunalska, J.A., Wiśniewski, G., 2016 Can we stop the degradation of lakes? Innovative approaches in lake restoration. *Ecological Engineering* 95, 714-722;

- <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.07.017>
46. Dzierżyńska-Białończyk, A., Jermacz, Ł., Zielska, J., Kobak, J., 2019. What scares a mussel? Changes in valve movement pattern as an immediate response of a byssate bivalve to biotic factors. *Hydrobiologia* 841, 65–77. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-04007-0>
  47. Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., Van der Bruggen, B., 2019. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Science of The Total Environment* 654, 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072>
  48. Fent, K., Weston, A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76, 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
  49. Flaim, G., Eccel, E., Zeileis, A., Toller, G., Cerasino, L., Obertegger, U., 2016 Effects of re-oligotrophication and climate change on lake thermal structure. *Freshwater Biology* 61(10), 1802-1814; <https://doi.org/10.1111/fwb.12819>
  50. Folmar, L.C., Sanders, H.O., Julin, A.M., 1979. Toxicity of the Herbicide Glyphosate and Several of Its Formulations to Fish and Aquatic Invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 8, 269–278; <https://doi.org/10.1007/BF01056243>
  51. Gerhardt, A., 1992 Effects of subacute doses of iron (Fe) on *Leptophlebia marginata* (Insecta: Ephemeroptera). *Freshwater Biology* 27, 79-84; <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1992.tb00524.x>
  52. Gierse, J.K., Hauser, S.D., Creely, D.P., Koboldt, C., Rangwala, S.H., Isakson, P.C., Seibert, K., 1995. Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase. *Biochemical Journal* 305, 479–484. <https://doi.org/10.1042/bj3050479>
  53. Gnatyshyna, L., Falfushynska, H., Horyn, O., Khoma, V., Martinyuk, V., Mishchuk, O., Mishchuk, N., Stoliar, O., 2019. Biochemical Responses of Freshwater Mussel *Unio Tumidus* to Titanium Oxide Nanoparticles, Bisphenol A, and Their Combination. *Ecotoxicology* 28, 923–937; <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02090-6>
  54. Gnatyshyna, L., Khoma, V., Horyn, O., Ozoliņš, D., Skuja, A., Kokorite, I., & Stoliar, O., 2019. Multi-marker study of *Dreissena polymorpha* populations from hydropower plant reservoir and natural lake in Latvia. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 20(6), 409-420.

55. Goldsmith, A.M., Jaber, F.H., Ahmari, H., Randklev, C.R., 2020. Clearing up cloudy waters: a review of sediment impacts to unionid freshwater mussels. *Environmental Reviews* 29(1), 100-108. <https://doi.org/10.1139/er-2020-0080>
56. Gołdyn, R., Podsiadłowski, S., Dondajewska, R., Kozak, A., 2014 The sustainable restoration of lakes—towards the challenges of the Water Framework Directive. *Ecohydrology & Hydrobiology* 14 (1), 68-74; <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2013.12.001>
57. Gonzalez-Rey, M., Tapie, N., Le Menach, K., Dévier, M.-H., Budzinski, H., Bebianno, M.J., 2015. Occurrence of pharmaceutical compounds and pesticides in aquatic systems. *Marine Pollution Bulletin* 96, 384–400. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.029
58. Goodsell, P.J., Underwood, A.J., Chapman, M.G., 2009. Evidence Necessary for Taxa to Be Reliable Indicators of Environmental Conditions or Impacts. *Marine Pollution Bulletin* 58, 323–331; <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.10.011>
59. Gómez, M.J., Martínez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66, 993–1002. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.051>
60. Graham, G.G., Scott, K.F., 2005. Mechanism of Action of Paracetamol. *American Journal of Therapeutics* 12, 46–55. <https://doi.org/10.1097/00045391-200501000-00008>
61. Gravel, A., Wilson, J.M., Pedro, D.F.N., Vijayan, M.M., 2009. Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149, 481–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.002>
62. Grzybowski, M., Glińska-Lewczuk, K., 2019. Principal threats to the conservation of freshwater habitats in the continental biogeographical region of Central Europe. *Biodiversity and Conservation* 28, 4065–4097. <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01865-x>
63. Hartmann, J.T., Beggel, S., Auerswald, K., Stoeckle, B.C., Geist, J., 2016. Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 170, 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.014>

64. Hayashi, Y., Heckmann, L.-H., Callaghan, A., Sibly, R.M., 2008. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. *Ecotoxicology* 17, 246–251. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0191-3>
65. Heckmann, L., Callaghan, A., Hooper, H., Connon, R., Hutchinson, T., Maund, S., Sibly, R., 2007. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters* 172, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.06.001>
66. Hilt, S., Gross, E.M., Hupfer, M., Morscheid, H. et al., 2006 Restoration of submerged vegetation in shallow eutrophic lakes – A guideline and state of the art in Germany. *Limnologica* 36 (3), 155-171; <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.06.001>
67. Hilty, J., Merenlender, A., 2000 Faunal Indicator Taxa Selection for Monitoring Ecosystem Health. *Biological Conservation* 92, 185–197; [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(99\)00052-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(99)00052-X)
68. Holden, J., 2014. Water fundamentals. In *Water Resources: An Integrated Approach*; Holden, J., Ed.; Routledge Taylor and Francis Group: London, UK; New York, NY, USA, p. 371.
69. Holwerda, D.A., Veenhof, P.R., 1984 Aspects of anaerobic metabolism in *Anodonta cygnea* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 78 (3), 707-711; [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(84\)90122-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(84)90122-6)
70. Immers, A. K., van der Sande, M.T., van der Zande, R.M., Geurts, J.J.M., van Donk, E., Bakker, E.S., 2013 Iron addition as a shallow lake restoration measure: impacts on charophyte growth. *Hydrobiologia* 710, 241-251; <https://doi.org/10.1007/s10750-011-0995-7>
71. Immers, A.K., Vendrig, K., Ibelings, B.W., van Donk, E., Ter Heerdt, G.N.J., Geurts, J.J.M., Bakker, E.S., 2014 Iron addition as a measure to restore water quality: implications for macrophyte growth. *Aquatic Botany* 116, 44-52; <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.01.007>
72. Iummato, M.M., Di Fiori, E., Sabatini, S.E., Cacciatore, L.C., Cochón, A.C., Ríos de Molina, M.d.C., Juárez, Á.B., 2013. Evaluation of Biochemical Markers in the Golden Mussel *Limnoperna Fortunei* Exposed to Glyphosate Acid in Outdoor Microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 95, 123–129; <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.024>
73. Iummato, M.M., Sabatini, S.E., Cacciatore, L.C., Cochón, A.C., Cataldo, D., de Molina, M. del C.R., Juárez, Á.B., 2018. Biochemical responses of the golden mussel

- Limnoperna fortunei* under dietary glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.046>
74. Jacquin, L., Gandar, A., Aguirre-Smith, M., Perrault, A., Hénaff, M.L., De Jong, L., Paris-Palacios, S., Laffaille, P., Jean, S., 2019. High Temperature Aggravates the Effects of Pesticides in Goldfish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172, 255–264; <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.085>
75. Jančula, D., Maršálek, B., 2011 Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere* 85 (9), 1415-1422; <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.036>
76. Kamburska, L., Lauceri, R., Riccardi, N., 2013. Establishment of a new alien species in Lake Maggiore (Northern Italy): *Anodonta* (*Sinanodonta*) *woodiana* (Lea, 1834) (*Bivalvia*: *Unionidae*). *Aquatic Invasions* 8, 111–116. doi:10.3391/ai.2013.8.1.13
77. Kawamura, M., Inaoka, H., Obata, S., Harada, Y., 2014. Why do a wide variety of animals retain multiple isoforms of cyclooxygenase? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 109–111, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2014.03.002>
78. Keller, A.A., Garner, K., Miller, R.J., Lenihan, H.S., 2012 Toxicity of nano-zero valent iron to freshwater and marine organisms. *PLoS One* 7, 43983; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043983>
79. Khoma, V., Gnatyshyna, L., Martinyuk, V., Mackiv, T., Mishchenko, L., Manusadžianas, L., Stoliar, O., 2021. Common and particular biochemical responses of *Unio tumidus* to herbicide, pharmaceuticals and their combined exposure with heating. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208, 111695. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111695>
80. Khoma, V., Martinyuk, V., Matskiv, T., Gnatyshyna, L., Baranovsky, V., Gladiuk, M., Gylytė, B., Manusadžianas, L., Stoliar, O., 2022. Environmental Concentrations of Roundup in Combination with Chlorpromazine or Heating Causes Biochemical Disturbances in the Bivalve Mollusc *Unio Tumidus*. *Environmental Science and Pollution Research* 29, 14131–14142; <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16775-1>
81. Klimaszuk, P., Gołdyn, R., 2020 Water Quality of Freshwater Ecosystems in a Temperate Climate. *Water*. 12(9), 2643. <https://doi.org/10.3390/w12092643>
82. Klimaszuk, P., Rzymyski, P., 2018. Water and Aquatic Fauna on Drugs: What are the Impacts of Pharmaceutical Pollution? pp. 255–278. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-79014-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-79014-5_12)

83. Kramer, K.J.M., Foekema, E.M., 2001. The “Musselmonitor®” as Biological Early Warning System: The First Decade, Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental change 2: a handbook, 59–87, [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1305-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1305-6_4)
84. Kramer, K.J.M., Jenner, H.A. & de Zwart, D., 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia* 188, 433–443. <https://doi.org/10.1007/BF00027811>
85. Lajmanovich, R.C., Sandoval, M.T., Peltzer, P.M., 2003. Induction of Mortality and Malformation in *Scinax Nasicus* Tadpoles Exposed to Glyphosate Formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 612–618; <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0029-x>
86. Le Bris, H., Maffart, P., Bocquené, G., Buchet, V., Galgani, F., Blanc, G., 1995. Laboratory Study on the Effect of Dichlorvos on Two Commercial Bivalves. *Aquaculture* 138, 139–144; [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01087-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01087-4)
87. Li, J., Lusher, A.L., Rotchell, J.M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I.L.N., Sun, C., Shahadat Hossain, M., Li, Q., Kolandhasamy, P., Shi, H., 2019. Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental Pollution* 244, 522–533. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.032>
88. Lin, A.Y.-C., Lin, C.-A., Tung, H.-H., Chary, N.S., 2010. Potential for biodegradation and sorption of acetaminophen, caffeine, propranolol and acebutolol in lab-scale aqueous environments. *Journal of Hazardous Materials* 183, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.017>
89. Liu, Y., Hao, A., Iseri, Y., Li, C., Zhang, Z., Kuba, T., 2015. Possible survival mechanisms of *Sinanodonta Woodiana* exposed to microcystin. *Journal of JSCE* 3, 259–267. [https://doi.org/10.2208/journalofjsce.3.1\\_259](https://doi.org/10.2208/journalofjsce.3.1_259)
90. Lopes-Lima, M., Burlakova, L.E., Karatayev, A.Y., Mehler, K., Seddon, M., Sousa, R., 2018. Conservation of freshwater bivalves at the global scale: diversity, threats and research needs. *Hydrobiologia* 810, 1–14. doi:10.1007/s10750-017-3486-7
91. Lopes-Lima, M., Sousa, R., Geist, J., Aldridge, D.C., Araujo, R., Bergengren, J., Bernal, Y., Bódis, E., Burlakova, L., Van Damme, D., et al. 2017. Conservation Status of Freshwater Mussels in Europe: State of the Art and Future Challenges. *Biological Reviews* 92, 572–607; <https://doi.org/10.1111/brv.12244>
92. Lüring, M., van Oosterhout, F., 2013 Controlling eutrophication by combined bloom precipitation and sediment phosphorus inactivation. *Water Research* 47 (17), 6527-

- 6537; <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.019>
93. Lydeard, C., Cowie, R.H., Ponder, W.F., Bogan, A.E., Bouchet, P., Clark, S.A., Cummings, K.S., Frest, T.J., Gargominy, O., Herbert, D.G., Hershler, R., Perez, K.E., Roth, B., Seddon, M., Strong, E.E., Thompson, F.G., 2004. The Global Decline of Nonmarine Mollusks. *Bioscience* 54, 321–330. doi:10.1641/0006-3568(2004)054[0321:TGDONM]2.0.CO;2
  94. Malmqvist, B., Rundle, S., 2002. Threats to the running water ecosystems of the world. *Environmental Conservation* 29, 134–153. doi:10.1017/S0376892902000097
  95. Marszelewski, W., Jokiel, P., Pius, B., & Tomalski, P., 2022. River thermal seasons in the central european plain and their changes during climate warming. *Journal of Hydrology* 610 doi:10.1016/j.jhydrol.2022.127945
  96. Martyniuk, V., Gylytė, B., Matskiv, T., Khoma, V., Tulaidan, H., Gnatyshyna, L., Orlova-Hudim, K., Manusadžianas, L., Stoliar, O., 2022. Stress responses of bivalve mollusc *Unio tumidus* from two areas to ibuprofen, microplastic and their mixture. *Ecotoxicology* 31, 1369–1381. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02594-8>
  97. Martyniuk, V., Khoma, V., Matskiv, T., Baranovsky, V., Orlova-Hudim, K., Gylytė, B., Stoliar, O., 2022. Indication of the impact of environmental stress on the responses of the bivalve mollusk *Unio tumidus* to ibuprofen and microplastics based on biomarkers of reductive stress and apoptosis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 261 doi:10.1016/j.cbpc.2022.109425
  98. Matozzo, V., Munari, M., Masiero, L., Finos, L., Marin, M.G., 2019. Ecotoxicological Hazard of a Mixture of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid to the Mussel *Mytilus Galloprovincialis* (Lamarck 1819). *Scientific Reports* 9, 14302; <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50607-0>
  99. McEneff, G., Barron, L., Kelleher, B., Paull, B., Quinn, B., 2014. A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. *Science of The Total Environment* 476–477, 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.123>
  100. Mele, J., Remmen, H.V., Vijg, J., Richardson, A., 2006. Characterization of Transgenic Mice That Overexpress Both Zinc Superoxide Dismutase and Catalase. *Antioxidants & Redox Signaling* 8, 628–638; <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.628>
  101. Mendoza, A., Aceña, J., Pérez, S., López de Alda, M., Barceló, D., Gil, A., Valcárcel, Y., 2015. Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case



- study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. *Environmental Research* 140, 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.04.003>
102. Mersch, J., & Johansson, L., 1993. Transplanted aquatic mosses and freshwater mussels to investigate the trace metal contamination in the rivers Meurthe and Plaine, France. *Environmental technology*, 14(11), 1027-1036.
  103. Mesnage, R., Benbrook, C., Antoniou, M.N., 2019. Insight into the Confusion over Surfactant Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides. *Food and Chemical Toxicology* 128, 137–145; <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053>
  104. Metcalfe, C., Miao, X.-S., Hua, W., Letcher, R., Servos, M., 2004. Pharmaceuticals in the Canadian Environment, in: *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 67–90. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-09259-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-662-09259-0_6)
  105. Miller, T.H., Bury, N.R., Owen, S.F., MacRae, J.I., Barron, L.P., 2018. A review of the pharmaceutical exposome in aquatic fauna. *Environmental Pollution* 239, 129–146. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.012>
  106. Misra, R., Pandey, H., Chandra, M., Chandra, M., Agarwal, P.K., Pandeya, S.N., 1990. Effects of commonly used non steroidal anti-inflammatory drugs on gastric mucosa. A clinical, endoscopic and histopathological study. *The Journal of the Association of Physicians of India* 38, 636–8.
  107. Mouabad, A., Pihan, J.C., 1992. The Pumping Behaviour Response of *Dreissena* to Pollutants. A Method for Toxicity Screening. *Limnologie Aktuell*, 147–155
  108. Moulton, C.A., Fleming, W.J., Purnell, C.E., 1996. Effects of Two Cholinesterase-Inhibiting Pesticides on Freshwater Mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 131–137; <https://doi.org/10.1002/etc.5620150210>
  109. Nunes, B., Pinto, G., Martins, L., Gonçalves, F., Antunes, S.C., 2014. Biochemical and standard toxic effects of acetaminophen on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 10815–10822. [doi:10.1007/s11356-014-3059-5](https://doi.org/10.1007/s11356-014-3059-5)
  110. Ostrovsky, I., Gophen, M., Kalikhman, I., 1993. Distribution, growth, production, and ecological significance of the clam *Unio terminalis* in Lake Kinneret, Israel. *Hydrobiologia* 271, 49–63. [doi:10.1007/BF00005695](https://doi.org/10.1007/BF00005695)
  111. Ożgo, M., 2010. Rola , zagrożenia i problemy ochrony małży skójkowatych (*Unionidae*) The role , threats , and conservation of unionid mussels ( *Unionidae* ). *Chrońmy Przyrodę Ojczystą* 66, 201–208.

112. Parolini, M., 2020. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *Science of The Total Environment* 740, 140043. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140043>
113. Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A., 2010. Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 79(5), 489-498. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.02.053
114. Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011. Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1586–1594. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.025>
115. Piasecki, W.G., Zacharzewski, D., 2010 Influence of coagulants used for lake restoration on *Daphnia magna* Straus (Crustacea, Cladocera). *Baltic Coastal Zone. Journal of Ecology and Protection of the Coastline* 14, 49-56;
116. Piechocki, A., Dyduch-Falniowska, A., 1993. Mięczaki (Mollusca) – Małże (Bivalvia). *Fauna Słodko- wodna Pol. z. 7A*, Wyd. Nauk. PWN.
117. Pizarro, H., Di Fiori, E., Sinistro, R., Ramírez, M., Rodríguez, P., Vinocur, A., Cataldo, D., 2016. Impact of Multiple Anthropogenic Stressors on Freshwater: How Do Glyphosate and the Invasive Mussel *Limnoperna Fortunei* Affect Microbial Communities and Water Quality? *Ecotoxicology* 25, 56–68; <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1566-x>
118. prote.pl (<https://www.prote.pl/PL-H16/symbio-zabezpieczenie-ujec-wody-przed-naglym-skazeniem.html>) access 10.06.2022
119. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen>) acces 11.04.2023
120. Pynnönen, K., 1990. Physiological responses to severe acid stress in four species of freshwater clams (Unionidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 19, 471-478; <https://doi.org/10.1007/BF01059064>
121. Pynnönen, K., 1991. Accumulation of <sup>45</sup>Ca in the freshwater unionids *Anodonta anatina* and *Unio tumidus*, as influenced by water hardness, protons, and aluminum. *Journal of Experimental Zoology* 260, 18-27; <https://doi.org/10.1002/jez.1402600103>
122. Rainsford, K.D., 2009. Ibuprofen: pharmacology, efficacy and safety. *Inflammopharmacology* 17, 275–342. <https://doi.org/10.1007/s10787-009-0016-x>
123. Rasmussen, K., Lindegaard, C., 1988. Effects of iron compounds on macroinvertebrate communities in a Danish lowland river system. *Water Research* 22, 1101-1108;

- [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(88\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(88)90004-8)
124. Relyea, R.A., 2005. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. *Ecological Applications* 15, 618–627; <https://doi.org/10.1890/03-5342>
  125. Roberts, P., Thomas, K., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of The Total Environment* 356, 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.04.031>
  126. Rosińska, J., Kozak, A., Dondajewska, R., Gołdyn, R., 2017. Cyanobacteria blooms before and during the restoration process of a shallow urban lake. *Journal of Environmental Management* 198, 340-347; <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.04.091>
  127. Rucker, J., Nixdorf, B., Quiel, K., Grüneberg, B., 2019. North German lowland lakes miss ecological water quality standards—A lake type specific analysis. *Water* 11, 2547; <https://doi.org/10.3390/w11122547>
  128. Rybak, M., Drzewiecka, K., Woźniak, M., Ratajczak, I., Joniak, T., 2020. Iron-induced behavioural and biochemical responses of charophytes in consequence of phosphates coagulant addition: threats to lake ecosystems restoration. *Chemosphere* 254, 1-10; <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126844>
  129. Rybak, M., Gąbka, M., Ratajczak, I., Woźniak, M., Sobczyński T., Joniak, T., 2020. In-situ behavioural response and ecological stoichiometry adjustment of macroalgae (Characeae, Charophyceae) to iron overload: implications for lake restoration. *Water Research* 173, 115602; <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115602>
  130. Rybak, M., Joniak, T., 2018. Changes in *Chara hispida* L. morphology in response to phosphate aluminium coagulant application. *Limnological Review* 18, 31-37; <https://doi.org/10.2478/limre-2018-0004>
  131. Rzymiski, P., Drewek, A., Klimaszuk, P., 2017. Pharmaceutical pollution of aquatic environment: an emerging and enormous challenge. *Limnological Review* 17, 97–107. <https://doi.org/10.1515/limre-2017-0010>
  132. Rzymiski, P., Klimaszuk, P., Kubacki, T., Poniedziałek, B., 2013. The Effect of Glyphosate-Based Herbicide on Aquatic Organisms—A Case Study. *Limnological Review* 13, 215–220; <https://doi.org/10.2478/limre-2013-0024>
  133. Salanki, J., & Balogh, K. V., 1989. Physiological background for using freshwater mussels in monitoring copper and lead pollution. In *Environmental Bioassay*

- Techniques and their Application: Proceedings of the 1st International Conference held in Lancaster, England, 11–14 July 1988 (pp. 445-453). Springer Netherlands.
134. Salanki, J., 1964. Contributions to the Problem of Daily Rhythm in the Activity of the Fresh Water Mussel *Anodonta cygnea* L. *Annal. Biológiai Tihanyi* 31, 109–116
  135. Salánki, J., Farkas, A., Kamardina, T., & Rózsa, K. S., 2003. Molluscs in biological monitoring of water quality. *Toxicology Letters*, 140, 403-410.
  136. Salánki, J., Turpaev, T. M., & Nichaeva, M., 1991. Mussel as a test animal for assessing environmental pollution and the sublethal effect of pollutants. *Bioindicators and environmental management*, 235-244.
  137. Sandrini, J.Z., Rola, R.C., Lopes, F.M., Buffon, H.F., Freitas, M.M., de Martins, C.M.G., da Rosa, C.E., 2013. Effects of Glyphosate on Cholinesterase Activity of the Mussel *Perna Perna* and the Fish *Danio Rerio* and *Jenynsia Multidentata*: In Vitro Studies. *Aquatic Toxicology* 130–131, 171–173; <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.006>
  138. Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 175, 45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
  139. Schiøtte, T., Warèn, A., 1992. An annotated and illustrated list of the types of Mollusca described by HPC Møller from West Greenland, *Bioscience Series* 35.
  140. Seok, S.J., Park, J.S., Hong, J.R., Gil, H.W., Yang, J.O., Lee, E.Y., Song, H.Y., Hong, S.Y., 2011. Surfactant Volume Is an Essential Element in Human Toxicity in Acute Glyphosate Herbicide Intoxication. *Clinical Toxicology* 49, 892–899; <https://doi.org/10.3109/15563650.2011.626422>
  141. Sim, W.-J., Lee, J.-W., Lee, E.-S., Shin, S.-K., Hwang, S.-R., Oh, J.-E., 2011. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere* 82, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.026>
  142. Slaninova, A., Machova, J., Svobodova, Z., 2014. Fish kill caused by aluminium and iron contamination in a natural pond used for fish rearing: a case report. *Veterinární medicína* 59 (11), 573-581; <https://doi.org/10.17221/7821-VETMED>
  143. Sluyts, H., Van Hoof, F., Cornet, A., & Paulussen, J., 1996. A dynamic new alarm system for use in biological early warning systems. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* 15(8), 1317-1323; <https://doi.org/10.1002/etc.5620150809>

144. Smith, C., Phillips, A., Polačik, M., Reichard, M., 2014. Male Coloration Signals Direct Benefits in the European Bitterling (*Rhodeus Amarus*). *Environmental Biology of Fishes* 97, 335–341; <https://doi.org/10.1007/s10641-013-0155-1>
145. Smith, C., Reichard, M., Jurajda, P., & Przybylski, M., 2004. The reproductive ecology of the European bitterling (*Rhodeus sericeus*). *Journal of Zoology* 262(2), 107-124. doi:10.1017/S0952836903004497
146. Sohail, M., Khan, M.N., Qureshi, N.A., Chaudhry, A.S., 2017. Monitoring DNA Damage in Gills of Freshwater Mussels (*Anodonta anatina*) Exposed to Heavy Metals. *Pakistan Journal of Zoology* 49, 321–328; <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2017.49.1.321.328>
147. Solomon, K.R., Thompson, D.G., 2003. Ecological Risk Assessment for Aquatic Organisms from Over-Water Uses of Glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 6, 289–324; <https://doi.org/10.1080/10937400306468>
148. Sotero-Santos, R.B., Rocha, O., Povinelli, J., 2007 Toxicity of ferric chloride sludge to aquatic organisms. *Chemosphere* 68, 628-636; <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.049>
149. Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K., Reissman, D.B., 2004. Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of The Total Environment* 329, 99–113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.03.015>
150. Strayer, D.L., 2006. Challenges for freshwater invertebrate conservation. *Journal of the North American Benthological Society* 25, 271–287. doi:10.1899/0887-3593(2006)25[271:CFFIC]2.0.CO;2
151. Szymonik, A., Lach, J., 2013. Obecność farmaceutyków w wodach powierzchniowych i przeznaczonych do spożycia. *Proceedings of ECOpole* 7, 735–743. [https://doi.org/10.2429/proc.2013.7\(2\)096](https://doi.org/10.2429/proc.2013.7(2)096)
152. Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005. Molecular Identification and Expression Study of Differentially Regulated Genes in the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* in Response to Pesticide Exposure. *The FEBS Journal* 272, 390–403; <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04479.x>
153. Tankersley, R.A., Dimock, R. V., 1993. The Effect of Larval Brooding on the Respiratory Physiology of the Freshwater Unionid Mussel *Pyganodon cataracta*. *The American Midland Naturalist* 130, 146. doi:10.2307/2426283

154. Telahigue, K., Rabeh, I., Mhadhbi, L., Nechi, S., Chelbi, E., Ben Ali, M., Hedfi, A., AL-Harbi, M.S., Hajji, T., 2022. Glyphosate Exposure Modulates Lipid Composition, Histo-Architecture and Oxidative Stress Status and Induces Neurotoxicity in the Smooth Scallop *Flexopecten Glaber*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 184, 105099; <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105099>
155. Thomas, K. V., Hilton, M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 49, 436–444. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.028>
156. Tickner, D., Opperman, J.J., Abell, R., Acreman, M., Arthington, A.H., Bunn, S.E., Cooke, S.J., Dalton, J., Darwall, W., Edwards, G., Harrison, I., Hughes, K., Jones, T., Leclère, D., Lynch, A.J., Leonard, P., McClain, M.E., Muruven, D., Olden, J.D., Ormerod, S.J., Robinson, J., Tharme, R.E., Thieme, M., Tockner, K., Wright, M., Young, L., 2020. Bending the Curve of Global Freshwater Biodiversity Loss: An Emergency Recovery Plan. *Bioscience* 70, 330–342. doi:10.1093/biosci/biaa002
157. Todd, P.A., Sorkin, E.M., 1988. Diclofenac Sodium. *Drugs* 35, 244–285. <https://doi.org/10.2165/00003495-198835030-00004>
158. Tresnakova, N., Stara, A., Velisek, J., 2021. Effects of Glyphosate and Its Metabolite AMPA on Aquatic Organisms. *Applied Sciences* 11, 9004; <https://doi.org/10.3390/app11199004>
159. Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic Toxicity of Glyphosate-Based Formulations: Comparison between Different Organisms and the Effects of Environmental Factors. *Chemosphere* 52, 1189–1197; [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0)
160. Ujszegi, J., Gál, Z., Mikó, Z., Hettyey, A., 2015. No Observable Effect of a Glyphosate-Based Herbicide on Two Top Predators of Temporal Water Bodies. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34, 307–313; <https://doi.org/10.1002/etc.2798>
161. Urbańska, M., Kamocki, A., Kirschenstein, M., Ożgo, M., 2021. The Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* demographically outperforms European native mussels. *Scientific Reports* 11, 17058. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96568-1>
162. Uren Webster, T.M., Laing, L.V., Florance, H., Santos, E.M., 2014. Effects of Glyphosate and Its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology* 48, 1271–1279; <https://doi.org/10.1021/es404258h>
163. van Anholt, D., Spanings, F.A.T., Knol, A.H., van der Velden, J.A., Wendelaar Bonga, S.E., 2002 Effects of iron sulfate dosage on the water flea (*Daphnia magna* straus) and

- early development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 182-192; <https://doi.org/10.1007/s00244-001-0001-X>
164. Vasanthi, R. L., Arulvasu, C., Kumar, P., & Srinivasan, P., 2021. Ingestion of microplastics and its potential for causing structural alterations and oxidative stress in Indian green mussel *Perna viridis*—A multiple biomarker approach. *Chemosphere*, 283, 130979.
  165. Vaughn, C.C., Hoellein, T.J., 2018. Bivalve Impacts in Freshwater and Marine Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49, 183–208. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110617-062703
  166. Vereecken, H., 2005. Mobility and Leaching of Glyphosate: A Review. *Pest Management Science* 61, 1139–1151; <https://doi.org/10.1002/ps.1122>
  167. Vorosmarty, C. J., McIntyre P. B., Gessner M. O., Dudgeon D., Prusevich A., Green P., Glidden S., Bunn S. E., Sullivan C. A., Liermann C. R. & Davies P. M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467, 555–561
  168. Weigel, S., Kuhlmann, J., Hühnerfuss, H., 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Science of The Total Environment* 295, 131–141. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00064-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00064-5)
  169. Williams, A.L., Watson, R.E., Desesso, J.M., 2012. Developmental and Reproductive Outcomes in Humans and Animals after Glyphosate Exposure: A Critical Analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 15, 39–96; <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.632361>
  170. Wood, C.M., Rogano, M.S., 1986 Physiological responses to acid stress in crayfish (*Orconectes*): haemolymph ions, acid-base status, and exchanges with the environment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43, 1017-1026; <https://doi.org/10.1139/f86-126>
  171. Wuijts, S., Van Rijswijk, H., Driessen, P., 2021 Achieving European Water Quality Ambitions: Governance Conditions for More Effective Approaches at the Local-Regional Scale. *Sustainability* 13 (2), 681; <https://doi.org/10.3390/su13020681>
  172. Yamamoto, H., Nakamura, Yudai, Moriguchi, S., Nakamura, Yuki, Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., Sekizawa, J., 2009. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis,

- biodegradation, and sorption experiments. *Water Research* 43, 351–362. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.039>
173. Żbikowska, E., Lombardo, P., Żbikowski, J., Jabłońska, G., Marszewska, A., Cichy, A., 2017. Ketoprofen-induced inhibition of symptoms of behavioural fever observed in wintering *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies* 83, 434–439. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyx026>



## 10. Publikacja 1

**The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration.**

*Drewek A., Rybak M., Drzewiecka K., Niedzielski P., Polak J., Klimaszyk P., 2022. The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration. *Journal of Environmental Management* 318, p. 115535; <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115535>*

Mgr Agnieszka Drewek  
Zakład Ochrony Wód  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 89  
61-614 Poznań  
agnieszka.drewek@amu.edu.pl

Poznań, 14 październik 2024

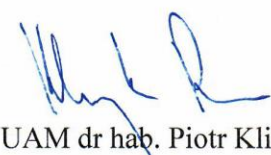
Oświadczenie o zakresie wykonywanych prac i udziale w powstaniu publikacji:

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

**The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels  
Anodonta cygnea and Unio tumidus during lake restoration. Journal of Environmental  
Management 318, 15, 2022, 115535;**

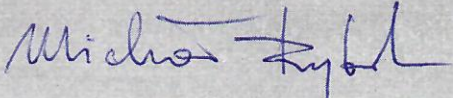
polegał na: wypracowaniu koncepcji i hipotez, przeprowadzeniu eksperymentów, przygotowaniu materiału biologicznego do badań markerów stresu oksydacyjnego i chemicznego składu ciała badanych małży oraz udział w pracach laboratoryjnych dotyczących tych analiz, wykonaniu 80% analiz statystycznych, napisaniu pierwszej wersji pracy, odpowiedzi na recenzję i przygotowaniu wersji ostatecznej, przygotowaniu rycin i tabel oraz prac redakcyjnych wg. wymagań czasopisma, a następnie wysłaniu publikacji.

  
Agnieszka Drewek

  
prof. UAM dr hab. Piotr Klimaszyk

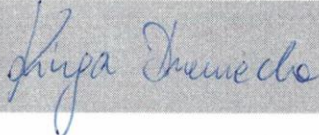
## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym informuję, że jestem świadomy, iż artykuł: „**The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration**” (2022) Drewek A., Rybak M., Drzewiecka K., Niedzielski P., Polak J., Klimaszuk P., *Journal of Environmental Management*, 318, 115535, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115535>, którego jestem współautorem jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko	<b>Michał Rybak</b>
Afiliacja	Zakład Ochrony Wód, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
Udział	Nadzorowałem wykonanie analiz chemicznych wody, zapropnowałem i pomagałem wykonać analizę statystyczną zebranych danych
Data	19.10.2024.
Podpis	

## OŚWIADCZENIE O WSPÓLAUTORSTWIE

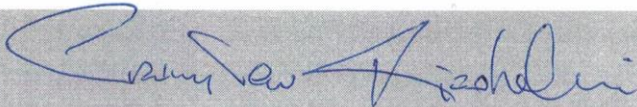
Niniejszym informuję, że jestem świadoma, iż artykuł: „**The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration**” (2022) Drewek A., Rybak M., Drzewiecka K., Niedzielski P., Polak J., Klimaszuk P., *Journal of Environmental Management*, 318, 115535, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115535>, którego jestem współautorką jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko	Kinga Drzewiecka
Afiliacja	Zespół Badawczo-Dydaktyczny Fizykochemicznych Metod Instrumentalnych, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 38/42, 60-627 Poznań
Udział	Przygotowałam metodykę i wykonałam analizy markerów stresu oksydacyjnego w dostarczonym materiale biologicznym.
Data	21.10.2024
Podpis	



## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym informuję, że jestem świadomy, iż artykuł: „**The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration**” (2022) Drewek A., Rybak M., Drzewiecka K., Niedzielski P., Polak J., Klimaszuk P., *Journal of Environmental Management*, 318, 115535, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115535>, którego jestem współautorem jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko	Przemysław Niedzielski
Afiliacja	Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, ul Uniwersytetu Poznańskiego 8, 61-614 Poznań
Udział	Przygotowałem metodykę i wykonałem analizy chemiczne dostarczonego materiału biologicznego
Data	22.10.2024 r.
Podpis	


## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym informuję, że jestem świadomy, iż artykuł: „**The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration**” (2022) Drewek A., Rybak M., Drzewiecka K., Niedzielski P., Polak J., Klimaszuk P., *Journal of Environmental Management*, 318, 115535, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115535>, którego jestem współautorem jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko	Jan Polak
Afiliacja	Wydział Inżynierii Mechanicznej, Politechnika Poznańska, ul.Piotrowo 3, 60-965 Poznań
Udział	Wykonywałem nadzór nad funkcjonowaniem aparatury elektronicznej i software w trakcie eksperymentów
Data	18.10.2024
Podpis	Jan Polak

## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym informuję, że jestem świadomy, iż artykuł: „**The impact of iron coagulant on the behavior and biochemistry of freshwater mussels *Anodonta cygnea* and *Unio tumidus* during lake restoration**” (2022) Drewek A., Rybak M., Drzewiecka K., Niedzielski P., Polak J., Klimaszuk P., *Journal of Environmental Management*, 318, 115535, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115535>, którego jestem współautorem jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko	Piotr Klimaszuk
Afiliacja	Zakład Ochrony Wód, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
Udział	Jestem współautorem koncepcji badawczej, prowadziłem nadzór nad wykonaniem badań i korektą manuskryptu
Data	18.10.2024
Podpis	

## 11. Publikacja 2

### **Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides?**

*Drewek A., Lubawy J., Domek P., Polak J., Słocińska M., Dziegelewska A., Klimaszyk P., 2024. Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides? Water, 16(13), p. 1882; <https://doi.org/10.3390/w16131882>*



Mgr Agnieszka Drewek  
Zakład Ochrony Wód  
Wydział Biologii  
Uniwersytet im. A. Mickiewicza  
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 89  
61-614 Poznań  
agnieszka.drewek@amu.edu.pl

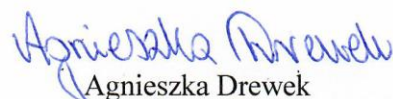
Poznań, 14 października 2024

Oświadczenie o zakresie wykonywanych prac i udziale w powstaniu publikacji:

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu:

**Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides? *Water* 2024, 16 (13), 1882;**

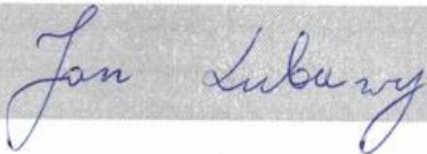
polegał na: wypracowaniu koncepcji i hipotez, przeprowadzeniu eksperymentów, przygotowaniu materiału biologicznego do badań markerów stresu oksydacyjnego i udział w pracach laboratoryjnych dotyczących tych analiz, wykonaniu analiz statystycznych, napisaniu pierwszej wersji pracy, odpowiedzi na recenzję i przygotowaniu wersji ostatecznej, przygotowaniu rycin i tabel oraz prac redakcyjnych wg. wymagań czasopisma, a następnie wysłaniu publikacji.

  
Agnieszka Drewek

  
prof. UAM dr hab. Piotr Klimaszyk

## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym informuję, że jestem świadomy, iż artykuł: „**Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides?**” (2024) Drewek A., Lubawy J., Domek P., Polak J., Stocińska M., Dzięgielewska A., Klimaszyk P., *Water*, 16, 13, 1882, <https://doi.org/10.3390/w16131882>, którego jestem współautorem jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko	<b>Jan Lubawy</b>
Afiliacja	Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
Udział	Wykonałem analizę markerów stresu oksydacyjnego w dostarczonym materiale biologicznym oraz przeprowadziłem weryfikację merytoryczną manuskryptu w zakresie wykonanych analiz
Data	18.10.2024
Podpis	

## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym informuję, że jestem świadomy, iż artykuł: „**Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides?**” (2024) Drewek A., Lubawy J., Domek P., Polak J., Stocińska M., Dzięgelewska A., Klimaszyk P., *Water*, 16, 13, 1882, <https://doi.org/10.3390/w16131882>, którego jestem współautorem jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko

**Piotr Domek**

Afiliacja

Zakład Ochrony Wód, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,  
ul Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań

Udział

Pomagałam w terenowym poborze materiału biologicznego i identyfikacji taksonomicznej

Data

18.10.2024 r.

Podpis

*Piotr Domek*

## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

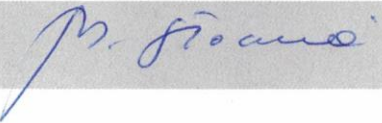
Niniejszym informuję, że jestem świadomy, iż artykuł: „**Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides?**” (2024) Drewek A., Lubawy J., Domek P., Polak J., Stocińska M., Dzięgelewska A., Klimaszyk P., *Water*, 16, 13, 1882, <https://doi.org/10.3390/w16131882>, którego jestem współautorem jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko	<b>Jan Polak</b>
Afiliacja	Wydział Inżynierii Mechanicznej, Politechnika Poznańska, ul.Piotrowo 3, 60-965 Poznań
Udział	Wykonywałem nadzór nad funkcjonowaniem aparatury elektronicznej i software w trakcie eksperymentów
Data	22.10.2024
Podpis	<i>Jan Polak</i>



## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym informuję, że jestem świadoma, iż artykuł: **“Behavioral and biochemical effects of glyphosate-based herbicide Roundup on unionid mussels: are mussels good indicators of water pollution with glyphosate-based pesticides?”** (2024) Drewek A., Łubawy J., Domek P., Polak J., Słocińska M., Dziegelewska A., Klimaszyk P., *Water*, 16, 13, 1882, <https://doi.org/10.3390/w16131882>, którego jestem współautorką jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko	<b>Małgorzata Słocińska</b>
Afiliacja	Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań
Udział	Przygotowałam metodykę do analiz markerów stresu oksydacyjnego oraz uczestniczyłam w wykonaniu analiz
Data	18. 10. 2024r
Podpis	

## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym informuję, że jestem świadoma, iż artykuł: „**Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides?**” (2024) Drewek A., Lubawy J., Domek P., Polak J., Stocińska M., Dzięgelewska A., Klimaszyk P., *Water*, 16, 13, 1882, <https://doi.org/10.3390/w16131882>, którego jestem współautorką jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko

Aleksandra Dzięgelewska

Afiliacja

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt, Wydział Biologii,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,  
ul Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań

Udział

Pomagałam w przygotowaniu eksperymentów behawioralnych i  
sprawowałam opiekę nad materiałem biologicznym  
wykorzystywanym w eksperymentach

Data

23.10.24r.

Podpis

Dzięgelewska

## OŚWIADCZENIE O WSPÓŁAUTORSTWIE

Niniejszym informuję, że jestem świadomy, iż artykuł: „**Behavioral and Biochemical Effects of Glyphosate-Based Herbicide Roundup on Unionid Mussels: Are Mussels Good Indicators of Water Pollution with Glyphosate-Based Pesticides?**” (2024) Drewek A., Lubawy J., Domek P., Polak J., Stocińska M., Dziegelewska A., Klimaszuk P., *Water*, 16, 13, 1882, <https://doi.org/10.3390/w16131882>, którego jestem współautorem jest częścią rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Drewek.

Imię i Nazwisko

Piotr Klimaszuk

Afiliacja

Zakład Ochrony Wód, Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,  
ul Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań

Udział

Jestem współautorem koncepcji badawczej, prowadziłem nadzór nad wykonywaniem badań, przygotowaniem i korektą manuskryptu

Data

18.10.2024

Podpis