

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze

Flora i ochrona środowiska



www.mlodzi naukowcy.com

Poznań 2020

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66392-59-5)

ISBN (wydanie online 978-83-66743-05-2)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-04-5)

Ilość znaków w książce: 512 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 12.8

Data wydania: wrzesień 2020

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Homemade onion syrup. Why is it a great common cold remedy?	7
<i>Michalina Bartak, Agata Lange, Anna Słońska-Zielonka, Joanna Cymerys-Bulenda</i>	
2. Molekularny język bakterii i jego znaczenie w indukcji odporności u roślin	13
<i>Kochańska-Jeziorska Arletta, Jankiewicz Urszula</i>	
3. Nukleazy miejscowo-specyficzne stosowane w edycji genomów roślin	19
<i>Przemysław Olejnik</i>	
4. Rola wybranych mechanizmów molekularnych w doborze partnerów symbiotycznych w interakcjach roślin bobowatych z bakteriami brodawkowymi	25
<i>Przemysław Olejnik</i>	
5. Kwas askorbinowy i kwas salicylowy jako środki łagodzące negatywne skutki deficytu wody u roślin	31
<i>Rokosa Marta</i>	
6. Fluorescencja chlorofilu w badaniach nad wpływem deficytu wody na wzrost i rozwój roślin	38
<i>Rokosa Marta</i>	
7. Gojnik – roślina na miarę XXI wieku	45
<i>Widelska Gabriela, Głaz Patrycja, Straszak Dominik, Widelski Jarosław, Chodun Wiktoria, Oniszczyk Anna</i>	
8. Rodzaj Rhodiola źródłem naturalnych adaptogenów	50
<i>Widelska Gabriela, Głaz Patrycja, Straszak Dominik, Widelski Jarosław, Chodun Wiktoria, Oniszczyk Anna</i>	
9. Ocena efektywności nawadniania i nawożenia sadu gruszowego na glebie lekkiej	56
<i>Katarzyna Wójcik, Treder Waldemar, Wójcik Paweł</i>	
10. Wpływ biopreparatów na uprawę roślin przemysłowych	63
<i>Katarzyna Zamłyńska, Mikołaj Feculak, Katarzyna Suśniak, Dominika Kidaj, Iwona Komanińska, Anna Sroka-Bartnicka</i>	
11. Kinetyka procesu sorpcji zanieczyszczeń środowiskowych na wymiennicach jonowych różnego typu	69
<i>Polska-Adach Ewelina</i>	
12. Badania równowagowe w procesie usuwania barwników reaktywnych z roztworów wodnych	76
<i>Polska-Adach Ewelina</i>	
13. Zmiany stężenia rtęci w powietrzu nad Polską w latach 2011-2017 na podstawie wyników pomiarów w wybranych lokalizacjach miejskich i pozamiejskich	83
<i>Słaby Krzysztof, Pyta Halina</i>	
14. Wpływ różnych typów cyrkulacji atmosferycznej na zmiany stężenia rtęci gazowej i związanej z pyłem zawieszonym w województwie śląskim	91
<i>Słaby Krzysztof, Pyta Halina</i>	
15. Forma chemiczna metali ciężkich w osadach ściekowych jako element oceny ryzyka ekologicznego	100
<i>Tytła Malwina</i>	
16. Zawartość metali w osadach ściekowych a ryzyko ekologiczne	108
<i>Tytła Malwina, Widziewicz-Rzońca Kamila, Loska Krzysztof</i>	

17. Zawartość wody w aerozolach – analiza bibliometryczna	116
<i>Widziewicz-Rzońca Kamila, Tytła Malwina</i>	
18. Wpływ wody atmosferycznej na wyniki pomiarów grawimetrycznych masy filtrów stosowanych do pobierania pyłu zawieszonego	124
<i>Widziewicz-Rzońca Kamila, Tytła Malwina</i>	
19. Wpływ zmian klimatu na zdrowie współczesnego człowieka	131
<i>Marta Wiejak, Agnieszka Prusek, Jolanta Pudełko, Grażyna Janikowska</i>	
20. Wpływ zanieczyszczeń powietrza na zdrowie człowieka – wybrane węglowodory	138
<i>Marta Wiejak, Agnieszka Prusek, Marcin Janikowski, Jolanta Pudełko, Paulina Gębala, Wioletta Parys</i>	

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję trzynastu monografii naukowych dotyczących szerokiego spektrum nauk. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk przyrodniczych, nauk medycznych i nauk o zdrowiu, szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych oraz nauk technicznych i inżynierskich.

W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, spójnych tematycznie, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodsi absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zacznie publikować prace naukowe w prestiżowych czasopismach. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

Redakcja

1. Homemade onion syrup. Why is it a great common cold remedy?

Michalina Bartak ⁽¹⁾, Agata Lange ⁽²⁾, Anna Słońska-Zielonka ⁽¹⁾ Joanna Cymerys-Bulenda ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Division of Microbiology, Department of Preclinical Sciences, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences

⁽²⁾ Department of Nanobiotechnology and Experimental Ecology, Institute of Biology, Warsaw University of Life Sciences

Scientific supervisor: dr hab. Joanna Cymerys-Bulenda

Bartak Michalina: michalina.bartak@gmail.com

Keywords: healing properties, alternative medicine, plants extract, antimicrobial features

Abstract

Nowadays, we witness the return of traditional medicine. Like in the XIX and early XX century we tend to prepare medicine from herbs, spices and plants which are rich in various vitamins, saponins, flavonoids that have healing properties. In this overview, we will take a closer look to most popular Polish, traditional, homemade cold remedy. Several of the drugs sold today are simple synthetic modifications or copies of the naturally obtained substances. This is strong evidence that without plants we would not have medicines which we commonly use these days. Moreover, every single compound of the herbal remedy has different role in healing process. Each component of a drug has a separate effect but combining them into one mixture produces a synergistic effect and makes combination the key in effective treatment.

1. Introduction

The common cold (known as upper respiratory infection – URI) is one of the most popular illness in developed countries. Typical symptoms of common cold are sore throat, sneezing, cough, rhinitis, rarely fever. Causes and effects of URI are various. On the other hand, viruses' attacks (especially rhinovirus, influenza viruses) are huge threat but also bacterial infections causing sinusitis and pertussis. Using natural drugs may support decrease the number of consumed antibiotics. Mitigation of symptoms is one of the main strategies in URI treatment (DeGeorge et al., 2019).

Taking this into account, the use of homemade phytomedicines could be a preventative measure against falling ill. In European countries, the *eponymous* syrup is known and generally used by everyone. In Poland, specific types of formula depend on the tradition and region of the country. Usually, the common composition of cold syrup is made of onion bulb and garlic. In this monography, we focused on a modern recipe, based on the addition of ginger, cloves, lemon and honey as well as cinnamon. The knowledge of syrup's composition nor its effect does not have scientific proven article evidence. That is why we rely on historical books and folktale. The data about medical properties of plants and spices and their impact on common cold and other diseases are taken from science articles (Pubmed, Google Scholar).

2. Review – Compounds of the syrup

2.1 Onion bulb (*Allium cepa* L.)

The base of our mixture is this common vegetable, botanically classified under *Amaryllidaceae* family, that has a whole range of bioactive compounds and numerous pharmacological properties, including antimicrobial, antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, anti-diabetic, hypolipidemic, antihypertensive and immunoprotective (immune enhancement potential). From a wide range of *A. cepa* phytocomponents that can be distinguished, there are phenolic compounds (ferulic acid, gallic acid, protocatechuic acid, quercetin, and kaempferol), flavonoids (quercetin aglycon, quercetin-3,4'-diglucoside, quercetin-4'-monoglucoside, quercetin-3-monoglucoside and more) anthocyanins and organosulfur compounds. The content and presence of a chemical compound depends on the place of origin (Teshika et al., 2018). The main source of various biologically active phytochemicals is present in the outer layer that is discarded by most consumers.

It contains antioxidants such as phenolic acids, flavonoids (especially large amounts of quercetin, quercetin glycoside), cepaenes, thiosulfates and anthocyanins (Singh et al. 2009). These compounds inhibit growth of Gram-positive and Gram-negative bacteria such as following examples - *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *M. luteus*. Many studies have also confirmed the effect of *A. cepa* extracts on viruses and fungi. What is equally important during the treatment of common cold, onion juice has anti-inflammatory effect. Onion extract allows inhibition of COX and LOX pathways, thus preventing the formation of leukotrienes and thromboxanes (Teshika et al. 2018).

2.2 Clove (*Syzygium aromaticum*)

Its colloquial name -clove- is derived from the French word "clou" which means "a nail". It belongs to family *Myrtaceae* and it is one of commonly used spice in the world's traditional medicine (Kaur and Kaushal 2019). In the syrup recipe, the clove buds are usually used. The addition of water and damage of buds' grains extracts essential oils which are responsible for medical effect. Given the natural bioactive properties, clove oil is used as an analgesic, antiseptic, warming, and disinfecting agent because it inhibits the growth or kills most of the pathogens such as *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus*. What is crucial in common cold therapy, *S. aromaticum* oil is prescribed for inhalation in the treatment of sore throat, colds, inflammation of the mucous membranes of the mouth. Consequently, it helps to treat breathing problems, general weakness and neuralgia (Nowak et al. 2012). The composition of the oil is very complex and differently defined by many scientists. According to the latest knowledge main compounds of clove bud essential oil are monoterpenes and the major one is eugenol (76%). The essential oil also includes: β -caryophyllene and eugenol acetate. The above components of the essential oil from *Syzygium aromaticum* shows antimicrobial and antioxidant activity due to the presence of eugenol and other phenolic compounds. Moreover, it was found that clove oil inhibited production of IL-1 β and IL-6 by macrophages which showed the anti-inflammatory and antipyretic activity of *S. aromaticum* oil. In addition, clove oil treatment decreases the inflammation by depletion in neutrophils and white blood cells with no effect on hematocrit and red blood cells (Kaur and Kaushal 2019).

2.3 Cinnamon (*Cinnamomum* spp.)

The genus *Cinnamon* is an aromatic tree belonging to the family *Lauraceae*. Usually, for treatment purposes Ceylon cinnamon and Cassia cinnamon in form of quills or powder are used. In traditional medicine, it was a remedy for respiratory and digestive problems. The use of cinnamon bark is questioned by some research; however, the extract is rich in substances that can contribute to the successful treatment of infection (Kawatra and Rajagopalan 2015). The main components of cinnamon bark oil are cinnamaldehyde, cinnamate, cinnamic acid and a wide range of essential oils such as trans-cinnamaldehyde, cinnamyl acetate, eugenol, L-borneol, camphor, caryophyllene oxide, β -caryophyllene, L-bornyl acetate, E-nerolidol, α -cubebene, α -terpineol, terpinolene and α -thujene. The content and presence of a chemical compound depends on the place of origin and part of the plant (Vasconcelos et al. 2018). The active substance that shows the strongest antimicrobial activity among the other components of the oil is trans-cinnamaldehyde (El Atki et al. 2019). The effect of trans-cinnamaldehyde is based on mechanisms that causes: alterations in cell membrane and its lipid profile, inhibition of ATPs, inhibition of cell division and downregulation of anti-quorum sensing (Vasconcelos et al. 2018). Beside to the known bactericidal effect of cinnamon essential oil used against foodborne pathogens such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Kawatra and Rajagopalan 2015) and against urinary tract infections (Shreya et al. 2015), there have been new reports of its potential use against multidrug resistant bacteria. El Atki et al. (2019) created a combined treatment in which researches used cinnamon oil along with antibiotics usually prescribed against multidrug-resistant *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). According to their research, synergistic therapy with cinnamon oil and classic antibiotics - streptomycin, ampicillin, and chloramphenicol may be an alternative to current treatment. It would reduce the minimum effective dose of the drug, thereby reducing side effects. Cinnamon extracts and essential oils have a beneficial effect on human health, used as drug additives and antibacterial supplements. Further *in vivo* studies are required to understand

the mechanism of action and clinical studies to determine pharmacodynamics and pharmacokinetics (El Atki et al. 2019).

2.4 Lemon (*Citrus limon*)

Citrus limon, commonly known as lemon, belongs to the genus *Citrus*, which is an important subunit of the *Rutaceae* family. Traditionally lemon juice was used as a remedy for scurvy, treatment of high blood pressure, the common cold and irregular menstruation. Some of the traditional uses are still practiced today (Klimek-Szczykutowicz et al. 2020). *C. limon* and its fruit and fruit juice have a variety of bioactive compounds which have broad spectrum of biological activity including antibacterial, antifungal, antidiabetic, anticancer and antiviral activities (Ali et al. 2017). However, focusing on bioactive compounds contained in lemon fruit juice and whole fruit, flavonoids are considered as the most important. For example: flavonones—eriodictyol, hesperidin, hesperetin, naringin; flavones—apigenin, diosmin; flavonols—quercetin; and their derivatives. In the whole fruit we can additionally indicate: flavonols—limocitrin and spinacetin, and flavones—orientin and vitexin. Other important components are phenolic acids—ferulic and synapic acid and their derivatives in fruit juice, dihydroferulic acid, p-hydroxybenzoic acid, 3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl), propanoic acid, synapic acid in whole fruit. Also, coumarin compounds, carboxylic acids, limonoids, carbohydrates, as well as amino acids, a complex of B vitamins and vitamin C are present in the fruit (Klimek-Szczykutowicz et al. 2020). Acetone extracts obtained from *C. limon* fruits showed antibacterial, inhibitory activity against Gram-negative (*Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*) and Gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) at MIC 0.01 mg/mL (Klimek-Szczykutowicz et al. 2020). Other studies have demonstrated that methanolic extracts of the dry peel of the fruit of *Citrus limon* were highly successful in inhibiting the growth of the bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) and fungi (*Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*) at MIC less than 100 µg/ml (Ali et al. 2017). What is more, *C. limon* essential oil (concentration of 0.05%) also inhibits Herpes simplex replication which is extremely valuable, because herpes infection is able to renew during common cold. *C. limon* anti-inflammatory activity is demonstrated by both fruit juice extract and essential oil. Fruit juice extract contains hesperidin and hesperetin that inhibits inflammatory targets such as NF-κB factor, nitric oxide (II) synthase (iNOS), induced cyclooxygenase (COX-2) and the markers of chronic inflammation. Other studies showed that D-limonene, present in the essential oil from *C. limon* (30/10 mg/kg p.o.), reduced cell migration, cytokine production and protein extravasation induced by carrageenan during mice formalin test. These effects were probably obtained due to the high concentration of D-limonene (Klimek-Szczykutowicz et al. 2020).

2.5 Garlic (*Allium sativum* L.)

Garlic, commonly referred to as Russian penicillin, is a well-known plant which was used to combat a variety of maladies throughout the years. In the past, it had been prescribed to treat headache, sore throat, respiratory tract infections as well as fever. Antibacterial properties of garlic have been known for the first time by Louis Pasteur in 1858 but then, after years of research they became popular on a global scale. The precious qualities relate to inhibition of growth both Gram-positive (*Staphylococcus*, *Streptococcus* species etc.) and Gram-negative (*Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Salmonella* species etc.) bacteria but also multidrug resistant strains. Such a result is owed due to specific organosulfur compounds which cause a major role in scent and its medicinal effects (Gebreyohannes and Gebreyohannes 2013). Allicin and then its derivative ajoene are produced when garlic bulb is damaged. Allicin is present in fresh garlic up to 4.38 to 4.65 mg per gram of garlic (Lissiman et al. 2014). Those components are supposed to be unstable and possible to break down within 16 hours, however usage of water extract stabilizes it by formation of a hydrogen bond of water to oxygen atom in allicin (Gebreyohannes and Gebreyohannes 2013). Despite garlic interaction with bacteria and viruses, it could modulate an immune system. *A. sativum* extract enhances macrophages and T-lymphocytes activity which have been proved *in vitro* when the extract stimulated the rat and human lymphocytes. However, in the case of *in vivo* study on chicken, the relative weight of spleen and thymus have increased after administration of garlic supplement. Garlic compounds are also able to modify effect of pro-inflammatory cytokines by suppression of IL-2, IL-10 and IL-12. Antiviral action of garlic is sparser conforming than antibacterial one. *In vitro* studies have shown garlic activity

against influenza A and B virus, cytomegalovirus, rhinovirus, herpes simplex virus 1 and herpes simplex virus 2, viral pneumonia and rotavirus (Rehman and Munir 2015). Defending organisms from the influenza virus has been proven by two independent scientists in Japan and Romania. Ajoene had a stronger antiviral effect, followed by allicin (Gebreyohannes and Gebreyohannes 2013).

2.6 Honey

Production of honey occurs because of nectar collection from plants by honeybees from the genus *Apis*. Its sweet flavor is associated with high content of sugars which are the most abundant substances among others in honey (Miguel et al. 2017). Level of active compounds is not equal in every type of honey. It depends on various factors such as plant sources, geographic region or production method (Alzahrani et al. 2012). Nevertheless, the main compounds are sugars - glucose and fructose (75% total content of sugar), vitamins – especially from the B group and minerals – potassium, magnesium, calcium, iron, phosphorus, sodium, enzymes (glucose oxidase and catalase), acids (amino and organic). Differential chemical composition is also based on polyphenols, flavonoids (quercetin, kaempferol) and others. Unique properties, among which prebiotic features, ability to modulate immune system, antioxidant characteristics as well as inhibiting bacterial pathogens may be highlighted, make it possible to use honey as an alternative agent in ordinary medicine (Miguel et al. 2017). Antibacterial properties which honey demonstrates vary depends on location of natural source of plants and its' nectar. Low pH with values between 3.2 – 4.5 theoretically may inhibit growth of many bacteria but during consumption acidic environment is lost by human body's enzymes. Major factor responsible for honey's antibacterial activity is H_2O_2 which is formed in reaction between glucose oxidase and glucose. However, it is supposed that H_2O_2 alone cannot have an antibacterial effect (Alzahrani et al. 2012). Other substances with a lower antibacterial activity (for example terpenes, benzyl alcohol, 1,4-dihydroxybenzene) presented in different types of honey are suspected to be involved in inhibitory process. Reduction an inflammatory response is due to phenolic compounds. The same substances are responsible for antioxidant properties, but it is speculated that variety of other substances are linked to this effect. At tissue culture level, honey caused an increase of lymphocytes T and B population, polymorphonuclear leukocytes and antibodies (Samarghandian et al. 2017).

2.7 Ginger (*Zingiber officinale*)

Ginger is widely used in folk medicine. To be more precise, ginger's rhizomes become popular not merely by exceptional powerful flavor but also health promoting properties. It is believed that fresh roots with added honey are effective as cough suppressant. Furthermore, *Zingiber officinale* plays a protective role against fever, common cold, respiratory problems like bronchitis and sinusitis. The partial explanation is that ginger is a warming spice which supports sweating. This type of action is meaningful in colds, not only because of detoxication but also it protects against microorganisms causing skin infections. Major volatile compounds of the oil in ginger are zingiberene (35%), curcumene (18%) and farnesene (10%) (Gupta and Sharma 2014). Non – volatile substances mainly consist of gingerols, shogaols, paradols and zingerone (Gupta and Sharma 2014; Semwal et al. 2015). High content of polyphenol compounds indicates strong antioxidant properties. Those compounds (6-gingerol and its derivatives) are active against free radicals occurring oxidative stress in cell. It is considered to be a highly significant factor in the context of prevention many illnesses (Gupta and Sharma 2014). Gingerols are unstable in high temperature and as a consequence they change into shogaols. It is not unambiguously proven that shogaols are present in fresh ginger root. Gingerols are supposed to increase antibacterial activity. It might be bond with increasing damage bacterial cell walls which makes bacteria more easily accessible for other substances with possible antibacterial properties (Semwal et al. 2015). Customarily *Z. officinale* was used due to the potential for inhibition both Gram - positive and Gram - negative bacteria. Bioactive compounds (gingerols) are also ascribed to anti-inflammatory activity. Regular consumption improves the health by reducing pain even in osteoarthritis (Gupta and Sharma 2014). In the *in vitro* study, liver cell line HuH7 stimulated by IL-1 β was treated by gingerol and results indicated that the active compound from ginger inhibited inflammatory process through reducing mRNA levels in factors such as IL-6, IL-8 and SAA1. Most

studies have been conducted *in vitro*, however there are also results achieved in *in vivo* models (Semwal et al. 2015).

3. Conclusion

As described above, homemade syrup made of onion, clove, cinnamon, lemon, garlic, honey, ginger is rich in health-promoting constituents. Based on the presented facts it should be concluded, that the mixture has medical properties. However, it should be born in mind that the described effect relates to the specific fractions or the particular methods of extraction that are impossible to obtain at home conditions. Each of the described ingredients has unique, peculiar properties, often only specific to the genus. Nevertheless, the medical properties of the syrup may be due to the combination of the selected constituents and their interaction. Taking into consideration the properties of homemade syrup ingredients described above, some of them have documented antibacterial, antipyretic, anti-inflammatory and immune-stimulating effects. However, analyzing the available studies, some ingredients have a slight effect on the cure of a common cold and can only affect the taste of the prepared mixture.

4. References

- Ali J, Das B, Saikia T (2017) Antimicrobial activity of lemon peel (Citrus limon) extract. International Journal of Current Pharmaceutical Research 9(4):79-82.
- Alzahrani HA, Alsabehi R, Boukraâ L, et al. (2012) Antibacterial and Antioxidant Potency of Floral Honeys from Different Botanical and Geographical Origins, Molecules 17:10540-10549.
- DeGeorge KC, Ring DJ, Dalrymple SN (2019) Treatment of the Common Cold, American Family Physician 100(5):281-289.
- El Atki Y, Aouam I, El Kamari F, et al. (2019) Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research 10(2):63-67.
- Gebreyohannes G, Gebreyohannes M (2013) Medicinal values of garlic: A review. International Journal of Medicine and Medical Sciences 5(9):401-408.
- Gupta SK, Sharma A (2014) Medicinal properties of Zingiber officinale Roscoe - A Review, IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 9(5):124-129.
- Kaur K, Kaushal S (2019) Phytochemistry and pharmacological aspects of Syzygium aromaticum: A review. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 8(1):398-406.
- Kawatra P, Rajagopalan, R (2015) Cinnamon: Mystic powers of a minute ingredient. Pharmacognosy research 7(1):1-6.
- Klimek-Szczykutowicz M, Szopa A, Ekiert H (2020) Citrus limon (Lemon) Phenomenon. A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. Plants (Basel, Switzerland) 9(1):119.
- Lissiman E, Bhasale AL, Cohen M (2014) Garlic for the common cold. Cochrane Database of Systematic Reviews 11:CD006206.
- Miguel MG, Antunes MD, Faleiro ML (2017) Honey as a Complementary Medicine. Integrative Medicine Insights 12:1-15.
- Nowak K, Ogonowski J, Jaworska M, et al. (2012) Clove Oil- Properties and Applications. Chemik 2012, 66(2):145-152.
- Rehman Z, Munir MT (2015) Effect of garlic on the health and performance of broilers. Veterinaria 3(1):32-39.
- Samarghandian S, Farkhondeh T, Samini F (2017) Honey and health: a review of recent clinical research, Pharmacognosy Research 9(2):121-127.
- Semwal RB, Semwal DK, Combrinck S, et al. (2015) Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger, Phytochemistry 117:554-568.

- Shreya A, Manisha D, Sonali M (2015) Phytochemical Screening and Anti-microbial Activity of Cinnamon species against Urinary Tract Infection and Fungal Pathogens. *International Journal of Life Science & Pharma Research* 5(4):30-8.
- Singh BN, Singh BR, Singh RL, et al. (2009) Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food and Chemical Toxicology* 47(6):1161–1167.
- Teshika JD, Zakariyyah AM, Toorabally Z, et al. (2018) Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): A systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(1):39-70.
- Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S (2018) Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: A review. *Microbial Pathogenesis* 120:198–203.

2. Molekularny język bakterii i jego znaczenie w indukcji odporności u roślin

The molecular language of bacteria and its application in the induction of plant resistance

Kochańska-Jeziorska Arletta, Jankiewicz Urszula

Katedra Biochemii i Mikrobiologii; Instytut Biologii; Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
ul Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Opiekun naukowy: Urszula Jankiewicz

Arletta Kochańska-Jeziorska: arletta_kochanska@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe: Quorum sensing, autoinduktory, laktony N-acylo-L-homoseryny, ISR, SAR

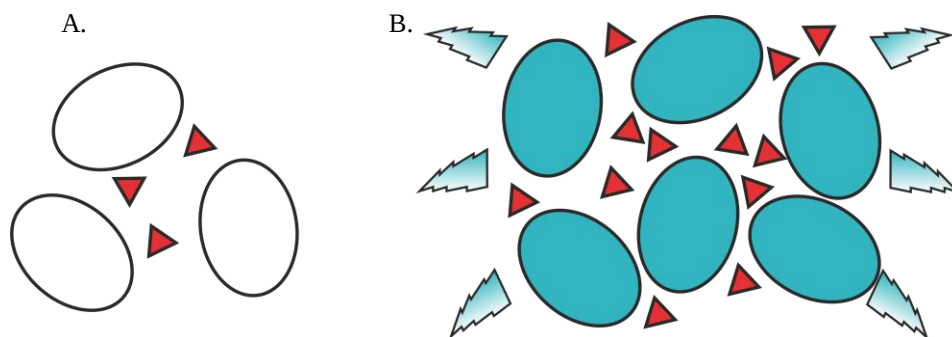
Streszczenie

Dotychczas bakterie uważano za organizmy niespołeczne, pozbawione możliwości porozumiewania się. Odkrycie zjawiska quorum sensing (QS) stało się fenomenem i otworzyło wiele nowych możliwości. QS to bakteryjny system komunikacji, zależny od zagęszczenia populacji tych bakterii. Odgrywa ważną rolę w regulacji wielu genów np. bioluminescencji, wirulencji, tworzenia biofilmu, a także koordynuje i kontroluje zachowanie pojedynczych komórek w populacji. Mediatorem w komunikacji typu QS są małe cząsteczki – autoinduktory, które można przyrównać do słów tego molekularnego języka. Cząsteczki te cieszą się dużym zainteresowaniem ze względu na swoje działanie nie tylko na bakterie, ale również na organizmy eukariotyczne, bowiem niektóre z nich mogą korzystnie wpływać na wzrost i odporność roślin. Sygnalizacja komórkowa jest szczególnie ważna w ekstremalnych środowiskach i może odgrywać kluczową rolę w zwiększaniu bioróżnorodności mikroorganizmów. Umysłne blokowanie autoinduktorów produkowanych przez patogeny może stać się przełomem w czasach wzrastającej wśród bakterii antybiotykoodporności. Natomiast stosowanie konkretnych cząsteczek sygnałowych lub bakterii je produkujących na roślinach może wpływać na pozytywną odpowiedź rośliny i objawiać się odpornością na ataki patogenów czy stres solny.

1. Wstęp

Quorum sensing znane jest od końca lat 70-tych XX wieku, za sprawą Nealson i Hastings (1979), którzy to opisali dwa gatunki bakterii morskich *Vibrio fischeri* i *Vibrio harveyi*, wykazujących zjawisko bioluminescencji zależnej od wysokiego stężenia ich komórek w środowisku (Rys. 1). System komunikacji QS opiera się na działaniu tzw. autoinduktorów (AI), cząsteczek sygnałowych wytwarzanych przez bakterie. W literaturze wyróżnia się kilka typów autoinduktorów AI-1 (reprezentowane przez laktony N-acylo-L-homoseryny), AI-2 (diester boranowy furanozyłu) oraz AI-3. Dotychczas uważano, że bakterie gram ujemne i gram dodatnie wykorzystują inne cząsteczki sygnałowe. Zakładano że te pierwsze do komunikacji wykorzystując głównie laktony N-acylo-L-homoseryny (AHL), natomiast te drugie do komunikacji wykorzystują oligopeptydy (Miller i Bassler 2001). Najlepiej poznanym systemem QS jest LuxI/LuxR odkryty u wspomnianych wcześniej bakterii morskich *V. fischeri*. System LuxI/LuxR ma swoje homologii u wielu innych bakterii gram ujemnych. W świetle najnowszych badań mikroorganizmów glebowych Antarktydy, wynika że bakterie gramododatnie również mogą posługiwać się tym systemem i syntetyzować laktony N-acylo-L-homoseryny do tej pory przypisywane tylko bakteriom gram ujemnym (Wong i in. 2019). Cząsteczka AHL składa się z trzech części: pierścienia laktonu homoseryny, grupy amidowej oraz grupy acylowej (łańcucha kwasu tłuszczowego). Molekularny mechanizm QS systemu LuxI/LuxR na przykładzie *V. fischeri* oparty jest na działaniu 3-oxo-C6-HSL (autoinduktora), który jest syntetyzowany przez białko LuxI (Eberhard i in. 1984). W miarę wzrostu liczby komórek bakteryjnych, wzrasta stężenie autoinduktora (na zewnątrz i wewnątrz komórki). Po przekroczeniu stężenia progowego AI, białko LuxR wiąże się z AI i powstały kompleks przyłącza się do promotora *luxCDABE* (Engebrecht i in. 1983). Skutkuje to transkrypcją *luxI* – genu regulatorowego kodującego AI oraz transkrypcją operonu *luxCDABE* – kodującego 5 genów strukturalnych lucyferazy. To z kolei

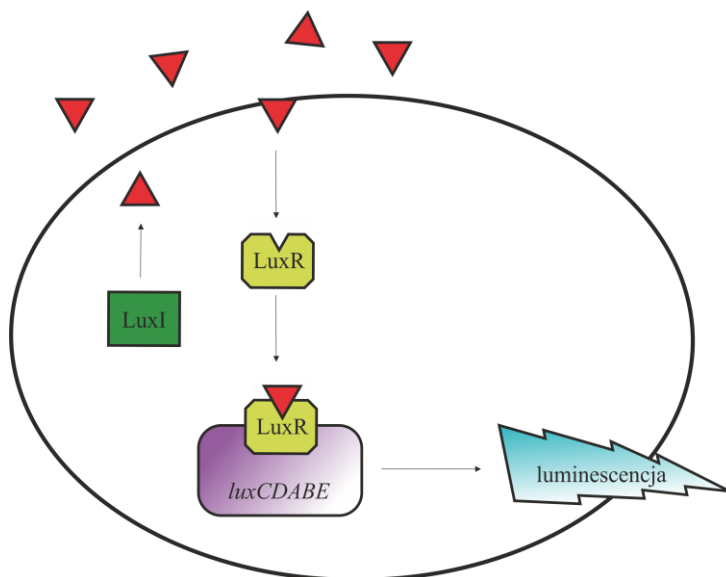
proceeds to increased synthesis of AI and production of luciferase, which is manifested by the phenomenon of bioluminescence (Fig. 2).



Rys. 1. System QS zależny od zagęszczenia komórek na przykładzie *Vibrio fischeri*. (A) małe zagęszczenie komórek, małe stężenie autoinduktora (trójkąt), brak bioluminescencji, (B) duże zagęszczenie komórek, autoinduktor przekroczył stężenie progowe powodując ekspresję genów związanych z bioluminescencją.

Over the years, the influence of bacteria producing lactones N-acyl-L-homoserine or the same molecules on plants has been studied. The action of these compounds largely depends on the length of the fatty acid chain and the plant, which is treated with them, but a certain tendency can be observed. Short-chain AHLs promoted plant growth, while long-chain AHLs influenced the induction of resistance (Tab. 1). It was observed that a significant improvement in wheat yield was achieved when C6-HSL was used (Moshynets et al. 2019). 3-oxo-C8-HSL stimulated the response of *Arabidopsis* to biotic stress (Liu et al. 2020). Beans and tomatoes inoculated with *Serratia plymuthica*, which produces C4-HSL, C6-HSL and 3-oxo-C6-HSL, showed resistance to pathogen attack (Pang et al. 2009). In addition, 3-oxo-C6-HSL is able to increase the tolerance of plants to salt stress (Zhao et al. 2020). It is worth noting that the response of plants to AHLs can be divided into two types of systemic resistance: systemic acquired resistance (SAR) and induced systemic resistance (ISR). SAR is described as a response induced by pathogens and dependent on salicylic acid, while ISR is induced by beneficial bacteria and dependent on jasmonic acid and ethylene. The elicitor of ISR is among other microorganisms non-pathogenic, e.g. bacteria promoting plant growth (Plant Growth Promoting Rhizobacteria – PGPR) (Wees et al. 1998). The topic of SAR and ISR has become controversial due to the fact that some researchers claim that salicylic acid is necessary for the ISR response and that proteins associated with pathogenesis are also involved in this type of resistance. In the monograph “Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants” (2006) a division was proposed, in which SAR is not considered a separate type of resistance, but one of the subtypes of ISR: (1) ISR activated by β -aminolipic acid (BABA), (2) SA-ISR: ISR dependent on salicylic acid (SAR), (3) JA-ISR: ISR dependent on jasmonic acid and generally associated with PGPR. From this point of view, researchers are interested in the phenomenon of QS in the context of induction of resistance in plants and are becoming more cautious, because currently the topic is not fully understood. Not only bacteria are able to produce AHLs, but also many other organisms can synthesize compounds of similar structure. Many studies indicate that not only bacteria, but also fungi and plants can produce AHLs (Loh et al. 2002), and some of them are also able to produce quorum quenching compounds (QQ). Inhibitory

QQ można podzielić na trzy kategorie: hamujące aktywność enzymów biorących udział w biosyntezie AHL, degradujących cząsteczki AHL, oraz blokujące receptory dla AHL. Roślinne inhibitory QS można znaleźć w czosnku, ekstrakcie z brokołu, olejkach eterycznych kardamonu, oregano, imbiru oraz wielu ekstraktach owocowych (Helman i Chernin 2015). Inhibitory QS mogą służyć roślinom jako tarcza w obronie przed patogenami, zatem zjawisko QS może mieć pozytywne jak i negatywne skutki.



Rys. 2. Schemat działania systemu QS na przykładzie *V. fischeri*.

Tab. 1 Wpływ wybranych cząsteczek sygnałowych AHL na rośliny (na podstawie tabeli Khan i in. (2019)).

Cząsteczka sygnałowa AHL	Wpływ na rośliny	Roślina
C6-HSL	Wydłużanie korzenia głównego	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Regulacja genów związanych z obroną	<i>Lycopersicon esculentum</i>
3-oxo-C6-HSL	Wzrost i rozwój korzeni	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Wzmaganie odporności	<i>Cucumies sativa</i> <i>Lycopersicon esculentum</i>
C6-HSL, C8-HSL, C10-HSL	Wzrost korzeni i pędów, modulacja aktywność S-transferazy glutationu i reduktazy dehydroaskorbinianowej (DHAR)	<i>Hodeum vulgare</i>
C4-HSL, 3-oxo-C4-HSL, C6-HSL, 3-oxo-C6-HSL	Odpowiedź podobna do indukowanej odporności systemicznej (ISR)	<i>Phaeseolus vulgaris</i> <i>Lycopersicon esculentum</i>
3-oxo-C8-HSL	Aktywacja odpowiedzi obronnej i przebudowy cytoszkieletu	<i>Arabidopsis thaliana</i>
3-oxo-C10-HSL	Formowanie korzeni przybyszowych	<i>Vignaradiata</i>
C12-HSL	Stymulacja rozwoju korzeni włośnikowych	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Cząsteczka sygnałowa AHL	Wpływ na rośliny	Roślina
C8-HSL, C12-HSL	Wzrost wydłużeniowy korzeni, aktywacja odporności	<i>Hodeum vulgare</i>
C8-HSL, C10-HSL, C12-HSL, C14-HSL	Indukcja odporności	<i>Saccharum officinarum</i>
3-oxo-C12-HSL, 3-oxo-C16-HSL	Sterowanie mechanizmami odporności	<i>Medicago truncatula</i>
3-oxo-C14-HSL	Zwiększenie odporności na patogeny	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	Zwiększenie liczby brodawek korzeniowych	<i>Medicago truncatula</i>

Ponieważ zjawisko QS jest fenomenem i wiąże się z nim wiele nadziei, zaczęto konstruować szczepy bakterii, nie tylko zdolne do wykrywania AHL, ale także określenia ich długości. Za pomocą tak zwanych biosensorów, w relatywnie szybki i łatwy sposób można wykryć AHL i oszacować ich długość. Do jednych z najbardziej popularnych biosensorów należy *Chromobacterium violaceum* (CV026), mutant z zablokowaną ciągłą produkcją fioletowego pigmentu – wiołaceiny. Pigment ten jest wytwarzany tylko w obecności egzogennych AHL (Steindler i Venturi 2007). CV026 wykrywa trzy rodzaje cząsteczek AHL: C4-HSL, C6-HSL i C8-HSL. Jednakże, możliwe jest zablokowanie wydzielania pigmentu przez CV026, nawet przez ww cząsteczki, pod wpływem długołańcuchowych AHL (Teplitski i in. 2000). Wzrastające siewki wydzielają homologi bakteryjnych, długich AHL, tym samym powodując inhibicję syntezy wiołaceiny. Oprócz CVO26, wykorzystuje się również modyfikowane bakterie *Escherichia coli* np. z genem reporterowym kodującym lucyferazę (*luxCDABE*) czyli opartym na zjawisku bioluminescencji. Poza *E. coli*, modyfikuje się również *Agrobacterium tumefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* z systemem reporterowym opartym na produkcji β -galaktozydazy, czy *Pseudomonas aeruginosa* z systemem reporterowym opartym na ekspresji β -glukuronidazy w obecności AHL konkretnych długości.

2. QS w środowiskach ekstremalnych

Mikroorganizmy zamieszkujące ekstremalne środowiska często wykazują ciekawe cechy adaptacyjne. Substancje wytwarzane przez te organizmy są często przedmiotem zainteresowania badaczy ze względu na ich potencjał biotechnologiczny. Wraz z odkryciem zjawiska QS wzrosło zainteresowanie działaniem tego systemu w ekstremalnych warunkach. Kilka grup mikroorganizmów zasiedlających ekstremalne środowiska, wykazują aktywność AHL i są to m.in. halofile, termofile bakterie pochodzące z terenów metalonośnych (Montgomery i in. 2013). Zjawisko QS u mikroorganizmów środowisk ekstremalnych jest szczególnie ważne z punktu widzenia poznania mechanizmów związanych z adaptacją w trudnych warunkach, przekazywaniem informacji i szybkiego reagowania na zmieniające się warunki (Wong i in. 2019). Mimo skromnych informacji na temat QS w środowiskach zanieczyszczonych pierwiastkami śladowymi, dotychczasowe badania wskazują jednoznacznie na to, że zjawisko QS jest pozytywnie skorelowane z mechanizmem odporności na metale. *Acinetobacter junii* BB1A to metalo-tolerancyjny szczep, który tworzy biofilm (proces kontrolowany przez zjawisko QS), wykazano również, że podawanie inhibitorów QS znacząco ogranicza wzrost komórek i formowanie biofilmu w obecności jonów metali (Sarkar i Chakraborty 2008). Podobne zjawisko obserwowano w przypadku *Acidithiobacillus ferrooxidans* odpornego na wysokie stężenie Cu^{+2} . Po potraktowaniu *A. ferrooxidans* inhibitorem QS, wykazywał większą wrażliwość na jony miedzi (Wenbin i in. 2011). Ponadto mechanizmy odporności na metale i oporności na antybiotyki są ze sobą powiązane jak w przypadku *Pseudomonas aeruginosa*. W obecności jonów metali, białko regulatorowe CzcR indukuje ekspresję pompy CzcCBA, która wydala je na zewnątrz komórki. Co więcej CzcR również wpływa na odporność *P.aeruginosa* na antybiotyki, przez blokowanie ekspresji białka porynowego OprD, biorącego udział w transporcie

antybiotyku do komórki, jest podstawowym mechanizmem oporności *P. aeruginosa* na karbapenemy (Dieppeis i in. 2012).

3. Rośliny, metale i Quorum Sensing

Metalofity (rośliny metalolubne), występujące na glebach o wysokiej zawartości metali, szczególnie cynku, ołowiu, kadmu, miedzi i niklu. Wśród metalofitów można wyróżnić hiperakumulatory, rośliny które w swoich tkankach gromadzą duże ilości metali i należą do nich między innymi pleszczotka górska (*Biscutella laevigata*), tobołki okrągłolistne (*Thlapsi rotundifolium*) czy rzeżusznik Hallera (*Cardaminopsis halleri*). Rośliny wzrastające w niekorzystnym środowisku np. na terenach metalonośnych, aby przetrwać muszą wykształcić szereg mechanizmów umożliwiających im adaptację do środowiska. Wśród tych mechanizmów należą np. produkcja różnych substancji przez korzenie, które mają za zadanie wiązać jony metali, jak również podnosić pH w ryzosferze przez co jony metali stają się mniej dostępne dla roślin. Oprócz tego rośliny mogą również wchodzić w związki symbiotyczne czy to z grzybami mikoryzowymi czy z bakteriami. Większość roślin strączkowych ma zdolność do nawiązania symbiozy z bakteriami wiążącymi azot w glebie, określanymi łącznie jako rizobia, np. *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, czy *Sinorhizobium*. Symbioza charakteryzuje się wysoką specyficznością, gdyż poszczególne gatunki bakterii tworzą brodawki korzeniowe na określonej liczbie gatunków roślin, które stają się gospodarzami. Wysoka specyficzność tego układu zależy od zestawu genów mikrosymbionta i gospodarza, który pozwala na nawiązanie symbiozy. Proces infekcji jest bardzo złożony, a jego warunkiem jest wzajemne rozpoznanie się obu partnerów symbiozy. Roślina wytwarza chemoatraktanty, które aktywują geny nod rizobiów (w stanie wolnym rizobiów albo te geny nie ulegają ekspresji albo ulegają ekspresji w bardzo małym stopniu). W odpowiedzi, mikrosymbiont wytwarza czynnik Nod, polisacharydy powierzchniowe, białka sekrecyjne i laktony N-acylo L-homoseryny. Wniknięcie bakterii ma miejsce na wierzchołku włośnika korzeniowego, po czym następuje proces powstawania brodawki korzeniowej. Rośliny będące w symbiozie, zawierały znacznie mniejsze stężenie metali w korzeniach i pędach w porównaniu do roślin nie będących w symbiozie (Wani i in. 2007). Uważa się, że system QS reguluje funkcje związane z optymalizacją interakcji roślina-gospodarz np. wzmaga inicjację infekcji przez *Rhizobium leguminosarum*, oraz wpływa na zwiększenie liczby bakteroidów jak w przypadku *Sinorhizobium meliloti*. Oprócz tego QS może okazać się jednym z wymaganych czynników do nawiązania efektywnej symbiozy (Sanchez-Contreras i in. 2007). Poza wpływaniem na proces nawiązywania symbiozy bakterie takie *Sinorhizobium meliloti* wytwarzają 3-oxo-C16-HSL, który może wpływać na odporność roślin. Niestety badania nad wpływem autoinduktorów na rośliny w warunkach wysokiego stężenia metali ciężkich są ograniczone, a sam temat wymaga głębszego poznania.

4. Podsumowanie

Zjawisko QS przyniosło przełom w badaniach mikrobiologicznych. Organizmy dotąd uważane za „nieme, głuche i aspołeczne” zostały niejako odkryte na nowo, a wiele procesów zostało w końcu wytłumaczonych działaniem cząsteczek sygnałowych. Cząsteczki sygnałowe wytwarzane przez mikroorganizmy nie tylko służą jako język porozumiewania się bakterii ale również mogą sterować wieloma procesami zachodzącymi w organizmach eukariotycznych, niosącymi ze sobą negatywne lub pozytywne efekty. Znajac mechanizm tego zjawiska i naturę jego mediatorów jest nadzieja na powstanie kolejnej generacji antybiotyków, preparatów wzmagających odporność roślin czy poprawę ich plonowania. Ponadto ciekawym aspektem jest umiejętność syntezy podobnych związków przez organizmy eukariotyczne, a także skomplikowane interakcje mikroorganizm-roślina, które do tej pory nie są do końca poznane. Być może odkrywając QS badacze poznali najstarszy mechanizm komunikacji, który stał się pierwowzorem dla komunikacji w bardziej skomplikowanych układach biologicznych.

5. Literatura

- Diepinois G, Ducret V, Caille i in. (2012) The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One 7.
- Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard i in. (1984) Structural Identification of Autoinducer of *Photobacterium fischeri*. Biochemistry 20: 2444–2449.
- Engbrecht J, Nealson K, Silverman M (1983) Bacterial Bioluminescence : Isolation and Genetic Analysis of Functions from *Vibrio fischeri*. Cell 32: 773–781.
- Helman Y, Chernin L (2015) Silencing the mob: Disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. Molecular Plant Pathology 16: 316–329.
- Khan M, Bhargava P, Goel R (2019) Quorum Sensing Molecules of Rhizobacteria: A Trigger for Developing Systemic Resistance in Plants. Microorganisms for Sustainability 12: 117–138.
- Liu F, Zhao Q, Jia Z i in. (2020) N-3-oxo-octanoyl-homoserine lactone-mediated priming of resistance to *Pseudomonas syringae* requires the salicylic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biology 20: 1–13.
- Loh J, Carlson RW, York i in. (2002) Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 14446–14451.
- Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum Sensing in Bacteria. Annual Review of Microbiology 55: 165–199.
- Montgomery K, Charlesworth JC, Le Bard i in. (2013) Quorum sensing in extreme environments. Life 3: 131–148.
- Moshynets OV, Babenko LM, Rogalsky i in. (2019) Priming winter wheat seeds with the bacterial quorum sensing signal N-hexanoyl-L-homoserine lactone (C6-HSL) shows potential to improve plant growth and seed yield. PLoS One 14: 1–17.
- Nealson KH, Hastings JW (1979) Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance. Microbiological Reviews 43: 496–518.
- Pang Y, Liu X, Ma Y i in. (2009) Induction of systemic resistance, root colonisation and biocontrol activities of the rhizospheric strain of *Serratia plymuthica* are dependent on N-acyl homoserine lactones. European Journal of Plant Pathology 124: 261–268.
- Sanchez-Contreras M, Bauer WD, Gao M i in. (2007) Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 362: 1149–1163.
- Sarkar S, Chakraborty R (2008) Quorum sensing in metal tolerance of *Acinetobacter junii* BB1A is associated with biofilm production. FEMS Microbiology Letters 282: 160–165.
- Steindler L, Venturi V (2007) Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. FEMS Microbiology Letters 266: 1–9.
- Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD (2000) Plants Secrete Substances That Mimic Bacterial N-Acyl Homoserine Lactone Signal Activities and Affect Population Density-Dependent Behaviors in Associated Bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions 13: 637–648.
- Van Loon LC Van (1985) Pathogenesis-related proteins. Plant Molecular Biology 4: 111–116.
- Wani PA, Khan MS, Zaidi A (2007) Impact of heavy metal toxicity on plant growth, symbiosis, seed yield and nitrogen and metal uptake in chickpea. Australian Journal of Experimental Agriculture 47: 712–720.
- Wees SCM Van, Pelt JA Van, Knoester M i in. (1998) A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 10: 1571–1580.
- Wenbin N, Dejuan Z, Feifan L i in. (2011) Quorum-sensing system in *Acidithiobacillus ferrooxidans* involved in its resistance to Cu²⁺. Letters in Applied Microbiology 53: 84–91.
- Wong SY, Charlesworth JC, Benaud N i in. (2019) Novel Quorum Sensing Activity in East Antarctic Soil Bacteria. bioRxiv.
- Zhao Q, Yang XY, Li Y i in. (2020) N-3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone, a bacterial quorum sensing signal, enhances salt tolerance in *Arabidopsis* and wheat. Botanical Studies 61.

3. Nukleazy miejscowo-specyficzne stosowane w edycji genomów roślin

Side-specific nucleases used in plant genome editing

Przemysław Olejnik

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Promotor: prof. UPP dr hab. Katarzyna Nuc

Olejnik Przemysław: przemyslaw.olejnik.92@gmail.com

Słowa kluczowe: meganukleazy, TALEN, ZFP, CRISPR/Cas9

Streszczenie

Współcześnie jednym z największych wyzwań jakiemu musi stawić czoła ludzkość jest zapewnienie wystarczającej ilości pożywienia dla stale rosnącej populacji przy zachowaniu wysokich standardów dotyczących jakości produkcji i jak najniższego negatywnego wpływu na środowisko naturalne. Osiągnięcie tego celu wymaga wprowadzenia nowych odmian roślin uprawnych, które z jednej strony zapewnią osiągnięcie wyższego i stabilnego plonu a z drugiej strony wykazywać będą zwiększoną odporność na niekorzystne czynniki środowiska. Stosowane metody hodowli obejmujące krzyżowania i mutagenizę z wykorzystaniem czynników chemicznych i fizycznych oraz późniejszą selekcję uzyskanych roślin potomnych są czasochłonne i kosztowne co znacznie spowalnia postęp biologiczny. Szansę na rozwiązanie tego problemu dają techniki edycji genomu, które wykorzystując miejscowo-specyficzne nukleazy umożliwiają dokonanie zmian w ściśle określonej sekwencji w genomie rośliny uprawnej. Celem niniejszej pracy jest zaprezentowanie narzędzi edycji genomu stosowanych w hodowli roślin uprawnych. Opisane zostały mechanizmy działania poszczególnych metod, ich wady i zalety. Zaprezentowano również przykłady zastosowań edycji genomu w hodowli roślin.

1. Wstęp

Rośliny uprawne stanowią główne źródło żywności dla ludzi i zwierząt hodowlanych. W czasach pogłębiających się zmian klimatu oraz wzrostu liczebności populacji coraz częściej poruszane są kwestie dotyczące zapewnienia wystarczających dostaw żywności. Szacuje się, że do połowy XXI w. na całym świecie żyło będzie ponad 10 mld ludzi co wymagało będzie podwojenia ilości kalorii pozyskiwanych z roślin uprawnych. Niestety jedynie 20% tej wartości jest możliwe do osiągnięcia poprzez zwiększenie powierzchni upraw. Pozostałe 80% musi zostać uzyskane w wyniku intensyfikacji produkcji, którą można osiągnąć przez wprowadzenie do uprawy nowych odmian roślin. Dodatkowymi wyzwaniami, którym musi stawić czoła nowoczesne rolnictwo są rosnące oczekiwania konsumentów dotyczące jakości żywności i minimalizacji wpływu uprawy na środowisko naturalne.

Powstawanie mutacji w obrębie genów leży u podstaw ewolucji i postępu biologicznego w produkcji roślinnej. Współcześnie rozwój inżynierii genetycznej oraz genomiki umożliwia identyfikację mutacji wpływających pozytywnie na ważne cechy użytkowe roślin a nawet ich wprowadzanie, co w pewnym sensie przyspiesza proces ewolucji. Mutacje mogą powstawać i gromadzić się spontanicznie jako efekt błędów polimerazy pojawiających się w trakcie replikacji, transpozycji czy naprawy uszkodzonych fragmentów DNA. Mogą być również indukowane przez fizyczne i chemiczne czynniki mutagenne. Mutageneza indukowana jest od lat stosowana z dużym powodzeniem w hodowli roślin uprawnych. Zastosowanie tej metody powoduje powstanie licznych mutacji w obrębie genomu, których lokalizacja jest przypadkowa. Stanowi to główną wadę mutagenezy indukowanej czynnikami fizycznymi i chemicznymi. Uzyskanie nowej odmiany wymaga często długotrwałego etapu obejmującego liczne krzyżowania wsteczne oraz selekcje mające na celu uzyskanie mutantów o pożądanym cechach.

Szansę na przezwyciężenie tych niedogodności dają techniki edycji genomu, które wykorzystując specyficzne endonukleazy umożliwiają wprowadzenie zmian w ściśle określonym miejscu genomu.

2. Opis zagadnienia

W latach 90. XX w. osiągnięcia biologii molekularnej i inżynierii genetycznej umożliwiły wprowadzanie mutacji w ściśle określonych miejscach genomu dając początek edycji genomu. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu miejscowo specyficznych nukleaz takich jak meganukleazy, nukleazy z motywem palca cynkowego (ZNF, ang. Zinc Finger Nucleases), nukleazy TALE (TALEN ang. Transcription Activator-Like Effector Nucleases) i system CRISPR/Cas (ang. Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats). Cechą wspólną wymienionych metod edycji genomu jest hydroliza wiązania fosfodiesterowego obu nici dsDNA w rejonie o ściśle określonej sekwencji. Pojawienie się pęknięcia dsDNA prowadzi do aktywacji kaskady reakcji prowadzących do uruchomienia wewnątrzkomórkowych mechanizmów naprawczych. Jednym z nich jest naprawa przez łączenie końców niehomologicznych (NHEJ ang. non-homologous end joining). Mechanizm ten jest najczęściej angażowany przez komórkę w celu naprawy uszkodzeń DNA. Jego uruchomienie prowadzi do insercji lub delecji (mutacja typu indel) kilku nukleotydów w obrębie powstałego uszkodzenia. Jeżeli pęknięcie znajduje się w sekwencji kodującej naprawa za pomocą NHEJ zwykle skutkuje przedwczesnym zakończeniem transkrypcji lub powstaniem białka o zmienionej sekwencji aminokwasowej a co za tym idzie odmiennej strukturze przestrzennej uniemożliwiającej lub upośledzającej funkcję białka. W przypadku gdy w niedalekiej odległości dojdzie do dwóch pęknięć nici dsDNA poza mutacją typu indel może dojść do delecji lub inwersji fragmentu znajdującego się pomiędzy pęknięciami. (Gaj i in. 2016)

Drugi mechanizm, którym jest rekombinacja homologiczna ulega aktywacji w momencie gdy w komórce obecny jest fragment, który może posłużyć jako tak zwany donor, czyli fragment DNA posiadający sekwencje homologiczne do tych występujących po obu stronach uszkodzenia. W takiej sytuacji dochodzi do rekombinacji, której skutkiem jest wymiana uszkodzonego fragmentu DNA na fragment donora. Wykorzystanie tego mechanizmu stwarza liczne możliwości edycji genomu takie jak wprowadzenie transgeny, usunięcie fragmentu DNA, wymianę istniejącego allelu na inny, warunkujący kształtowanie pożądanej cechy produkcyjnej lub naprawy uszkodzonego allelu poprzez zastąpienie kilku nukleotydów. (Gaj i in. 2016) Niestety mechanizm naprawy uszkodzeń genomu za pomocą rekombinacji homologicznej nadal nie został wyjaśniony a sama wydajność tego procesu jest niska.

Współcześnie znanych jest wiele metod edycji genomu z wykorzystaniem specyficznych nukleaz, które można podzielić na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowią narzędzia, których specyficzność działania wynika z interakcji białko-DNA. Do tej grupy należą meganukleazy, nukleazy z domeną palca cynkowego oraz nukleazy TALE. Druga z grup, do której zaliczają się metody wykorzystujące interakcje białko-kwasy nukleinowe, można podzielić na dwie podgrupy. Pierwszą z nich stanowią systemy, w których nukleazy naprowadzane są na sekwencję docelową przez RNA. Do tej kategorii zaliczamy system CRISPR/Cas i targetrony. Drugą podgrupę stanowią systemy w których za naprowadzanie nukleazy odpowiada DNA. W tej grupie możemy wyróżnić kwasy peptydonukleinowe (PNAs ang. peptide nucleic acids), trójniciowe oligonukleotydy (TFOs ang. triplex-forming oligonucleotides) i SGN (ang. structure-guided endonucleases). (Guha i in. 2017)

W niniejszej pracy poruszone zostaną zagadnienia dotyczące najczęściej używanych narzędzi edycji genomu jakimi są meganukleazy, ZNF, TALEN i system CRISPR/Cas.

3. Przegląd literatury

Meganukleazy są jednymi z najstarszych narzędzi edycji genomu stosowanymi w modyfikacjach sekwencji DNA roślin. Są to enzymy naturalnie występujące w wielu organizmach żywych. Dotychczas zidentyfikowano je u archebakterii, grzybów, niektórych gatunków alg, roślin i zwierząt oraz fagów. Meganukleazy są nazywane również samonaprowadzającymi nukleazami (ang. *homing endonucleases*) i klasyfikowane są jako „samolubne elementy genetyczne”. Molekuły tego

typu zdolne są do samoczynnego wycinania się z cząsteczki gospodarza (np. mRNA z intronów). (Xu i in. 2015)

Ze względu na obecność charakterystycznych motywów strukturalnych samonaprowadzające nukleazy zostały podzielone na 4 rodziny. Największą a zarazem najczęściej stosowaną w edycji genomów roślin jest rodzina LAGLIDADG zawdzięczająca nazwę obecności jednego bądź dwóch motywów aminokwasowych LAGLIDADG. Meganukleazy zawierające dwa wspomniane motywy są aktywne jako monomery z kolei te posiadające jeden motyw funkcjonują jako homodimery. Najczęściej stosowaną nukleazą należącą do tej rodziny jest I-CreI posiadająca jeden motyw LAGLIDADG i rozpoznająca sekwencję o długości 22 pz. Funkcjonalna endonukleaza zbudowana jest z dwóch monomerów wiążących sekwencje o długości 9 pz, pomiędzy którymi znajduje się fragment długości 4 pz niezwiązany z żadnym z monomerów. Meganukleaza I-CreI nacina wiązania fosfodiesterowe na końcach 3' wspomnianej sekwencji centralnej formując tym samym lepkie końce. Mechanizm rozpoznawania sekwencji przez nukleazę I-CreI polega na bezpośrednim wiązaniu zasad azotowych występujących w DNA z łańcuchem bocznym pojedynczego aminokwasu zawartego w strukturze endonukleazy. Dzięki temu możliwe jest takie zaprojektowanie sekwencji kodującej samonaprowadzające endonukleazy aby sekwencja aminokwasowa finalnego białka rozpoznawała dowolną sekwencję docelową. (Antunes i in. 2012)

Meganukleazy charakteryzują się wysoką specyficznością a co za tym idzie niską ilością efektów niedocelowych. Cecha ta jest istotna w edycji genomu, ponieważ umożliwia ograniczenie liczby etapów selekcji. Skuteczność samonaprowadzających nukleaz w edycji genomów roślin została potwierdzona w kilku eksperymentach. Jednym z nich jest zastosowanie zmodyfikowanej meganukleazy I-CreI w celu wprowadzenia mutacji w sekwencji promotora genu *LG1* kukurydzy. (Gao i in., 2010) Ponadto samonaprowadzające nukleazy zostały wykorzystane w celu usunięcia transgenu z genomu genetycznie modyfikowanego *Arabidopsis thaliana*. (Antunes i in., 2012) Meganukleazy nie pełnią aktualnie ważnej roli w edycji genomów roślin uprawnych ze względu na czasochłonny proces tworzenia konstruktorów i skomplikowaną metodykę.

Zdecydowanie większą popularnością wśród badaczy cieszą się nukleazy z motywem palca cynkowego. ZNF składają się z dwóch elementów. Pierwszy z nich, odpowiadający za oddziaływanie z określoną sekwencją DNA, zbudowany jest z 3-6 występujących po sobie motywów palca cynkowego. Każda z tych struktur rozpoznaje trzy kolejne nukleotydy sekwencji docelowej. (Chen i Gao 2014) Najwyższą aktywność endonukleazy zaobserwowano gdy ZNF zawierał 3-4 występujących po sobie motywów palca cynkowego. Zwiększenie ich liczby do 5-6 prowadzi do znacznego spadku aktywności endonukleazy przy jednoczesnym wzroście cytotoksyczności i zahamowaniu naprawy DNA z wykorzystaniem rekombinacji homologicznej. (Liu i in. 2015) Drugi z elementów stanowi endonukleaza *FokI*. Podobnie jak w przypadku meganukleaz z pojedynczym motywem LAGLIDADG, endonukleaza *FokI* do osiągnięcia aktywności katalitycznej wymaga dimeryzacji. Z tego powodu stosowanie ZFN wymaga stworzenia sekwencji kodujących dla dwóch nukleaz z motywem palca cynkowego połączonych linkerem o długości 5-9 pz. Każdy z elementów odpowiedzialnych za oddziaływanie z DNA jest zaprojektowany tak aby wiązał sekwencję nukleotydową położoną na przeciwległej nici w odległości 5-9 pz. Dzięki temu możliwa jest dimeryzacja nukleazy *FokI* i wprowadzenie pęknięcia w dwuniciowej strukturze DNA, którego skutkiem są lepkie końce na końcu 3'. Takie rozwiązanie zmniejsza ryzyko niespecyficznego oddziaływania ZNF z DNA gospodarza. (Chen i Gao 2014)

Metoda wykorzystująca nukleazy z motywem palca cynkowego stanowi jedną z najlepiej poznanych technik edycji genomu. Dzięki temu istnieją liczne bazy danych sekwencji (np. EENDb) i wiele aplikacji bioinformatycznych (np. PROGNOS) mających ułatwiać montaż motywów ZFN w zależności od sekwencji docelowej. Pomimo wielu lat badań nad ZFN nadal brak odpowiednich motywów dla wszystkich trypletów występujących w DNA co w dużym stopniu ogranicza możliwość naprowadzenia nukleazy *FokI* na konkretną sekwencję w genomie gospodarza. Ponad to technika wykorzystująca nukleazy z motywem palca cynkowego jest najbardziej kosztochłonną metodą edycji genomu spośród poruszanych w tej pracy.

Nukleazy z motywem palca cynkowego zostały wykorzystane na przykład w edycji genomu kukurydzy. Gen *IPKI* koduje enzym katalizujący jeden z końcowych etapów biosyntezy kwasu

fitowego występującego w dużych ilościach w nasionach kukurydzy. Substancja ta wykazuje właściwości antyżywniowe a spożywanie jej w dużych ilościach, ze względu na właściwości chelatujące kwasu, może prowadzić do niedoboru cynku, miedzi, żelaza, magnezu i wapnia. (Zhou i Erdman, 1995) Za pomocą ZFN wprowadzono pęknięcie podwójnej nici DNA w obrębie genu *IPKI* a następnie wykorzystując rekombinację homologiczną w miejsce uszkodzenia, wprowadzono krótką sekwencję DNA warunkującą wyciszenie ekspresji tego genu. W wyniku wprowadzonej modyfikacji uzyskano nasiona o zmniejszonej zawartości kwasu fitowego w porównaniu do roślin typu dzikiego. (Shukla i in. 2009) Nukleazy z motywem palca cynkowego wykorzystano również w hodowli tytoniu odpornego na herbicydy imidazolinowe i sulfonilomocznikowe, wprowadzając specyficzne mutacje w obrębie genów kodujących syntazy kwasu acetohydroksylowego (*SuRA* i *SuRB*). (Townsend i in. 2009)

Następcą metody ZFN została technika TALEN, której opracowanie było możliwe dzięki poznaniu mechanizmu infekcji roślin przez bakterie z rodzaju *Xantomonas*. Patogeny te wprowadzają do komórek gospodarza czynniki transkrypcyjne (tzw. TALE) zawierające domeny białkowe odpowiedzialne za oddziaływanie z elementami regulatorowymi obecnymi w genomie rośliny-gospodarza. W trakcie infekcji białka te oddziałują z promotorami genów, których ekspresja jest niezbędna do rozprzestrzeniania i mnożenia się bakterii. (Bogdanove i in. 2010; Kay i Bonas, 2009)

TALEN podobnie jak ZFN składa się z dwóch elementów połączonych za pomocą linkera w jedną całość. Pierwszym z nich jest nukleaza *FokI*, która wykazuje aktywność endonukleazy po dimeryzacji. Z tego powodu konieczne jest projektowanie dwóch, oddzielnych konstruktów. Jeden z nich oddziałuje z fragmentem nici sensownej. Drugi natomiast z regionem nici antysensownej oddalonym o około 16-19 nukleotydów w stosunku do pierwszego. Po dimeryzacji monomerów nukleazy *FokI*, dochodzi do hydrolizy wiązań fosfodiesterowych na końcach 3' co prowadzi do powstania lepkich końców. Domena odpowiedzialna za wiązanie DNA, wzorowana na TALE bakterii z rodzaju *Xantomonas*, składa się z 13-30 konserwatywnych, powtarzających się domen, z których każda zbudowana jest z 33 – 35 reszt aminokwasowych. Specyficzność oddziaływania każdej z nich z DNA wynika z występowania polimorfizmów między 12 i 13 aminokwasem sekwencji modułu (np. HD rozpoznający cytozynę, NG tyminę, NI adeninę i NN oddziałujące z guaniną i adeniną). Kompletny, czyli składający się z dwóch białek, TALEN rozpoznaje w sumie sekwencję docelową o długości do 60 pz. Tak duża długość w połączeniu ze ściśle określoną odległością względną sekwencji rozpoznawanych przez każde z dwóch białek znacząco zwiększa dokładność tej metody. (Miller i in. 2011)

TALEN dzięki prostocie budowy domeny wiążącej DNA i łatwości jej modyfikowania cieszy się dużym zainteresowaniem wśród hodowców. Ponad to charakteryzuje się wysoką wydajnością i powtarzalnością przy jednoczesnym zachowaniu niskiego poziomu efektów nie docelowych. Rosnące zainteresowanie tą metodą spowodowało rozwój narzędzi bioinformatycznych jej dedykowanych (np. TALENoffer). Pomimo wielu zalet TALEN nie jest pozbawiona wad. Jedną z nich jest ograniczenie efektywności edycji genomu w rejonach nieaktywnych transkrypcyjnie. Drugą natomiast wieloznaczność domeny rozpoznającej guaninę, która może również rozpoznawać adeninę.

TALEN został zastosowany między innymi w hodowli odmiany ryżu odpornej na baktrii *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (Xoo), która jest jednym z głównych patogenów atakujących tę roślinę uprawną. Patogen wykorzystując własne TALE wpływa na ekspresję genu *OsSWEET14* kodującego białko błonowe odpowiedzialne za wypływanie cukrów z komórki do przestrzeni międzykomórkowej, skąd łatwo mogą zostać pobrane przez bakterie w pełni zaspokajając ich zapotrzebowanie na substancje pokarmowe. Wykorzystując TALEN wyciszono ekspresję wspomnianego wyżej genu tym samym przeciwdziałając negatywnemu wpływowi patogenu na organizm gospodarza. Wspomniana modyfikacja nie upośledza funkcjonowania rośliny, ponieważ transport cukrów w ryżu jest możliwy przez inne białka błonowe na których ekspresję bakterie *Xanthomonas* nie wpływają. (Li i in. 2012)

Przechowywanie bulw ziemniaka w niskiej temperaturze hamuje kiełkowanie i przedłuża ich trwałość. Z drugiej strony jednak sprzyja akumulacji cukrów redukujących. W trakcie obróbki bulw w wysokiej temperaturze wspomniane węglowodany reagują z wolnymi aminokwasami czego

skutkiem jest brązowienie, gorzki posmak produktu, i zwiększenie zawartość rakotwórczego akrylamidu. Za rozkład sacharozy na glukozę i fruktozę w bulwach ziemniaka odpowiada inwertaza wakuolarna kodowana przez gen *Vlnv*. Dzięki wyciszeniu ekspresji wspomnianego genu za pomocą TALEN uzyskano rośliny, w bulwach których po przechowywaniu w chłodni nie wykryto cukrów redukujących a uzyskane z nich chipsy charakteryzowały się jaśniejszą barwą i niższą zawartością akrylamidu w porównaniu z produktem uzyskanym z bulw odmiany wyjściowej. (Clasen i in. 2016)

System CRISPR/Cas wywodzi się z bakteryjnego systemu obronnego zapobiegającego negatywnemu wpływowi fagów i obcych plazmidów na funkcjonowanie komórki. Ten mechanizm występuje powszechnie zarówno wśród bakterii i archeonów. W komórkach tych organizmów system składa się z trzech elementów. Pierwszym z nich jest endonukleaza Cas, której związanie i aktywność zależy od obecności sekwencji PAM (ang. **Protospacer Adjacent Motif**) w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji docelowej. W odróżnieniu od meganukleaz i endonukleazy *FokI*, występującej zarówno w ZFN jak i TALEN, białko Cas wprowadza pęknięcie w strukturze dsDNA pozostawiając tak zwane „tępe końce”. Dwoma pozostałymi elementami są krótkie sekwencje niekodującego RNA znane jako CRISPR RNA (crRNA) i transkrybujący RNA (tracrRNA), których zadaniem jest naprowadzenie endonukleazy na sekwencję docelową, umożliwienie jej rozpoznania i przecięcie obcego DNA w obrębie ściśle określonej sekwencji. W celu ułatwienia stosowania systemu stworzono jednociową chimerę RNA (sgRNA, ang. *single guide RNA*) będącą połączeniem obu powyższych cząsteczek RNA, która jest funkcjonalna w takim samym stopniu jak odpowiedniki występujące w naturze. (Jinek i in. 2012) Dzięki temu stosowany dziś na całym świecie system CRISPR/Cas składa się tylko z dwóch elementów co w znacznym stopniu ułatwia programowania sekwencji docelowej i wprowadzanie elementów systemu do komórki gospodarza.

System CRISPR/Cas jest coraz częściej stosowany w edycji genomów roślin uprawnych. Jego rosnąca popularność wynika z możliwości wprowadzania pęknięcia podwójnej nici DNA w konkretnym rejonie wykorzystując sekwencję RNA o długości zaledwie 20 nukleotydów. Wykorzystanie metody CRISPR/Cas w edycji genomu roślin jest najmniej czasochłonne i kosztochłonne w porównaniu z pozostałymi metodami przedstawionymi w niniejszej pracy. Ponad to dostępnych jest wiele narzędzi bioinformatycznych ułatwiających projektowanie sgRNA (np CRISPR-P v.2.0). System CRISPR/Cas posiada dwie główne wady. Pierwszą z nich jest stosunkowo wysoki poziom efektów nie docelowych. Drugą natomiast jest brak baz danych dotyczących oceny wpływu wprowadzenia i ekspresji elementów systemu na komórki gospodarza. Pomimo wad system CRISPR/Cas jest z powodzeniem stosowany w edycji genomów roślin uprawnych jak na przykład pszenica i rzepak.

Pszenica będąca jednym z najpowszechniej uprawianych gatunków roślin i należąca do głównych źródeł węglowodanów w diecie człowieka nie może być spożywana przez około 12% ludzi na świecie. Wynika to z obecności w ziarnach pszenicy glutenu, którego spożywanie przez osoby cierpiące na celiakię prowadzi do nadmiernej odpowiedzi układu immunologicznego. Za pomocą systemu CRISPR/Cas wyciszono ekspresję genów kodujących α -gliadyny, składniki glutenu wywołujące najsilniejszą odpowiedź układu odpornościowego. Dzięki temu uzyskano odmianę pszenicy o obniżonej zawartości glutenu, której immunoreaktywność była niższa o 85% w porównaniu z odmianą wyjściową (Sanchez-Leon i in., 2018)

Rzepak jest ważną rośliną oleistą, której nasiona zawierają 3 główne nienasycone kwasy tłuszczowe: oleinowy (18:1), linolowy (18:2) i linolenowy (C18:3). Zawartość i względna ilość wymienionych kwasów w oleju rzepakowym jest istotna zarówno ze względu na wartości odżywcze jak i na przydatność w przemyśle spożywczym. Zwiększona zawartość kwasu oleinowego w nasionach tego gatunku zwiększa termostabilność uzyskanego z nich oleju dzięki czemu zwiększa się jego przydatność w procesach wymagających wysokiej temperatury. Wszystkie z wymienionych nienasyconych kwasów tłuszczowych wywodzą się z kwasu stearynowego, który na skutek aktywności saturazy SAD jest redukowany do kwasu oleinowego. Ten z kolei dzięki aktywności saturazy FAD2 ulega redukcji do kwasu linolowego, który jest redukowany przez saturazę FAD3 do kwasu linolenowego. Stosując system CRISPR/Cas9 wyciszono ekspresję genu kodującego saturazę FAD2 co spowodowało znaczny wzrost zawartości kwasu oleinowego w nasionach w porównaniu do roślin typu dzikiego. (Okuzaki i in., 2018)

4. Podsumowanie

Metody edycji genomu są obiecującym narzędziem w rękach hodowców roślin uprawnych. W odróżnieniu do mutagenazy z wykorzystaniem czynników fizycznych i chemicznych charakteryzują się dużą specyficznością i umożliwiają dokładne zaplanowanie miejsca wprowadzenia mutacji. Omówione w niniejszej pracy meganukleazy, nukleazy z motywem palca cynkowego, TALEN i system CRISPR/Cas9 wprowadzają pęknięcie w obrębie zaplanowanej sekwencji docelowej co powoduje aktywację mechanizmów naprawczych. Naprawa uszkodzenia poprzez łączenie końców niehomologicznych może prowadzić do knock-out'u genowego bądź delekcji lub inwersji fragmentu DNA pomiędzy dwoma uszkodzeniami. Naprawa z wykorzystaniem rekombinacji homologicznej umożliwia wprowadzenie lub usunięcie fragmentu DNA, oraz dokonania wyrafinowanych mutacji pojedynczych nukleotydów w sekwencji docelowej. Narzędzia edycji genomu mogą znacznie przyspieszyć proces uzyskania nowych odmian roślin uprawnych jednakże w wielu krajach ich uprawa jest ograniczona lub zabroniona ze względu na obowiązujące regulacje prawne.

5. Literatura

- Antunes MS, Smith JJ, Jantz D i in. (2012) Targeted DNA excision in Arabidopsis by re-engineered homing endonuclease. *BMC Biotechnology* 12:1-12.
- Bogdanove AJ, Shornack S, Lahaye T (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol* 13:394-401.
- Chen K, Gao C (2014) Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep* 33(4): 575-583.
- Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S i in. (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through target gene knockout. *Plant Biotechnol. J* 14: 169:176.
- Gaj T, Sirk SJ, Shui SL i in. (2016). Genome-editing technologies: principles and applications. *CSH Perspect Biol* 8(12): a023754.
- Gao H, Smith J, Yang M i in. (2010) Heritable targeted mutagenesis in maize using a designed endonuclease. *The Plant Journal* 61:176-187.
- Guha TK, Wai A, Hauser G (2017) Programable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. *Comput Struct Biotech* 15: 146-160.
- Jinek M, Chyliński K, Fonfara I i in. (2012) A programable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821.
- Kay S, Bonas U (2009) How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 12: 37-43.
- Li T, Liu B, Spalding MH i in. (2012) High-efficiency TALEN-based genome editing produces disease-resistant rice. *Nat. Biotechnol* 30(5):390-392
- Liu B, Zhang AK, Zhou L, i in. (2015) New Era of Gene Editing: A Brief Discussion of Engineered Nucleases with Gene Editing Ability. *Gene Gene Edit* 1: 26-30
- Miller JC, Tan S, Qiao G i in. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol* 29:143-148.
- Okuzki A, Ogawa T, Koizuka C i in. (2018) CRISPR/Cas9-mediated genome editing of fatty acid desaturase 2 gene in Brassica napus. *Plant Physiol Biochem* 131:63-69
- Sanchez-Leon S, Gil-Humanes J, Ozuma CV i in. (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J* 16:902-910.
- Shukla VK, Doyon Y, Miller JC i in. (2009) Precise genome modification in the crop species Zea mays using zinc-finger nucleases. *Nature* 459:437:443.
- Townsend JA, Wright DA, Winfrey RJ i in. (2009) High frequency modification of plant genes using engineered zinc finger nucleases. *Nature* 459(7245):442-445.
- Xu H, Liu B, Pardinas J (2015) Biological and Technological Implication of Meganucleases. *Gene Gene Edit* 1:41-46.
- Zhou JR, Erdman JW. (1995) Phytic acid in health and disease. *Crit Rev Food Sci* 35(6): 495-508.

4. Rola wybranych mechanizmów molekularnych w doborze partnerów symbiotycznych w interakcjach roślin bobowatych z bakteriami brodawkowymi

The role of selected molecular mechanisms in legume - rhizobia interactions

Przemysław Olejnik

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Opiekun naukowy: dr hab. Katarzyna Nuc

Olejnik Przemysław: przemyslaw.olejnik@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: biologiczne wiązanie azotu, czynniki Nod, flawonoidy, brodawki korzeniowe, egzopolisacharydy

Streszczenie

Rośliny bobowate są zdolne do tworzenia układów symbiotycznych z bakteriami glebowymi, zwanymi rizobiami, redukującymi azot atmosferyczny do form łatwo przyswajalnych. Skutkiem nawiązania takiej interakcji jest wytworzenie przez makrosymbionta specyficznych struktur nazywanych brodawkami korzeniowymi. Powstanie wydajnej symbiozy wymaga udziału dwóch zgodnych partnerów symbiotycznych, a niedopasowanie partnerów symbiotycznych jest częstym zjawiskiem skutkującym osłabieniem zdolności bakterii do wiązania azotu i zasiedlania brodawek korzeniowych. Genetyczne i molekularne mechanizmy biorące udział w specyficznym doborze partnerów symbiozy są zróżnicowane i obejmują szerokie spektrum bakteryjnych i roślinnych genów oraz sygnałów molekularnych, które kontrolują różne etapy infekcji. Celem pracy jest omówienie roli wybranych mechanizmów molekularnych w tworzeniu specyficznego układu symbiotycznego pomiędzy roślinami bobowatymi a bakteriami brodawkowymi.

1. Wstęp

Azot (N) jest jednym z najpowszechniej występujących pierwiastków na ziemi. Jego największym rezerwuarem jest atmosfera, w której stężenie dwuatomowych cząsteczek azotu (N_2) jest niemal czterokrotnie wyższe niż tlenu i wynosi około 78%. Fakt ten wynika z niższej reaktywności azotu w porównaniu z O_2 oraz większej jego stabilności w postaci cząsteczek dwuatomowych. Ponadto N jest jednym z pierwiastków warunkujących istnienie życia na naszej planecie, ponieważ stanowi istotny komponent takich kluczowych biomolekuł jak kwasy nukleinowe, białka, witaminy czy chlorofil. Azot cząsteczkowy pomimo dużej jego zawartości w atmosferze nie jest łatwo przyswajany przez organizmy żywe ze względu na obecność potrójnego wiązania kowalencyjnego łączącego atomy w cząsteczce. Przyswajanie azotu przez rośliny, które stanowią podstawowe źródło tego pierwiastka dla zwierząt i człowieka, wymaga uprzedniej jego redukcji do łatwo przyswajalnych form amonowych i azotanowych.

Zdolność redukcji azotu atmosferycznego posiadają niektóre organizmy prokariotyczne takie jak bakterie i archeony a prowadzony przez nie proces określany mianem biologicznego wiązania azotu (BNF ang. biological nitrogen fixation) stanowi, wraz z procesem fotosyntezy, podstawę życia na naszej planecie. Ograniczona ilość związków azotowych w glebie jest jednym z głównych czynników ograniczających produktywność ekosystemów. Również z punktu widzenia gospodarki człowieka niedobór N w glebie jest zjawiskiem niekorzystnym, ponieważ ogranicza plonowanie roślin uprawnych.

Na drodze ewolucji niektóre rośliny przystosowały się do wzrostu i rozwoju na stanowiskach ubogich w łatwo przyswajalne związki azotu wykształcając cechy umożliwiające im wykorzystanie N_2 obecnego w atmosferze. Rośliny takie nie wymagają nawożenia azotowego zwiększając ponad to zasobność podłoża w ten pierwiastek i znacznie przyczyniając się do zwiększenia poziomu globalnego obiegu azotu w przyrodzie. Najlepiej poznaną grupą roślin o wspomnianych cechach są

rośliny bobowate (*Fabaceae*), które mogą wykorzystywać azot atmosferyczny dzięki symbiozie z bakteriami zdolnymi do wiązania i redukcji N_2 do form łatwo przyswajalnych. W wyniku tej interakcji roślina-gospodarz wytwarza specyficzne struktury w obrębie korzeni, wewnątrz których panują optymalne warunki dla enzymów katalizujących redukcję azotu atmosferycznego. (Dixon i in. 2004)

Oszacowano że rocznie w wyniku BNF 100-290 Tg ($1Tg=10^{12}$ g) azotu ulega redukcji do form przyswajalnych dla roślin. Z tego 50-70 Tg stanowi azot związany w uprawach rolniczych. W uprawach gatunków roślin niewchodzących w interakcje symbiotyczne z rizobiami niedobory azotu w glebie uzupełniane są przez stosowanie, posiadających pewne wady, nawozów sztucznych. Po pierwsze ich przemysłowa produkcja, ze względu na wysoką energochłonność procesu redukcji N_2 , pochłania około 50% paliw kopalnych zużywanych w rolnictwie. (Herridge i in. 2008) Po drugie, sam zabieg wysiewu nawozu na polu uprawnym wymaga zużycia oleju napędowego, zasilającego silniki ciągników rolniczych, co dodatkowo zwiększa tzw. ślad węglowy. Po trzecie, pomimo tego, że problem nadmiernego nawożenia pól uprawnych nie jest powszechny rośliny nie wykorzystują nawozów azotowych w pełni. Część z puli N wprowadzonego do podłoża w postaci nawozów sztucznych jest bezpowrotnie tracona przez procesy mikrobiologicznej nitrifikacji i denitrifikacji lub wymywana. Zwiększona podaż łatwo przyswajalnych związków azotu w zbiornikach wodnych może prowadzić do ich eutrofizacji powodując zmniejszenie bioróżnorodności organizmów je zamieszkujących. Ponadto obecność azotanów w wodach powierzchniowych może przyczyniać się do pogorszenia jakości powietrza poprzez emisję tlenków azotu. (Vence 2001)

Negatywne skutki stosowania sztucznych nawozów azotowych mogą zostać zniwelowane poprzez stosowanie w praktyce rolniczej BNF, który jest procesem przyjaznym dla środowiska i stojącym u podstaw zrównoważonego rolnictwa. Uprawy roślin bobowatych pochłaniają mniej energii pochodzącej z paliw kopalnych w porównaniu z uprawami, w których stosuje się nawozy sztuczne. Ponadto ich uprawa na tak zwany zielony nawóz pozwala na poprawę struktury gleby oraz jej zasobności w związki azotu. Poza niewątpliwymi korzyściami dla środowiska naturalnego uprawy roślin bobowatych stanowią nieocenione źródło białka w żywieniu człowieka (groch, bób, fasola, soja) i zwierząt (lucerna, koniczyna, komonica).

2. Opis zagadnienia

Nawiązanie efektywnej symbiozy jest możliwe gdy w ryzosferze roślin bobowatych obecne są biologicznie zgodne rizobia. Bateria te należą do heterotrofów charakteryzujących się dużą plastycznością metabolizmu umożliwiającą im przetrwanie w różnych warunkach środowiskowych. Podstawową cechą wyróżniającą je spośród pozostałych mikroorganizmów jest ich zdolność występowania w dwóch formach zależnych od miejsca bytowania. Pierwszą z nich są bakterie wolnożyjące w glebie natomiast drugą formą symbiotyczną w brodawkach korzeniowych. (Velazquez i in. 2010)

Pierwszym etapem tworzenia układu symbiotycznego pomiędzy rizobiami, określonymi jako mikrosymbionty, a roślinami bobowatymi – makrosymbiontami, jest adsorpcja bakterii na powierzchni włosników korzeniowych. W procesie tym biorą udział cząsteczki i struktury wytwarzane przez obu potencjalnych partnerów symbiozy takie jak rikadhezyna, fimbrie, lektyny i polisacharydy. (Skorupska i in. 2006) W kolejnym etapie dochodzi do wymiany sygnałów molekularnych, spośród których najważniejszymi są flawonoidy i czynniki nodulacji (Nod). Flawonoidy należą do grupy roślinnych metabolitów wtórnych wydzielanych w odpowiedzi na czynniki stresowe takie jak niedobór azotu. Związki te wydzielane są w największej ilości w pobliżu wierzchołka korzenia skąd na zasadzie dyfuzji rozprzestrzeniają się w ryzosferze, osiągając optymalne stężenie w strefie włosnikowej, gdzie następnie dochodzi do infekcji. Rośliny bobowate wydzielają do podłoża gatunkowo specyficzny koktajl metabolitów wtórnych. Dlatego też skład wydzielanych przez korzenie substancji jest uważany za czynnik wpływający na specyficzność doboru potencjalnego mikrosymbionta.

Flawonoidy wydzielane do podłoża indukują ekspresję genów nodulacji u komplementarnych dla danej rośliny rizobiów. Proces ten odbywa się za pośrednictwem białka NodD, którego powinowactwo do konserwatywnych motywów DNA zlokalizowanych w regionach

promotorowych genów *nod* zwiększa się w obecności niektórych flawonoidów. Czego skutkiem jest indukcja biosyntezy i sekrecji lipohitynooligosacharydów zwanych czynnikami Nod.

Pod adhezji bakterii na powierzchni włosników korzeniowych i udanej wymianie komplementarnych sygnałów molekularnych dochodzi do inicjacji procesu infekcji i formowania brodawki korzeniowej. Pierwszym symptomem możliwym do zaobserwowania jest zawijanie się końcówki włosnika w tak zwaną laskę pasterza. W ten sposób powstaje swoista kieszonka, w której zostaje uwięziona niewielka liczba bakterii. *Rizobia* namnażając się w jej wnętrzu i syntetyzując czynniki Nod powodują miejscową hydrolizę ścian komórkowej i wpuklenie błony inicjując powstanie nici infekcyjnej, za pośrednictwem której „podróżują” wzdłuż włosnika a następnie w poprzek kilku warstw kory korzenia aż do miejsca formowania „załączka” brodawki korzeniowej zwanego primodium. Po dotarciu do wspomnianej struktury bakterie przekształcają się w zdolne do wiązania N_2 bakteroidy otoczone błoną peribakteroidalną pochodzenia roślinnego. (Gage 2004)

Ze względu na anatomię i morfologię wyróżnia się zdeterminowane i niezdedeterminowane brodawki korzeniowe. Pierwsze z nich powstają w zewnętrznej korze korzenia i nie posiadają trwałego merystemu. Dzięki temu brodawki zdeterminowane mają kulisty kształt a bakteroidy widoczne w przekroju poprzecznym brodawki nie wykazują różnic rozwojowych. Z kolei brodawki niezdedeterminowane powstają w wewnętrznej korze korzenia i posiadają trwały merystem, co skutkuje wydłużonym, cylindrycznym kształtem brodawki. Obecność merystemu skutkuje również zauważalnym podziałem brodawki na strefy, w których bakteroidy wykazują różnice rozwojowe.

Wewnątrz funkcjonalnych brodawek korzeniowych zachodzi proces wiązania azotu atmosferycznego, którego głównym elementem jest syntetyzowany w bakteroidach kompleks enzymu nitrogenazy. Białko to jest wrażliwe na obecność tlenu dlatego jego aktywność wymaga zapewnienia warunków mikroaerobowych we wnętrzu brodawki korzeniowej. Warunki te są uzyskiwane w wyniku współdziałania kilku mechanizmów takich jak obecność bariery dyfuzyjnej kontrolującej przepuszczalność błony komórkowej dla tlenu, duża zawartość laghemoglobiny czy struktura warstwy korowej brodawki składającej się z ciasno ułożonych komórek. W wyniku aktywności kompleksu nitrogenazy powstaje amoniak, który jest dostarczany roślinie bezpośrednio poprzez kanały amonowe lub pośrednio w postaci aminokwasów. (Gage 2004)

3. Przegląd literatury

Formowanie układu symbiotycznego pomiędzy *rizobiami* a roślinami bobowatymi jest procesem obejmującym wiele następujących po sobie etapów. Jego cechą charakterystyczną jest wysoka specyficzność, dzięki której określone bakterie oddziałują ze ściśle zdefiniowaną grupą makrosymbiontów i na odwrót. Restrykcyjny dobór partnerów symbiozy wynika ze współdziałania wielu mechanizmów takich jak wspomniana komplementarność sygnałów przekazywanych za pomocą flawonoidów i czynników Nod, skład i budowa egzopolisacharydów czy zdolność mikrosymbionta do tłumienia odpowiedzi immunologicznej rośliny-gospodarza.

Białko NodD w obecności flawonoidów wykazuje wyższe powinowactwo do sekwencji DNA zlokalizowanej w regionie promotorowym genów kodujących czynniki Nod. Zdolność flawonoidów do oddziaływania na białko NodD stanowi jeden z podstawowych mechanizmów warunkujących specyficzność symbiozy. W całym spektrum flawonoidów uwalnianych do podłoża przez rośliny można wyróżnić tak zwane flawonoidy infekcyjne które są silnymi induktorami genów *nod*. Przykładem takich metabolitów wtórnych jest metoksychalkon, będący kluczowym związkiem dla formowania układów symbiotycznych u *Medicago* i innych blisko spokrewnionych gatunków. (Lim i Murray 2016)

Jednym z dowodów świadczącym o roli flawonoidów infekcyjnych w doborze partnerów symbiotycznych jest eksperyment, którym wykazano że zmiana źródła pochodzenia genu kodującego białko NodD u *Sinorhizobium meliloti* zmienia wrażliwość tej bakterii na spektrum flawonoidów zdolnych do indukcji genów nodulacji. W tym celu przygotowano szczep *S. meliloti* posiadający mutacje insercyjne w obrębie genów kodujących białko NodD. Następnie uzyskany szczep transformowano wprowadzając kasety ekspresyjne zawierające geny kodujące powyższe białko pochodzące z *S. meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* lub *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. W przypadku bakterii posiadających konstrukcję zawierającą gen z *S. meliloti* ekspresja

czynników Nod była indukowana wyłącznie przez metoksychalkon będący flawonoidem wydzielanym przez *Medicago truncatula* – jednego z partnerów symbiotycznych *S. meliloti*. Nie zaobserwowano jednak takiego efektu w czasie traktowania mutantu pozostałymi flawonoidami zastosowanymi w eksperymencie. W przypadku szczepów posiadających funkcjonalne geny *nodD* z *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i *R. leguminosarum* bv. *viciae* również zaobserwowano indukcję genów nodulacji w obecności metoksychalkonu. Ponadto jednak, w przeciwieństwie do *S. meliloti*, zaobserwowano podobną reakcję w obecności naringeniny, eridictjalu i 7-hydroksyflawonu. W przypadku pierwszego ze wspomnianych flawonoidów indukcja syntezy czynników Nod u obu szczepów posiadających kasety ekspresyjne zawierające geny *nodD* pochodzące z bakterii rodzaju *Rhizobium* była na podobnym poziomie. W trakcie traktowania eridictjolem zaobserwowano indukcję genów *nod* wyłącznie u mutantu posiadającego białko NodD z *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Natomiast 7-hydroksyflawon indukował ekspresję genów *nod* u obu szczepów *S. meliloti* posiadających białka NodD pochodzące z bakterii *Rhizobium*. W badaniu kontrolnym, w którym zastosowano daidzeinę, flawonoid nie indukujący syntezy czynników Nod u żadnego z powyższych gatunków bakterii, nie stwierdzono ekspresji genów *nod* u żadnego z przygotowanych szczepów. (Peck i in. 2006)

Odziaływanie flawonoidów z białkiem NodD prowadzi do syntezy czynników Nod, które zbudowane są z reszt N-acetylo-D-glukozoaminy połączonych wiązaniami β -1,4 i modyfikowane kwasem tłuszczowym na końcu nieredukującym. Lipohitynooligosacharydy różnią się strukturą w zależności od gatunku bakterii. Do głównych różnic można zaliczyć długość łańcucha głównego (od 2-6 reszt N-acetylo-D-glukozoaminy), rodzaj kwasu tłuszczowego na końcu nieredukującym jak i typ oraz liczbę podstawników (np. reszty acetylowe, fukozyłowe, sulfonowe) na końcu redukującym. Synteza czynników Nod jest wynikiem współdziałania dwóch grup genów kontrolowanych przez białko NodD. Pierwszą z nich jest operon *nodABC* zawierający tak zwane geny wspólne nodulacji, które występują u niemal wszystkich gatunków rizobiów. W wyniku ich ekspresji powstają enzymy odpowiedzialne za syntezę głównego łańcucha czynników Nod. Drugą grupę stanowią takie geny jak *nod*, *noe*, *nol*, w wyniku ekspresji których powstają enzymy odpowiedzialne za przyłączenie kwasów tłuszczowych i podstawników nadających czynnikom Nod specyficzność względem gospodarza. (Perret i in. 2000; Downie 2010)

Różnice w budowie czynników Nod są jednym z kluczowych determinantów w doborze partnerów symbiotycznych, ponieważ ich rozpoznanie przez receptor obecny w błonie komórkowej makrosymbionta jest warunkiem koniecznym w inicjacji procesu symbiozy. (Perret i in. 2000; d'Hueze i Holstens 2002) Jednym z dowodów potwierdzających rolę budowy i składu czynników Nod w doborze partnerów symbiotycznych jest badanie przeprowadzone na *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, w którym wyciszenie ekspresji genu *node* spowodowało zmianę w strukturze łańcucha kwasu tłuszczowego obecnego w syntetyzowanych czynnikach Nod. Zmiana ta negatywnie wpływa na rozpoznawanie tego gatunku rizobiów przez koniczynę ale wspomaga tworzenie układu symbiotycznego z grochem (*Pisum sativum*). (Diordiewicz i in. 1985) Ponadto wprowadzenie do *R. leguminosarum* kasety ekspresyjnej zawierającej geny *nodeEFGHPQ* z *S. meliloti* zmienia strukturę produkowanych czynników Nod w taki sposób, że powstały mutant może wchodzić w interakcje symbiotyczne z *Medicago sativa* będącym głównym partnerem symbiotycznym *S. meliloti*. (Fucher i in. 1989) Również badania z zastosowaniem mutantów makrosymbiontów zdają się potwierdzać znaczenie komplementarności czynników Nod i ich receptorów w błonie komórkowej rośliny-gospodarza. Przykładem może być eksperyment w którym geny kodujące receptory czynników Nod *Lotus japonicus* przeniesiono do *Medicago truncatula* uzyskując w ten sposób mutanty zdolne do symbiozy z mikrosymbiontem *L. japonicus* – *Mesorhizobium loti*. (Radutoiu i in. 2007)

Powstanie efektywnej symbiozy nie zależy wyłącznie od zgodności wcześniej opisanych flawonoidów i czynników Nod. Istotną rolę w interakcjach pomiędzy mikro- i makrosymbiontem odgrywa szerokie spektrum polisacharydów obecnych na powierzchni komórek rizobiów, których kompozycja jest gatunkowo specyficzna. (Pellock i in. 2000) Przykładem egzopolisacharydów (EPS) mających szczególne znaczenie w tworzeniu układów symbiotycznych z roślinami bobowatymi są sukcyinoglikany, które u *S. meliloti* są niezbędnym czynnikiem warunkującym wydłużanie nici infekcyjnej, a zwiększona ich synteza powoduje wzrost wydajności formowania brodawek u *M.*

truncatula. (Jones 2012) Niektóre mutacje w obrębie genów kodujących białka odpowiedzialne za syntezę EPS u *M. loti* powodują zahamowanie formowania brodawek korzeniowych u *L. japonicus* i *L. corniculatus*. Mutanty *M. loti* które nie posiadają na swojej powierzchni jednego z oktasacharydów były zdolne do tworzenia symbiozy z *L. japonicus* podczas gdy mutacje w obrębie genu *egoU* prowadząca do braku syntezy pentosacharydów skutkują brakiem brodawek korzeniowych. (Kelly i in. 2013) W 2015 roku zidentyfikowano u *L. japonicus* receptor błonowy (EPR3) dla bakteryjnych egzopolisacharydów, którego oddziaływanie z EPS jest uzależnione od ich struktury. Co więcej wykazano, że synteza EPR3 jest uwarunkowana obecnością specyficznych czynników Nod co wskazuje że infekcja rośliny-gospodarza przez rizobia może być kontrolowana przez dwa niezależne od siebie zespoły receptorów odbierających jednocześnie sygnały Nod i EPS. (Kavaharda i in. 2015; 2017)

Na drodze ewolucji rośliny wykształciły liczne mechanizmy mające na celu obronę przed patogenami. Jednakże, poza jego głównym przeznaczeniem, roślinny układ odpornościowy pełni również istotną rolę w doborze partnerów symbiotycznych. Wniknięcie rizobiów do wnętrza korzenia rośliny-gospodarza wymaga stłumienia jego reakcji obronnej w stopniu umożliwiającym rozwój brodawki. Istotną rolę w tym procesie odgrywają specyficzne gatunkowo egzopolisacharydy, których charakterystyczna struktura jest kluczowym czynnikiem tłumienia reakcji obronnej. (Pellock i in. 2000) Dowodem na to jest silna odpowiedź obronna *Medicago sativa* na specyficzny dla niej mikrosymbionta *S. meliloti* posiadającego mutację w sekwencji kodującej białko odpowiedzialne za syntezę jednego z kluczowych polisacharydów. Podobną reakcję zaobserwowano u soi, w której synteza związków odpowiedzialnych za odpowiedź na atak patogenów nastąpiła na skutek infekcji *Bradyrhizobium japonicum* posiadającym mutację w obrębie genu *exoB* biorącym udział w syntezie EPS. (Schmidt i in. 1992) Powyższe obserwacje wskazują na istotną rolę egzopolisacharydów w tłumieniu odpowiedzi systemu odpornościowego u roślin. Ponadto fakt występowania gatunkowo specyficznego zestawu egzopolisacharydów i aktywacja mechanizmów obronnych rośliny gospodarza w odpowiedzi na brak określonych EPS na powierzchni rizobiów dowodzi jego istotnej roli w doborze partnerów symbiotycznych.

4. Podsumowanie

W proces tworzenia układów symbiotycznych pomiędzy roślinami bobowatymi a rizobiami zaangażowanych jest wiele mechanizmów molekularnych decydujących również o specyficznym poborze partnerów. Nawiązanie efektywnej interakcji wymaga udziału flawonoidów, bakteryjnych czynników Nod, egzopolisacharydów i odpowiedniego stłumienia odpowiedzi układu obronnego rośliny-gospodarza. Komplementarność sygnałów molekularnych pomiędzy potencjalnymi partnerami symbiozy jest czynnikiem koniecznym powstania i poprawnego funkcjonowania brodawek korzeniowych a jakkolwiek zmiana w strukturze czynników Nod i egzopolisacharydów lub składzie mieszaniny flawonoidów skutkuje brakiem brodawek korzeniowych lub upośledzeniem procesu ich zasiedlania przez bakterie.

Pomimo wielu badań dotyczących mechanizmów warunkujących specyficzność doboru partnerów symbiozy nadal wiele kwestii nie zostało rozstrzygniętych. Jedną z nich jest sposób w jaki flawonoidy wpływają na białko NodD zwiększając jego powinowactwo do sekwencji DNA w regionach promotorowych genów *nod*. Do tej pory nie znaleziono dowodów na fizyczne oddziaływanie wspomnianych metabolitów wtórnych z białkiem NodD. Nie zidentyfikowano również żadnego receptora dla tych związków w obrębie komórek rizobiów.

5. Literatura

- D'Haese W, Holstrs M (2002) Nod factor structures, responses and perception during initiation of nodule development: *Glycobiology* 12:79R-105R.
- Dixon R, Kahn D (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation: *Nat. Rev. Microbiol* 2:621-631.

- Djordjevic MA, Schofield PR, Rolfe BG (1985) Tn-5 mutagenesis of *Rhizobium trifolii* host specific nodulation genes results in mutants with altered host range ability: *Mol Gen Genet* 200: 463–471.
- Downie JA (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots: *FEMS Microbiol. Rev.* 34:150–170
- Faucher C, Camut S, De'narie' J i in. (1989) The nodH and nodQ host range genes of *Rhizobium meliloti* behave as avirulence genes in *R. leguminosarum* bv. *viciae* and determine changes in the production of plant-specific extracellular signals: *Mol Plant Microbe Interact* 2: 291–300.
- Gage DJ (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:280–300.
- Herridge DF, Peoples MB, Boddey RM (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems: *Plant soil.* 311:1-18.
- Jones KM (2012) Increased production of exopolysaccharide succinoglycan enhances *Sinorhizobium meliloti* 1021 symbiosis with the host plant *Medicago truncatula*: *Journal of Bacteriology* 194:4322-4331.
- Kawaharada Y, Kelly S, Nielsen MW i in. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection: *Nature* 523:308–312.
- Kawaharada Y, Nielsen MW, Kelly S, i in. (2017). Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia: *Nat. Commun.* 8:14534.
- Kelly SJ, Muszyński A, Kawaharada Y, i in. (2013). Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium*–*Lotus* symbiosis: *Mol. Plant Microbe Interact.* 26:319–329.
- Lin CW, Murray JF (2016) The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: un update: *Plants* 5:33.
- Peck MC, Fischer RF, Long SR (2006) Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*: *Journal of Bacteriology*, 188(15): 5417-5427.
- Pellock BJ, Cheng HP, Walker GC (2000) Alfa alfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides: *Journal of Bacteriology* 182:4310-4318.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol: Mol. Biol. Rev.* 64:180–201.
- Radutoiu, S, Madsen LH, Madsen EB i in. (2007) LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range: *EMBO J* 26:3923–3935.
- Schmidt PE, Parniske M, Werner D (1992) Production of phytoalexins glyceolin I by soybean roots in response to symbiotic and pathogenic infection: *Bot. Acta* 105:18-25.
- Skorupska A, Janczarek M, Marczak M i in. (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions: *Microb. Cell Fact.* 5:7
- Velázquez E, García-Fraile P, Ramírez-Bahena MH i in., *Bacteria involved in nitrogen--fixing legume symbiosis: current taxonomic perspective* (w) *Microbes for Legume Improvement*, red. Khan MS, Musarrat J, Zaidi A, Springer-Verlag, Vienna, 2010, s. 1–25.
- Vence CP (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources: Plant Physiology* 127: 390-397.

5. Kwas askorbinowy i kwas salicylowy jako środki łagodzące negatywne skutki deficytu wody u roślin

Ascorbic acid and salicylic acid as mitigating agents of the negative effects of water deficit in plants

Rokosa Marta

Katedra Bioinżynierii, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: dr hab. inż. Mikiciuk Małgorzata, prof. ZUT
Rokosa Marta: marta.rokosa@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: susza, stres abiotyczny, antyoksydanty, przeciwutleniacze

Streszczenie

W aspekcie zmieniającego się klimatu susza jest jednym z największych zagrożeń dzisiejszego świata. Niedobór wody jest najważniejszym czynnikiem ograniczającym plonowanie, wzrost i rozwój roślin. Rośliny reagują na stres związany z deficytem wody wieloma zmianami fizjologiczno-biochemicznymi takimi jak zmniejszenie zawartości barwników fotosyntetycznych, uszkodzenie aparatu fotosyntetycznego, upośledzenie procesów mitotycznych, zaburzenie homeostazy komórkowej, wymiany gazowej oraz pierwotnego i wtórnego metabolizmu, regulacji turgoru. W konsekwencji tych zmian może nastąpić śmierć komórki. Powszechnie stosuje się wiele różnych praktyk agronomicznych, tradycyjną uprawę i nowoczesne narzędzia biotechnologiczne, aby zapobiec stratom plonów w wyniku stresu związanego z suszą. Te metody są jednak czasochłonne i kosztowne. W celu złagodzenia negatywnych skutków stresogennego środowiska, w tym suszy, coraz częściej stosuje się egzogenne organiczne i nieorganiczne substancje sprzyjające wzrostowi i rozwojowi roślin, takie jak np. kwas askorbinowy oraz kwas salicylowy. Kwas te wpływają na metabolizm roślin indukując wiele reakcji i zmian. Zmiany te mają charakter adaptacyjny, zwiększając tolerancję roślin na negatywne skutki deficytu wody.

1. Wstęp

Niedobór wody jest głównym ograniczeniem w produkcji upraw. Susza wywołuje u roślin wiele niekorzystnych zmian, które przekładają się na znaczne ograniczenie plonowania. Niedobór wody może powodować zmiany w zawartości chlorofilu, uszkodzenie aparatu fotosyntetycznego, upośledzenie procesów mitotycznych, zaburzenie równowagi żywieniowej, wymiany gazowej oraz pierwotnego i wtórnego metabolizmu, regulacji turgoru a w konsekwencji na śmierć komórki (Aziz i in. 2018). Podczas stresu suszy dochodzi do wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) takich jak: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), tlen singletowy (1O_2), nadtlenuk wodoru (H_2O_2) i rodnik hydroksylowy ($HO^{\cdot}$), które są przyczyną powstawania uszkodzeń oksydacyjnych w tkankach roślinnych. ROS mogą utleniać makrocząsteczki, takie jak lipidy, białka i kwasy nukleinowe, co przyczynia się bezpośrednio do pojawiania się zaburzeń wzrostu i rozwoju roślin (Singh i Bhardwaj 2016).

Rośliny wykształciły szereg molekularnych i fizjochemiczno-biochemicznych mechanizmów łagodzących niekorzystne skutki niedoboru wody, takie jak: rozwój głębokiego systemu korzeniowego, zwiększenie efektywności wykorzystania wody, ograniczanie utraty wody przez transpirację poprzez zamknięcie aparatów szparkowych, synteza osmolitów i regulacja osmoregulacji (Aziz i in. 2018). Niezwykle istotne są mechanizmy antyoksydacyjne, na które składają się działania nieenzymatycznych przeciwutleniaczy, takich jak enzymy antyoksydacyjne (np. disoduteaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza askorbinowa (APX), peroksydaza glutationowej (GPX)), barwniki (karotenoidy, flawonoidy, karotenoidy), glutation czy askorbinian. Wiele badań wykazało, że adaptacja i zwiększona tolerancja na stres związany z suszą u roślin jest dobrze skorelowana z aktywnością enzymów antyoksydacyjnych i wzrostem stężenia nieenzymatycznych utleniaczy (Khan i in. 2011).

Powszechnie stosuje się wiele różnych praktyk agronomicznych, tradycyjną uprawę i nowoczesne narzędzia biotechnologiczne, aby zapobiec stratom plonów w wyniku stresu związanego z suszą. Również wiele narzędzi biotechnologicznych jest stosowanych w celu zmniejszenia wrażliwości upraw na deficyt wody. Te metody są jednak czasochłonne i kosztowne. W celu złagodzenia negatywnych skutków stresogennego środowiska, w tym suszy, coraz częściej stosuje się egzogenne organiczne i nieorganiczne substancje sprzyjające wzrostowi i rozwojowi roślin. W literaturze znajduje się wiele doniesień, wskazujących na potencjał nieenzymatycznych przeciwutleniaczy takich jak kwas askorbinowy czy kwas salicylowy w celu zaadaptowania roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych i uzyskanie lepszego plonu.

2. Kwas askorbinowy

Jednym z nieenzymatycznych przeciwutleniaczy wykorzystywanym w produkcji roślinnej jest kwas askorbinowy. Uważa się, że kwas askorbinowy chroni rośliny przed uszkodzeniami oksydacyjnymi przez zmniejszenie stężenia wolnych rodników tlenowych. Jest on syntetyzowany w mitochondriach i transportowany do innych organelli komórkowych. Jest także najszersze badany nieenzymatycznym przeciwutleniaczem (Loutfy i in. 2020).

Kwas askorbinowy jest ważnym metabolitem roślinnym i bierze udział w przewodzeniu sygnału między komórkami w wielu procesach fizjologicznych, np. w mitozie. Zdolność askorbinianu do utraty lub oddawania elektronów do produkcji kwasu monodehydroaskorbinowego (MDHA) jest podstawą jego biologicznie użytecznej zdolności antyoksydacyjnej (Athar i in. 2008). Odgrywa również ważną rolę w obronie przed niedoborem wody dzięki enzymatycznej detoksykacji nadtlenu wodoru (Singh i Bhardwaj 2016). Działa jako kofaktor takich enzymów jak: dioksygenaza tyminowa (biorąca udział w metabolizmie pirymidynowym), syntaza deacetoksycefalosporyny C (biorąca udział w metabolizmie antybiotyków), 1-aminocyklopropano-1-karboksylan (biorący udział w syntezie etylenu), deepoksydaza wiolaksantyny (biorąca udział w syntezie zeaksantyny), 3-β-dioksygenaza gibereliny (biorąca udział w syntezie giberelin) oraz glukohydrolaza tioglukozydowa (biorąca udział w katabolizmie glukozynolanów) (Khan i in. 2011).

Biosynteza askorbinianu w roślinach zachodzi na szlaku pochodzącym z heksoz, gdzie jego prekursorem jest L-galakton. Ostatnie etapy syntezy askorbinianu zachodzą w mitochondrialnej błonie wewnętrznej. Z tego też względu cząsteczki askorbinianu muszą być transportowane z mitochondriów do chloroplastów, aby mógł on spełniać swoją funkcję w fotosyntezie. Komórki roślinne mogą jednak akumulować kwas askorbinowy w wysokich stężeniach wahającym się od 2,5 do 25 mM. W chloroplastach stężenie to może wynosić nawet 30 mM. Wykazano, że rośliny narażone na warunki stresu abiotycznego, takie jak susza, są w stanie silnie indukować biosyntezę kwasu askorbinowego (Castro i in. 2018).

Rośliny charakteryzujące się niską produkcją endogennego kwasu askorbinowego są szczególnie wrażliwe na niekorzystne czynniki środowiskowe, zwłaszcza na suszę. U większości gatunków roślin poziomy kwasu askorbinowego nie są wystarczające, aby skutecznie łagodzić niekorzystne skutki stresu. Dlatego w takich okolicznościach egzogenne zastosowanie kwasu askorbinowego jest wskazane. Zwiększenie poziomu askorbinianu (na poziomie komórkowym) jest jedną ze stosowanych metod osiągnięcia tolerancji na stres.

Endogenne stężenie kwasu askorbinowego może być zwiększone przez jego egzogenne zastosowanie doglebowe (dopodłożowe), dolistnie lub jako środek stosowany na nasiona (Athar i in. 2008). Warto zaznaczyć, że askorbinian jest łatwo absorbowany po podaniu egzogennym i łatwo transportowany wewnątrz rośliny w związku z czym egzogenne stosowanie kwasu askorbinowego poprawia tolerancję na suszę roślin uprawnych na wiele sposobów (Khan i in. 2011).

Preparat zawierający kwas askorbinowy stosowany dolistnie okazał się skuteczny w zwiększaniu wzrostu i rozwoju roślin poprzez podtrzymywanie różnych procesów, takich jak sygnalizacja hormonalna, transport jonów, wzrost komórek. Był również ważnym czynnikiem w antyoksydacyjnym systemie obrony w warunkach stresowych (Aziz i in. 2018). Kwas askorbinowy wykazuje również ma właściwości stymulujące wzrost, ze względu na fakt, iż przyczynia się on do zwiększenia szybkości podziałów komórkowych w merystemach wierzchołkowych korzeni, powodując przyspieszenie wzrostu (Loutfy i in. 2020).

Enzymatyczne mechanizmy łagodzenia negatywnych skutków suszy poprzez reakcje antyoksydacyjne również w dużej mierze zależą od stężenia kwasu askorbinowego. Uszkodzenie oksydacyjne różnych składników komórkowych przez H_2O_2 może być zminimalizowane przez aktywność CAT i peroksydazy lub przez cykl reakcji askorbinian-glutation z udziałem dehydrokwasaskorbinianu i disiarczku glutationu (Khan i in. 2011).

Ponieważ kwas askorbinowy działa również jako ważny element biosyntezy wielu hormonów roślinnych, w tym etylenu, kwasu jasmonowego, kwasu abscysynowego i kwasu giberelinowego należy założyć, że endogenne poziomy AA wpłynie nie tylko na biosyntezę, ale także na poziomy i sygnalizację tych hormonów w warunkach stresowych. Co więcej, synteza kwasu askorbinowego jest również regulowana przez jasmoniany (Khan i in. 2011).

Ogólnie rzecz biorąc, egzogenne stosowanie kwasu askorbinowego zwiększa jego endogenne poziomy oraz stężenie CAT, które mają ochronny wpływ na wzrost roślin i intensywność fotosyntezy. Aplikacja egzogenne kwasu askorbinowego zwiększa również przewodnictwo szparkowe, sprzyjając w ten sposób wyższej asymilacji CO_2 , choć zauważa się specyficzność na poziomie odmian. Takie zabiegi mogą zwiększać akumulację K^+ w liściach i Na^+ w korzeniach (Athar i in. 2008).

Podczas działania stresów abiotycznych degradacji mogą ulegać struktury chloroplastu i aparatu fotosyntetycznego, chlorofil może ulegać fotooksydacji a także zahamowana może być synteza chlorofilu a zwiększona aktywność chlorofiny. To natomiast przekłada się bezpośrednio na zmniejszenie zawartości barwników asymilacyjnych. Wykazano jednak, że zastosowanie egzogenne kwasu askorbinowego (podobnie jak kwasu salicylowego) może wpływać na zwiększenie stężenia tych barwników (Loutfy i in. 2020).

Na uwagę zasługuje również fotoprotekcyjne działanie kwasu askorbinowego w warunkach deficytu wody. Podczas procesu fotoinhibicji zachodzącego w warunkach bardzo intensywnego oświetlenia bądź działania silnych stresów, jak np. drastyczny deficyt wody, aparat fotosyntetyczny może zostać upośledzony, przez co wydajność systemów fotosyntetycznych I i II (PSI i PSII) znacznie obniża wydajność. Prowadzi to do uruchomienia pozasparkowych mechanizmów ochrony, takich jak wygaszanie niefotochemiczne. Jest to mechanizm pozwalający na przekształcenie nadmiaru energii docierających do aparatu fotosyntetycznego na energię ciepłą podczas fazy świetlnej. Uważa się, że cykl ksantofilowy (konwersja wiolaksantyny do zeaksantyny przez błonę tylakoidową) bierze udział w niefotochemicznym wygaszaniu nadmiaru energii światła w PSII. Kwas askorbinowy natomiast jest kofaktorem enzymów biorących udział w tym cyklu (np. deepoksydazy wiolaksantyny). Wykazano, że mutanty *Arabidopsis* wykazujące niedobór endogenne kwasu askorbinowego charakteryzowały się niższym poziomem niefotochemicznego wygaszania z powodu ograniczenia intensywności zachodzenia reakcji deepoksydacji (Conklin 2001).

Warto także wspomnieć, że podczas stresu związanego z niedoborem wody egzogenne stosowanie kwasu askorbinowego („podobnie jak kwasu salicylowego) powodowało zwiększenie produkcji rozpuszczalnych cukrów w sadzonkach kukurydzy. Ta akumulacja jest wynikiem gromadzenia cukrów są w celu dostosowania osmotycznego w odpowiedzi na stres deficytu wody, co stanowi element ochrony makrocząsteczek i struktur DNA (Loutfy i in. 2020).

Oprócz niewątpliwie korzystnego wpływu egzogenne kwasu askorbinowego na łagodzenie negatywnych skutków suszy u roślin istnieją doniesienia, mówiącym o toksycznych efektach stosowania jego podwyższonego stężenia. Stwierdzono, że askorbinian może redukować jony metali ciężkich, takie jak Fe^{3+} do Fe^{2+} , który może indukować akumulację rodników hydroksylowych w reakcji Fentona, wywołując następnie stres oksydacyjny. Taką toksyczność obserwowano podczas egzogenne aplikacji kwasu askorbinowego w stężeniu 8 mM. Należy więc mieć na uwadze, że wysokie stężenia kwasu askorbinowego, w pewnych okolicznościach fizjologicznych, szczególnie wysokich stężeniach jonów metali, mogą być ważnym problemem fizjologicznym (Castro i in. 2018).

Warto także podkreślić, że stosowanie egzogenne kwasu askorbinowego w optymalnych warunkach wzrostu roślin nie jest korzystnym zabiegiem. Zabiegi takie mogą wywoływać stres oksydacyjny u roślin ze względu na nagromadzenie kwasu askorbinowego. Zwiększone stężenie askorbinianu w komórkach roślinnych powoduje bowiem zmniejszenie aktywności enzymów

przeciwutleniających przez hamowanie transkrypcji i zaburzenie równowagi między substancjami przeciwutleniającymi i cząsteczkami utleniającymi. Nadmiar kwasu askorbinowego może również wpływać na transkrypcję genów akwaporyny, powodując nadmierną utratę wody. To natomiast może bezpośrednio przekładać się na obniżenie innych parametrów fizjologicznych i biochemicznych warunkujących prawidłowy wzrost i rozwój roślin (Qian i in. 2014).

3. Kwas salicylowy

Historia kwasu salicylowego sięga 1878 roku, kiedy był najpopularniejszym środkiem leczniczym syntetyzowanym w Niemczech. Jest ważnym hormonem roślinnym naturalnie występującym w roślinach. Odgrywa istotną rolę we wzroście i rozwoju roślin (Canales i in. 2019). Bierze udział w mechanizmie uodparniania roślin na stresi biotyczne i abiotyczne. W warunkach stresowych kwas salicylowy poprzez mechanizmy sygnalizowania reguluje kluczowe procesy metaboliczne i fizjologiczne (Khalil i in. 2018). Ponadto bierze udział w kiełkowaniu nasion, plonowaniu owoców, glikolizie, kwitnieniu, wychwytywaniu i transporcie jonów, fotosyntezie, transpiracji a także przewodności szparkowej. U roślin takich jak ryż, jęczmień i soja, poziom kwasu salicylowego wynosi około $1 \mu\text{g g}^{-1}$ świeżej masy (Hayat i in. 2010).

Rośliny traktowane kwasem salicylowym wykazują zwiększony potencjał wody w liściach, zwiększoną aktywność enzymów przeciwutleniających oraz obniżony poziom peroksydacji lipidów. Egzogenne stosowanie kwasu salicylowego może odwrócić negatywny wpływ niedoborów wody na wzrost i rozwój roślin (Khalil i in. 2018). Kwas salicylowy reguluje odpowiedź roślin na stres związany z suszą poprzez oddziaływanie na proces fotosyntezy. W odpowiedzi na stres abiotyczny i akumulacji ROS kwas salicylowy hamuje aktywność CAT, co prowadzi do powstawania H_2O_2 . Nadtlenek wodoru jest cząsteczką sygnałową, która aktywuje przeciwutleniające mechanizmy redukcji szkód spowodowanych przez ROS (Cha i in. 2020).

Rola kwasu salicylowego w regulacji tolerancji deficytu wody u roślin oparta jest na wzroście endogennego stężenia kwasu i indukcji genów PR1 i PR2 w czasie stresu suszy. Mutanty *Arabidopsis* *adr1*, *myb96-1d*, *siz1*, *acd6* i *cpr5* akumulujące endogenne kwas salicylowy wykazywały istotną tolerancję na suszę opartą o zamknięcie aparatów szparkowych przez indukowaną przez kwas salicylowy ekspresję genów PR (PR1, PR2 i PR5). Ponadto przebadane zostały białka zaangażowane w sieć interakcji cząsteczek reagujących na kwas salicylowy w kontekście zwiększenia tolerancji na suszę. Wykazano, że kwas salicylowy był związany z białkami biorącymi udział w transdukcji sygnału, obroną przed stresem, fotosyntezą, metabolizmem węglowodanów, metabolizmem białek i produkcją energii (Sharma i in. 2017).

Zaangażowanie kwasu salicylowego w regulowanie tolerancji na suszę uwidacznia się również poprzez aktywację genów kodujących przeciwutleniacze, białka opiekuńcze i białka szoku cieplnego. Geny te biorą również udział w syntezie metabolitów wtórnych, takich jak dehydrogenaza alkoholu cynamyloвого, cytochrom P450 i dehydrogenaza alkoholu sinapyloвого (Sedaghat i in. 2017).

Kwas salicylowy łagodzi negatywne skutki stresu suszy także poprzez oddziaływanie na cykl kwasu askorbinowego-glutationu (ASA-GSH). Geny kodujące białko opiekuńcze, HSP, przeciwutleniacze i biosyntezę metabolitów wtórnych, takie jak SAD, CAD i Cytochrom P450 reagowały na podanie egzogenne kwasu salicylowego u roślin w warunkach deficytu wody (Sharma i in. 2017).

Wyższą tolerancję na stres związany z suszą zaobserwowano także w przypadku roślin wyhodowanych z ziaren uprzednio moczonych w wodnym roztworze kwasu acetylo-salicylowego, co wpłynęło również na akumulację suchej masy (Hayat i in. 2010).

Kwas salicylowy potencjalnie generuje szeroki zakres odpowiedzi metabolicznych u roślin, a także wpływa na parametry fotosyntetyczne i stosunki wodne rośliny. Może on powodować zwiększenie zawartości barwników asymilacyjnych w tkance roślinnej po aplikacji dolistnej w stężeniach ok. 10^{-5}M . Wyższe stężenia powodować mogą jednak zmniejszenie zawartości barwników fotosyntetycznych. Podanie egzogenne kwasu salicylowego może stymulować syntezę karotenoidów i ksantofili przy jednoczesnym zmniejszeniu biosyntezy chlorofilu. Istnieją także doniesienia o zwiększeniu wskaźnika intensywności fotosyntezy, wewnętrznego stężeniu CO_2 ,

efektywności zużycia wody, przewodności szparkowej, intensywności transpiracji po egzogennym zastosowaniu kwasu salicylowego (Hayat i in. 2010).

Podczas występowania stresów abiotycznych zauważa się zmiany w zawartości różnych barwników fotosyntetycznych. Zmniejszenie zawartości karotenoidów pod wpływem stresu związanego z suszą może być związane z degradacją β -karotenu. Kwas salicylowy odgrywa istotną rolę w poprawie biosyntezy chlorofilu i karotenoidów, szybkości fotosyntezy, aktywności karboksylazy Rubisco (Loutfy i in. 2020).

Kwas salicylowy może również wpływać na proces fotosyntezy u roślin utrzymywanych w warunkach stresu suszy poprzez hamowanie syntezy etylenu. Traktowanie roślin kwasem salicylowym może skutkować opóźnieniem syntezy etylenu, zakłócaniem depolaryzacji błon, stymulowaniem mechanizmów fotosyntezy, zwiększaniem zawartości chlorofilu a także hamowaniem naprawy uszkodzeń. Zahamowanie syntezy etylenu pod wpływem stresu suszy przez kwas salicylowy może spowodować zintensyfikowanie odpowiedzi roślin na etylen oraz zmiany w procesie metabolizmu proliny (Nazar i in. 2015).

Uważa się, że kwas salicylowy oddziałuje w złożony sposób z innymi związkami hormonalnymi. Oprócz związku z etylenem udokumentowany jest także jego zależność z tlenkiem azotu (NO). Zarówno etylen, jak i NO są bezpośrednio związane ze stężeniem poliaminy. Obserwuje się również złożoną wzajemną zależność między etylenem, NO i poliaminami podczas reakcji tolerancji na suszę. Najbardziej popularne poliaminy, takie jak diamina, putrescyna, triamina, spermidyna i spermina działają jako cząsteczki regulacyjne w wielu podstawowych procesach regulacyjnych, także w reakcjach na stres. Stąd też możliwy jest związek z oddziaływaniem egzogenne kwasu salicylowego z procesami warunkującymi tolerancję roślin na stres związany z suszą (Canales i in. 2019).

Wpływ egzogenne kwasu salicylowego zależy nie tylko od gatunku rośliny, ale także od stadium rozwojowego rośliny, sposobu aplikacji oraz stosowanego stężenia i jego endogenne poziomu w danej roślinie (Dianat i in. 2016). Poprawę parametrów wymiany gazowej po zastosowaniu kwasu salicylowego w formie egzogennej zaobserwowano między innymi u kapusty, kukurydzy i soi, podczas gdy uległy one obniżeniu u fasoli i komeliny. Sugeruje się, że obniżenie wspomnianych parametrów mogło być związane, z zamknięciem aparatów szparkowych wskutek stresu oksydacyjnego wywołanego zbyt wysokim stężeniem kwasu salicylowego dla danego gatunku (Hayat i in. 2010).

Podobnie jak w przypadku kwasu askorbinowego, również egzogenne kwas salicylowy może mieć negatywny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Działanie kwasu salicylowego w tym aspekcie polega na zwiększeniu tempa produkcji reaktywnych form tlenu w tkankach fotosyntetyzujących (Khalil i in. 2018). Wysokie stężenia egzogenne kwasu salicylowego może również hamować aktywność anhidrazy węglanowej i karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO) oraz stymulować aktywność karboksylazy fosfoenolopirogronianowej, co powoduje spadek intensywności fotosyntezy (Hayat i in. 2010).

W warunkach stresu suszy mechanizm obronny opierający się na działaniu kwasu salicylowego, podobnie jak w przypadku kwasu askorbinowego, zależy od jego stężenia. Już umiarkowane stężenia kwasu salicylowego mogą pozytywnie oddziaływać na roślinę poddaną stresowi i promować odporność na stres. W wysokim stężeniu jednak może powodować śmierć komórek, a nawet zwiększać wrażliwość na stres (Khalil i in. 2018).

4. Podsumowanie

Stres abiotyczny, taki jak susza, wpływa na wydajność rośliny pod wieloma względami. Może to prowadzić do zintensyfikowania produkcji enzymatycznych i nieenzymatycznych utleniaczy, których akumulacja jest niezwykle szkodliwa dla rośliny. Kwas salicylowy i kwas askorbinowy wpływają na metabolizm roślin indukując wiele reakcji i zmian. Zmiany te mają charakter adaptacyjny, zwiększając tolerancję roślin na negatywne czynniki środowiskowe.

Kwas askorbinowy jest istotną cząsteczką sygnałową modyfikującą odpowiedzi roślin na stres związany z suszą, bezpośrednio przyczyniając się do regulacji procesów fizjologicznych. Kwas askorbinowy jest przeciwutleniaczem i w połączeniu z innymi składnikami układu

przeciwutleniającego, chroni rośliny przed uszkodzeniami oksydacyjnymi wynikającymi z zaburzeń metabolizmu tlenowego i fotosyntezy oraz chroni komórki przed szkodliwym działaniem wolnych rodników poprzez zapobieganie ich produkcji.

Kwas salicylowy natomiast poprzez zwiększenie zawartości enzymów przeciwutleniających, cukru, proliny, białka i olejów eterycznych może pomóc w zachowaniu niezaburzonej struktury błony i białek, co stanowi ochronę przed wpływem ROS. Łagodzi on również obniżenie poziomu wielu cech fizjologicznych i pozwala syntetyzować metabolity ochronne, które poprawiają tolerancję roślin na stres związany z suszą.

Chociaż zarówno kwas askorbinowy jak i kwas salicylowy nie stanowią złotego środka na stresy abiotyczne, to skutecznie poprawiają parametry fizjologiczne roślin i zmniejszają negatywne skutki stresu związanego z suszą. Zastosowanie odpowiednich stężeń kwasu salicylowego i kwasu askorbinowego stanowi skuteczne narzędzie do poprawy homeostazy komórkowej i wzrostu roślin poddanych nawracającym okresom suszy. Jednak szczegółowe mechanizmy molekularne roli obu kwasów w odpowiedziach na stres związany z suszą u roślin pozostają w dużej mierze nieznane i potrzebne są dalsze badania w tym kierunku.

5. Literatura

- Athar HR, Khan A, Ashraf M (2008) Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 63: 224–231.
- Aziz A, Akram NA, Ashraf M (2018) Influence of natural and synthetic vitamin C (ascorbic acid) on primary and T secondary metabolites and associated metabolism in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants under water deficit regimes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 123: 192–203.
- Canales FJ, Montilla-Basón G, Rispail N, Prats E (2019) Salicylic acid regulates polyamine biosynthesis during drought responses in oat. *Plant Signaling & Behavior* 14(10): e1651183
- Castro JLS, Lima-Melo Y, Carvalho FEL, Feitosa AGS, Lima Neto MC, Caverzan A, Margid-Pinheiro M, Silveira JAG (2018) Ascorbic acid toxicity is related to oxidative stress and enhanced by high light and knockdown of chloroplast ascorbate peroxidases in rice plants. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 30: 41–55.
- Cha YR, Kim S, Lee JH, Shim I-E (2020) Enhanced Drought Tolerance in Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L.) Seedlings Upon Pretreatment with Exogenous Salicylic Acid. *Horticultural Science and Technology*. 9-20.
- Conklin PL (2001) Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant, Cell and Environment* 24: 383–394
- Dianat M, Saharkhiz MJ, Tavassolian I (2016) Salicylic acid mitigates drought stress in *Lippia citriodora* L.: Effects on biochemical traits and essential oil yield. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8: 286–293.
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M, Ahmad A (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14–25.
- Khalil N, Fekry M, Bishr M, El-Zalabani S, Salama O (2018) Foliar spraying of salicylic acid induced accumulation of phenolics, increased radical scavenging activity and modified the composition of the essential oil of water stressed *Thymus vulgaris* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 123: 65–74.
- Khan TA, Mazid M, Mohammad F (2011) A review of ascorbic acid potentialities against oxidative stress induced in plants. *J Agrobiol* 28(2): 97–111.
- Loutfy N, Azooz MM, Abou Alhamd MF (2020) Exogenously-applied Salicylic Acid and Ascorbic Acid Modulate some Physiological Traits and Antioxidative Defense System in *Zea mays* L. Seedlings under Drought Stress. *Egyptian Journal of Botany* 60(1): 313-324.
- Nazar R, Umar S, Khan NA, Sreer O (2015) Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress. *South African Journal of Botany* 98: 84–94.

- Qian HF, Peng XF, Han X, Ren J, Zhan KY, Zhu M (2014) The Stress Factor, Exogenous Ascorbic Acid, Affects Plant Growth and the Antioxidant System in *Arabidopsis thaliana*. *Russian Journal of Plant Physiology* 61(4): 467–475.
- Sedaghat M, Tahmasebi-Servestani Z, Emam Y, Mokhtassi-Bidgoll A (2017) Physiological and antioxidant responses of winter wheat cultivars to strigolactone and salicylic acid in drought. *Plant Physiology and Biochemistry* 119: 59-69.
- Sharma M, Gupta SK, Majumder B, Mauryna VK, Deeba F, Alam A, Pandey V (2017) Salicylic acid mediated growth, physiological and proteomic responses in two wheat varieties under drought stress. *Journal of Proteomics* 163: 28–51.
- Singh N, Bhardwaj RD (2016) Ascorbic acid alleviates water deficit induced growth inhibition in wheat seedlings by modulating levels of endogenous antioxidants. *Biologia* 71(4): 402—413.

6. Fluorescencja chlorofilu w badaniach nad wpływem deficytu wody na wzrost i rozwój roślin

Chlorophyll fluorescence in research of the impact of water deficit on plant growth and development

Rokosa Marta

Katedra Bioinżynierii, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: dr hab. inż. Mikiciuk Małgorzata, prof. ZUT

Rokosa Marta: marta.rokosa@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: test JIP, susza, stres abiotyczny, wydajność PSII

Streszczenie

Susza jest jednym z bardziej niebezpiecznych dla podaży żywności i zdrowia ludzi aspektem zmian klimatycznych. W dzisiejszych czasach dotyka ona cały świat. Deficyt wody jest czynnikiem bezpośrednio wpływającym na niemalże wszystkie procesy fizjologiczno-biochemiczne roślin przekładające się na zahamowanie ich wzrostu, rozwoju i produktywności. Z tego względu niezwykle istotnym jest badanie reakcji roślin na stres związany z suszą celem odnajdywania tych gatunków i odmian charakteryzujących się zwiększoną tolerancją na te niekorzystne warunki. Podczas działania wielu stresów abiotycznych, w tym suszy, zostaje zaburzony stosunek produkcji siły asymilacyjnej do popytu na nią w reakcjach cyklu Calvina-Bensona. Aby zminimalizować destrukcyjny wpływ nadmiaru pochłoniętej energii na aparat fotosyntetyczny musi on zostać rozproszony np. na drodze fluorescencji chlorofilu. Pomiar fluorescencji chlorofilu jest zatem jedną z metod pomiaru reakcji roślin na suszę poprzez ocenę stanu aparatu fotosyntetycznego w warunkach *in vivo*. Jest to metoda nieinwazyjna, czuła, szybka i łatwa w zastosowaniu.

1. Wstęp

W ostatnim czasie susza stała się jednym z najważniejszych zagrożeń dla rolnictwa. W jej efekcie następuje bowiem znaczące zahamowanie wzrostu i rozwoju roślin a także obniżenie plonów. Niedobór wody w glebie jest bezpośrednio związany z brakiem opadów deszczu, co ma miejsce stosunkowo często jednocześnie z wysokimi temperaturami powietrza. Szacuje się, że jedna trzecia ziemskiego obszaru lądowego cierpi z powodu niedoborów wody. Ponadto przewiduje się, że problem ten zostanie zintensyfikowany z powodu globalnego ocieplenia, co bezpośrednio przyczyni się do zmniejszenia produkcji roślinnej w wielu kluczowych regionach świata (Falqueto i in. 2017).

Stres wywołwany deficytem wody negatywnie wpływa na wiele procesów fizjologicznych roślin. Efekty te występują w wyniku stresu osmotycznego i różnych reakcji biochemicznych u roślin. Skutkuje to zmianami w turgorze komórek, przewodnictwie szparkowym, transpiracji, fotosyntezie, oddychaniu komórkowym, aktywności antyoksydacyjnej, absorpcji i wychwytywaniu kwantów światła a także dostępności i przepływie CO₂ w przestrzeniach międzykomórkowych, co prowadzi do zmniejszenia produkcji roślinnej (Falqueto i in. 2017).

Wpływ suszy na aktywność fotosyntetyczną roślin może mieć dwojaki charakter: bezpośredni lub pośredni. Efekt bezpośredni obserwowany jest gdy susza powoduje zamknięcie aparatów szparkowych prowadzące do zmniejszenia asymilacji węgla i/lub wskaźnika fotosyntezy netto. Efekty pośrednie suszy, nazywane również efektami pozaszparkowymi, wywołują zmiany w procesie fotosyntezy poprzez obniżenie transportu elektronów, zmniejszenie syntezy karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO), hamowanie aktywności RuBisCO, zmniejszenie syntezy ATP, zmniejszenie regeneracji rybulozy 1,5-bisfosforanu (RuBP) i syntezy chlorofilu (Çiçek i in. 2019)

W przypadku łagodnej suszy zmniejszone otwarcie aparatów szparkowych jest jedną z pierwszych reakcji roślin stanowiącą mechanizm obronny przed nadmierną utratą wody przez transpirację, ale także przez ograniczenie dopływu CO₂ do RuBisCO. Prowadzi to do spowolnienia

metabolizmu i ograniczenia fotosyntezy. Ostrzejsze warunki suszy będą stopniowo powodować efekty pozaszparkowe wpływające na funkcjonowanie szlaku fotosyntetycznego, wywołane upośledzeniem składników chloroplastów (zmniejszenie integralności błony, zaburzenie zawartości lipidów i pigmentów fotosyntetycznych, zmniejszenie wydajności systemów fotosyntetycznych I i II (PSI i PSII) oraz aktywności kluczowych enzymów, w tym w RuBisCO). U roślin o wyższej zdolności do aklimatyzacji takie ograniczone wykorzystanie energii fotochemicznej może następnie wywołać m.in. rozpraszanie ciepła i mechanizmy fotoprotekcyjne, cykliczny przepływ elektronów oraz zwiększenie obecności cząsteczek przeciwutleniających (np. enzymów, karotenoidów) (Gomes i in. 2020). Warto w tym miejscu także zaznaczyć, że 30% deficyt wody w liściach roślin jest granicą, powyżej której następują znaczące upośledzenia procesów biochemicznych (Kalaji i Łoboda 2010).

Nasilenie efektów działania suszy zależy od intensywności i czasu trwania tego stresu, jak i zdolności genetycznej określonego genotypu do radzenia sobie ze stresem. Różnice w odpowiedzi na stres wywołany deficytem wody obserwuje się nawet na poziomie odmian (Falqueto i in. 2017).

Aktualna wiedza z fizjologii, metabolizmu i genetyki różnych gatunków roślin dotycząca ich reakcji na stres związany z suszą jest jednak niewystarczająca. Niezwykle istotne jest bowiem badanie poszczególnych reakcji gatunków i odmian roślin na najważniejsze stresy środowiskowe, ze względu na fakt, iż może to stanowić niezwykle pomocne narzędzie podczas wyboru roślin tolerancyjnych. Jest to również droga do efektywnej uprawy roślin w kontekście aktualnie mających miejsce niekorzystnych zmian klimatycznych.

2. Fluorescencja chlorofilu

Wiele badań dotyczących wrażliwości roślin na deficyt wody koncentruje się na wpływie suszy na parametry pozorne, takie jak wskaźnik fotosyntezy netto, współczynnik transpiracji, efektywność zużycia wody, przewodnictwo szparkowe itp. Są to bardzo przydatne parametry podczas określania odpowiedzi roślin na stres jednak nie przedstawiają one pełnego obrazu dotyczącego stanu samego aparatu fotosyntetycznego.

Podczas wzrostu i rozwoju roślin jednym z ważniejszych czynników jest promieniowanie fotosyntetyczne (PAR). Zwykle ok. 80% tej energii jest absorbowane w liściach roślin celem wykorzystania jej w procesie fotosyntezy przez cząsteczki chlorofilu a, który jest podstawowym barwnikiem fotosyntetycznym występującym we wszystkich organizmach fotosyntetyzujących. Należy jednak zaznaczyć, że część tej energii, która nie zostanie pochłonięta jest wypromieniowywana w formie promieniowania fluorescencyjnego. To zjawisko pozwala uważać, że im większa intensywność fotosyntezy roślin tym niższa będzie wielkość fluorescencji. Stąd też jedną z miar stanu aparatu fotosyntetycznego w warunkach działania stresów abiotycznych jest właśnie pomiar fluorescencji chlorofilu a (Staniak i Baca 2018).

Wiele stresów abiotycznych, takich jak susza, może bezpośrednio lub pośrednio wpływać na aktywność fotosyntetyczną liści, a w konsekwencji zmieniać kinetykę fluorescencji chlorofilu. Analiza zmian parametrów fluorescencji chlorofilu dostarcza szczegółowych informacji na temat budowy i funkcji aparatu fotosyntetycznego, zwłaszcza PSII (Oukarroum i in. 2007).

Pomiar fluorescencji chlorofilu, jest nieinwazyjną metodą szeroko stosowaną w badaniach przesiewowych oraz w monitorowaniu upraw pod kątem tolerancji różnych gatunków i genotypów na stres (Gomes i in. 2020). Metody pomiarowo-badawcze wykorzystujące fluorescencję chlorofilu mają wiele zalet, m.in.: są wykonywane *in vivo* bez ingerencji w strukturę rośliny, dają możliwość przeprowadzania pomiarów polowych (również w szklarniach i laboratoriach), umożliwiają prowadzenie badań na zielonych częściach roślin (liście, łodygi, kłosa, ziarniaki, niedojrzałe nasiona), pomiar jest bardzo krótki (w zależności od zastosowanej aparatury trwa od paru sekund do kilku minut) a sam pomiar wiąże się ze stosunkowo niewielkim kosztem (Kalaji i Łoboda 2010).

Warto w tym miejscu zaznaczyć, że rośliny wykształciły szereg mechanizmów chroniących je od niekorzystnego wpływu warunków stresowych. Z tego też względu, reakcja na stres na poziomie liści czy całych roślin może być widoczna dopiero po upływie nawet tygodni czy miesięcy. Aparat fotosyntetyczny, a zwłaszcza struktura PSII, jest jednak bardzo wrażliwy na bodźce stresowe stąd też metody fluorymetryczne pozwalają na zarejestrowanie nawet na bardzo wczesnym etapie (jeszcze przed wystąpieniem innych skutków) reakcji roślin na czynniki stresowe (Staniak i Baca 2018).

Przyjmuje się, że obniżone stężenie CO₂ w wyniku zamknięcia aparatów szparkowych lub zmniejszonej wewnętrznej dyfuzji CO₂ zmniejsza wiązanie węgla. Prowadzi to do uszkodzenia chloroplastów poprzez fotoinhibicję oraz do tworzenia reaktywnych form tlenu. Jednak zmniejszenie zawartości wody w liściach i związany z tym wzrost stężeń jonów w komórkach są powiązane ze zmniejszeniem metabolizmu fotosyntetycznego, niezależnie od otwarcia aparatów szparkowych (Banks 2018). Stąd też w przypadku deficytu wody dokładniejszym wydaje się być dodatkowy pomiar fluorescencji chlorofilu wraz z pomiarem parametrów wymiany gazowej, co pozwala na szersze badanie stanu roślin pod tym kątem.

Reaktywne formy tlenu pojawiają się również gdy w wyniku dystrybucji zbyt dużej ilości energii dochodzi do nadprodukcji trypletowych form chlorofilu, których obecność sprzyja pojawianiu się reaktywnej formy tlenu, tj. tlenu singleowego. Te cząsteczki tlenu mogą przyczyniać się do fotooksydacji chlorofilu i degradacji niektórych składników aparatu fotosyntetycznego, jak np. białka D1 (Kalaji i Łoboda 2010).

Stres spowodowany suszą prowadzi do znacznego zmniejszenia wskaźnika fotosyntezy netto z powodu zamknięcia aparatów szparkowych. Stan może powodować fotoinhibicję, która wynika z braku równowagi między szybkością pojawiania się fotouszkodzeń w PSII (białka D1) a szybkością naprawy tych uszkodzeń. Jednak w warunkach silnego stresu związanego z suszą zdolność naprawy uszkodzonych części staje się nieoptymalna, a nieodwracalne zahamowanie PSII można wykryć poprzez chlorofilową fluorescencję (Mohammadi i in. 2015).

W fizjologicznie optymalnych warunkach fluorescencja chlorofilu jest emitowana głównie przez reaktywne centra chlorofilu w PSII w zakresie długości fal 685–690 nm. Wiadomo, że fluorescencja chlorofilu jest związana z intensywnością fotosyntezy a jej szybkość zależy od intensywności procesów fotochemicznych w odwrotnej proporcji: im mniej pracy fotochemicznej, tym większa fluorescencja. Niska fluorescencja jest typowa dla wydajnego PSII, a wysoka dla niewydajnego lub hamowanego PSII (Gorina i in. 2019).

3. Metody OJIP i PAM

Pomiary fluorescencji chlorofilu a są aktualnie bardzo często wykorzystywaną metodą badawczą w badaniach wpływu stresów na rośliny. Najczęściej wykorzystywanymi technikami pomiaru fluorescencji chlorofilu a są metody wykorzystujące pojedynczy impuls światła wysycającego (test OJIP) oraz metody modulowane (PAM; ang. Pulse Amplitude Modulated). Istnieją również inne metody pomiaru fluorescencji ale są one bardzo rzadko stosowane i ich znaczenie marginalne.

Nazwa testu OJIP jest akronimem i pochodzi od nazw poszczególnych punktów znajdujących się na krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu. Faza OJ (fotochemiczna) jest dobrze scharakteryzowana i odpowiada redukcji pierwotnego akceptora PSII (Q_A). Fazy JI i IP są nadal przedmiotem dyskusji wśród badaczy, ale przyjęło się uważać, że faza JI odpowiada wygaszaniu fluorescencji chlorofilu a IP odnosi się do redukcji kolejnych akceptorów w PSII (Bates i in. 2019). Test OJIP opiera się na teorii, że przepływ energii przez centra reakcji PSII można określić ilościowo w celu dostarczenia informacji o strukturze i funkcji aparatu fotosyntetycznego. Zaletą techniki w badaniach przesiewowych i do fenotypowania jest to, że szybko generuje duże ilości danych związanych z funkcją PSII przy użyciu małego i niedrogiego podręcznego urządzenia. Pozwala pobierać próbki z dużej liczby roślin w ciągu jednego dnia. OJIP jest wrażliwy na zmiany wydajności PSII roślin i jest powszechnie wykorzystany do wykrywania reakcji roślin na abiotyczne czynniki stresowe, takich jak susza, przedstawiając zmiany przed pojawieniem się widocznych objawów u roślin (Ajigboye i in. 2016).

W samej analizie OJIP wykorzystywana jest ogromna gama parametrów i współczynników. Niestety bardzo często zdarza się, że ten sam parametr jest prezentowany na wiele sposobów (Kalaji i Łoboda 2010). Podstawowymi parametrami fluorescencji chlorofilu a są F₀, F_m oraz F_v.

Pierwszy z nich, fluorescencja zerowa dla obiektów po adaptacji ciemniowej (F₀, F_{zero}, F_{open}, F_{ground}) wskazuje straty energii wzbudzenia w procesie jej przekazywania z anten energetycznych do centrum reakcji fotosystemu II (Center i in. 2016). O F₀ możemy mówić wtedy gdy cząsteczki plastochinonu w PSII są całkowicie utlenione, wszystkie centra reakcji są całkowicie otwarte

a wygaszanie niefotochemiczne (NPQ) nie występuje. Wówczas emitowana jest fluorescencja wzbudzonych cząstek chlorofilu w antenie PSII stanowiąca właśnie F_0 czyli początkowy punkt na krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu (Kalaji i Łoboda 2010). Wysokie wartości F_0 mogą świadczyć o zmniejszonej efektywności przekazywania energii pomiędzy cząsteczkami chlorofilu w PSII a także zmniejszoną absorpcją energii przez PSII (Center i in. 2016).

Parametr F_m określa maksymalną fluorescencję po adaptacji ciemieniowej. Jest ona uzyskiwana po zastosowaniu 0,8 – 2 sekundowego impulsu światła blokującego reakcję fotochemiczną w PSII o mocy od 3500 do 10000 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Taki impuls powoduje redukcję wszystkich plastochinonów w PSII i zablokowanie możliwości przyjmowania przez nie elektronów, co przekłada się również na chwilowe zamknięcie wszystkich centrów reakcji. W tym czasie nie występuje także zjawisko wygaszania niefotochemicznego (NPQ). Obniżenie parametru F_m wskazuje więc na fakt, iż badany fotosystem pozostaje pod wpływem stresu powodującego uniemożliwienie zredukowania wszystkich akceptorów w PSII. W badaniach można również wykorzystywać stosunek F_m do F_0 , wynoszący u zdrowych tkanek 4-5. Podczas niedoboru wody stosunek ten może obniżyć się nawet do wartości 1, co będzie wskazywać na zniszczenie PSII (Kalaji i Łoboda 2010).

F_v , określana również jako F_{variable} , określa fluorescencję zmienną. Na krzywej indukcji fluorescencji chlorofilu jest to wartość pomiędzy F_m a F_0 . Zależy ona od maksymalnej wydajności kwantowej PSII (F_v/F_m). W przypadku tego parametru występuje zależność, że im silniejszy występuje stres powodujący uszkodzenia tylakoidów, tym niższa aktywność PSII a co za tym idzie niższa wartość fluorescencji zmiennej (Kalaji i Łoboda 2010).

W literaturze najczęściej wykorzystywane są jednak dwa inne parametry związane z fluorescencją chlorofilu: PI (wskaźnik wydajności) i F_v/F_m (maksymalna wydajność kwantowa PSII), które są głównie stosowane jako wskaźniki tolerancji stresu związanego z suszą.

Wskaźnik PI wskazuje na funkcjonowanie PSII i pokazuje wydajność roślin w warunkach stresowych (Fariaszewska i Staniak 2015). PI wskazuje na ilość energii efektywnej, która jest wykorzystywana w PSII. Innymi słowy, jest to parametr odzwierciedlający zdolność rośliny do tolerowania występującego czynnika stresowego (Staniak i Baca 2018). Spadek PI w odpowiedzi na stres związany z suszą wynika głównie ze spadku wydajności fotochemicznej fotosyntetycznego transportu (Oukarroum i in. 2007).

Skuteczność fotosystemu PSII i pośrednio stan fizjologiczny roślin można zmierzyć poprzez pomiar fluorescencji chlorofilu, a zwłaszcza stosunku F_v/F_m . Parametr F_v/F_m określa maksymalną wydajność kwantową PSII (Fariaszewska i Staniak 2015). Uważa się, że rośliny wykazujące wartość F_v/F_m w granicach między 0,78 a 0,85 nie są obciążone stresem. Wartości F_v/F_m poniżej 0,78 wskazują natomiast na uszkodzenie fotosystemu PSII (Tribulato i in. 2019).

Warto zaznaczyć, że większość niekorzystnych skutków suszy u roślin jest odwracalna poprzez ponowne dostarczenie wody w ilości dostosowanej do aktualnych potrzeb rośliny. Uważa się jednak efekt stresu spowodowanego suszą jest odwracalny, dopóki F_v/F_m pozostaje nienaruszony (Oukarroum i in. 2007).

Maksymalna wydajność PSII jest powszechnie uważana za wrażliwy wskaźnik stresu środowiskowego. Zmniejszone wartości F_v/F_m są związane z występowaniem fotoinhibicji u roślin, ponieważ zmniejszenie F_v/F_m występuje, gdy struktura i funkcja PSII jest zaburzona przez stres. W tym stanie fizjologicznym mechanizmy ochronne są wyhamowane przez brak wody, co powoduje uszkodzenia błon chloroplastów. Zmniejszenie F_v/F_m implikuje więc zmniejszoną wydajność procesu konwersji fotochemicznej, co może sugerować możliwe uszkodzenie i zahamowanie aktywności PSII (Falqueto i in. 2017).

Należy jednak zaznaczyć, że wartość wskaźnika maksymalnej wydajności kwantowej PSII nie jest wprost proporcjonalna do wartości intensywności fotosyntezy przedstawianej jako wydzielanie O_2 lub asymilacja CO_2 . Co więcej, w wielu badaniach wskazuje się również, że nie zawsze jest on związany z zawartością chlorofilu w tkankach roślin. Ten brak zależności może być bowiem spowodowany faktem, iż obniżenie wartości F_v/F_m może być skutkiem wygaszania niefotochemicznego lub zmniejszenia płynności błon tylakoidów powodowanego obecnością nagromadzonych nieorganicznych anionów (Kalaji i Łoboda 2010).

W metodzie pomiaru modulowanej fluorescencji chlorofilu (PAM) wykorzystuje się źródło światła, które jest z określoną częstotliwością włączane i wyłączane (Cetner i in. 2016). Wśród najważniejszych parametrów tej metody wyróżnia się wydajność kwantową reakcji fotochemicznej w PSII (Yield, Y , Φ PSII), wygaszanie fotochemiczne (qP) oraz wygaszanie niefotochemiczne (qN, NPQ).

Jeszcze innym i stosunkowo często wykorzystywanym parametrem w ocenie stanu aparatu fotosyntetycznego roślin w odpowiedzi na stres abiotyczny jest parametr Yield (Y , Φ PSII). Pozwala on na zbadanie aktualnej sprawności aparatu fotosyntetycznego w określonych warunkach. Określa on stosunek kwantów wykorzystanych w reakcjach fotochemicznych do całkowitej liczby kwantów PAR, które zostały zaabsorbowane (Center i in. 2016). Istnieje korelacja między wartością Φ PSII a efektywnością wiązania węgla podczas fotosyntezy. Zaburzenia wywołane wskutek działania stresu suszy, powodującego zmniejszenie wydajności procesu fotorespiracji bądź transportu elektronów może wpływać na obniżenie wartości Φ PSII. W tym czasie bowiem zamknięciu ulegają aparaty szparkowe, zmniejszona zostaje asymilacja CO_2 i zużycie ATP oraz NADPH. To natomiast bezpośrednio przekłada się na wyhamowanie transportu elektronów zarówno w PSI jak i PSII (Kalaji i Łaboda 2010). Innymi słowy, spadek asymilacji fotosyntetycznej można wykryć poprzez spadek wartości Φ PSII. Warto też zaznaczyć, że Φ PSII jest dodatnio skorelowany z aktywnością PSII i może być wykorzystany do oceny szybkości transferu fotosyntetycznego z PSII do PSI.

Φ PSII można przedstawiać jako iloczyn wydajności otwartych centrów reakcji (F_v/F_m) i wygaszania fotochemicznego (qP). Co więcej, fotosyntetyczne cykle redukcji i utleniania węgla są głównym pochłaniaczem elektronów dla aktywności PSII podczas łagodnej suszy. Ponadto wartość Φ PSII jest także związana z przemianami w cyklu Calvina. Niektórzy uważają na podstawie powyższego, że parametr ten zmniejsza się tylko przy drastycznym deficycie wody (Huang i in. 2013).

Wygaszanie fotochemiczne i niefotochemiczne (qP i NPQ) to parametry, które pomagają zrozumieć mechanizmy aklimatyzacji u roślin w różnych warunkach środowiskowych. Wygaszanie fotochemiczne (qP) jest jednym z parametrów, które wskazują aktualną sprawność aparatu fotosyntetycznego w określonych warunkach środowiskowych. Parametr qP określa efektywność przekształcania energii świetlnej na chemiczną wykorzystywaną w cyklu Calvina. Wygaszanie fotochemiczne odnosi się do stanu, w którym wzbudzone chlorofile przekazują swoją energię innym cząsteczkom chlorofilu, a następnie wzbudzenie jest stopniowo przekazywane do centrów reakcji fotochemicznej (PSI i PSII), gdzie energia jest wykorzystywana w fotosyntezie (Mohammadi i in. 2015). Zmiany wartości qP najczęściej związane są z zamykaniem centrów reakcji ze względu na wysycanie fotosyntezy wywołane przez promieniowanie aktyniczne. Sama wartość qP daje informacje na temat udziału otwartych centrów reakcji PSII (Kalaji i Łaboda 2010). Uważa się, że zwiększona aktywność fotochemiczna powoduje zwiększenie wartości qP (Klamkowski i in. 2013).

Wygaszanie niefotochemiczne (qN, NPQ) określa procesy przekształcania energii zaabsorbowanej podczas fazy świetlnej fotosyntezy na energię ciepłą. Wyróżnia się trzy różne procesy przyczyniające się do NPQ: regulowane wartością pH rozproszenie energii w antenie PSII, zmiany stanu oraz fotoinhibicja (Nilkens i in. 2010). Podczas fotoinhibicji wywołanej dostarczaniem zbyt intensywnego światła bądź podczas działania innych czynników stresowych, takich jak deficyt wody, procesy przekształcania absorbowanej energii na ciepło są intensyfikowane, co przekłada się na wzrost wartości parametru NPQ. Stąd też wygaszanie niefotochemiczne jest swego rodzaju mechanizmem obronnym w warunkach stresowych (Abbas i in. 2019). W tym czasie zwiększa się liczba uszkodzeń PSII w stosunku do ich napraw (Kalaji i Łaboda 2010).

4. Podsumowanie

Wykorzystanie pomiarów fluorescencji chlorofilu a może dostarczyć wielu danych na temat funkcjonowania i wydajności aparatu fotosyntetycznego roślin. Należy jednak zaznaczyć, że sam pomiar jest związany z bezpośrednią reakcją fluorescencji z reakcjami fazy świetlnej. Stąd też niewątpliwym ograniczeniem tej metody jest niemożność odzwierciedlenia pełnej wydajności fotosyntezy badanej rośliny. Pomiar fluorescencji może bowiem wskazywać na wydajność PSII ale nie zastąpi pomiaru intensywności samego procesu fotosyntezy. Warto zatem wraz z metodami

pomiarów fluorescencji chlorofilu stosować inne metody oceny wpływu czynnika stresowego na roślinę, np. intensywność transpiracji, przewodnictwa szparkowego czy fotosyntezy.

5. Literatura

- Abbas A, Yu H, Cui H, Li X (2019) Effect of drought stress on chlorophyll fluorescence, and biomass partitioning of *Aegilops tauschii* L. *Applied Ecology and Environmental Research* 17(1):1071-1082.
- Ajigboye OO, Bousquet L, Murchie EH, Ray RV (2016) Chlorophyll fluorescence parameters allow the rapid detection and differentiation of plant responses in three different wheat pathosystems. *Functional plant biology* 43(4): 356-369.
- Banks JM (2018) Chlorophyll Fluorescence as a Tool to Identify Drought Stress in *Acer* genotypes. *Environmental and Experimental Botany* 155: 118-127.
- Bates H, Zavafer A, Tailor M, Ralph PJ (2019) A guide to Open-JIP, a low-cost open-source chlorophyll fluorometer. *Photosynthesis Research* 142: 361-368.
- Cetner MD, Dąbrowski P, Samborska IA, Łukasik I, Swoczyna T, Pietkiewicz S, Bąba W, Kalaji HM (2016) Zastosowanie pomiarów fluorescencji chlorofilu w badaniach środowiskowych. *Kosmos* 65(2): 197-205.
- Çiçek N, Pekcan V, Arslan Ö, Erdal CS, Nałçaiyi ASB, Çil AN, Şahin V, Kaya Y, Ekmekçi Y (2019) Assessing drought tolerance in field-grown sunflower hybrids by chlorophyll fluorescence kinetics. *Brazilian Journal of Botany* 42: 249–260.
- Falqueto AR, da Silva Júnior RA, Gomes MTG, Martins JPR, Silva DM, Partelli FL (2017) Effects of drought stress on chlorophyll a fluorescence in two rubber tree clones. *Scientia Horticulturae* 224: 238-243.
- Fariaszewska A, Staniak M (2015) Changes in yield, leaf area and fluorescence chlorophyll parameters of different forage grasses cultivars under drought stress. *Acta Scientiarum Polonorum. Agricultura* 14(4): 27-28.
- Gomes AP, Rodrigues CA, Rodrigues AM, Leitão AE, Batista-Santos P, Nhantumbo N, Massinga R, Ribeiro-Barros AI, Ramalho JC (2020) Drought response of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) landraces at leaf physiological and metabolite profile levels. *Environmental and Experimental Botany* 175: 104060.
- Gorina VM, Mesyats NV, Korzin VV, Ivashchenko YA (2019). Studies of chlorophyll fluorescence intensity in apricot leaves during wilting processes. *Acta Horticulturae* 1242: 633-638.
- Huang C, Zhao S, Wang L, Anjum SA, Chen M, Zhou H, Zou C (2013) Alteration in chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in hybrid ramie (*Boehmeria nivea* L.) Under drought stress. *Australian Journal of Crop Science* 7(5): 594-599.
- Kalaji MH, Łoboda T (2010) Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Klamkowski K, Treder W, Sowik I, Tryngiel-Gać A, Masny A (2013) Porównanie reakcji trzech odmian truskawki uprawianych w szklarni na deficyt wody. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* 21: 137-146.
- Mohammadi H, Janmohammadi M, Sabaghnia N (2015) Chlorophyll fluorescence response of wheat to exogenous application of growth regulators under terminal drought stress. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, sectio C–Biologia* 70(1): 13-27.
- Nilkens M, Kress E, Lambrev P, Miloslavina Y, Müller M, Holzwarth AR, Jahns P (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1797(4): 466-475.
- Oukarroum A, Madidi SE, Schansker G, Strasser RJ (2007) Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany* 60: 438–446.
- Staniak M, Baca E (2018) Wpływ stresu suszy na wskaźniki fluorescencji chlorofilu u lucerny mieszańcowej (*Medicago × varia* Martyn), koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense* L.) i

koniczyny białej (*Trifolium repens* L.). Łąkarstwo w Polsce (Grassland Science in Poland) 21: 127-138.

Tribulato A, Toscano S, Di Lorenzo V, Romano D (2019) Effects of Water Stress on Gas Exchange, Water Relations and Leaf Structure in Two Ornamental Shrubs in the Mediterranean Area. Agronomy 9: 381.

7. Gojnik – roślina na miarę XXI wieku

Sideritis – a plant for 21st century

Widelska Gabriela ⁽¹⁾, Głaz Patrycja ⁽²⁾, Straszak Dominik ⁽²⁾, Widelski Jarosław ⁽³⁾,
Chodun Wiktoria ⁽⁴⁾, Oniszcuk Anna ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra Chemii Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾ Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾ Katedra Kosmetologii, Wydział Wychowania Fizycznego i Zdrowia, Akademia Wychowania Fizycznego w Warszawie Filia w Białej Podlaskiej
Opiekun naukowy: dr hab. Anna Oniszcuk

Widelska Gabriela: gabrielachodun@yahoo.com

Słowa kluczowe: *Sideritis* spp., działanie przeciwzapalne, stres oksydacyjny

Streszczenie

Od wielu setek lat ludzkość korzysta z dobroci natury, lecząc choroby, gojąc rany, odżywiając się i czerpiąc przyjemność. Rodzaj *Sideritis* po raz pierwszy opisany przez Dioskuridesa ma na tym polu ogromne zasługi. Bogaty w swoich przedstawicieli (ponad 150 gatunków) przejawia szereg właściwości terapeutycznych, zgłębianych od wielu już lat przez etnobotaników i etnofarmakologów. Działanie przeciwkaszlowe, przeciwbólowe, przeciwgorączkowe, przeciwzapalne, antyoksydacyjne i przeciwbakteryjne znane są od lat. Do tak zacnego grona terapeutycznych możliwości dochodzi w ostatnich latach jeszcze jedna, a mianowicie wpływ na centralny układ nerwowy. Dzięki nowo odkrytym właściwościom rodzaj *Sideritis* może być w przyszłości stosowany w terapii chorób neurodegeneracyjnych jak i tych ze spektrum zaburzeń behawioralnych.

1. Wstęp

Napary i wywary z ziół już od tysięcy lat z powodzeniem stosowane są jako środek zapobiegawczy, a także jako lek w wielu jednostkach chorobowych. Także obecnie ich konsumpcja nie spada, co więcej dzięki bogactwu składu, a także co istotne smaku, odnotowuje się stały jej wzrost. Oprócz powszechnie występujących w naparach roślinnych związków polifenolowych, którym zawdzięczamy między innymi antyoksydacyjne działanie, coraz częściej badacze donoszą o nowych, prozdrowotnych składnikach (Szymczycha-Madeja i in. 2012). Dlatego właśnie naukowcy skłaniają się w swoich poszukiwaniach w kierunku etnobotaniki i medycyny ludowej, gdyż to właśnie tam być może drzemią wciąż nieodkryte pokłady nowych związków o zaskakujących właściwościach. Jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin na polu farmacji i medycyny jest niewątpliwie etnofarmakologia, stanowiąca intrygujące wyjście do pozyskiwania i tworzenia nowych leków.

2. Opis zagadnienia

Rodzaj *Sideritis* należy do rodziny jasnotowatych (*Lamiaceae* Lindl) i obejmuje ponad 150 gatunków rozprzestrzenionych w zachodnim obszarze palearktycznym, czyli strefie zoogeograficznej obejmującej prawie całą Europę i położoną na północ od Himalajów Azję cechującą się klimatem zimnym i umiarkowanym. Nazwa *Sideritis* wywodzi się z języka greckiego (σίδηρος) i dosłownie oznacza żelazo. Ma to bezpośredni związek z pierwotnym wykorzystaniem rośliny jako środka leczącego rany zadane w czasie bitew (Obon de Castro i Rivera-Núñez 1994). Taksonomicznie jest to rodzaj bardzo skomplikowany, podzielony na dwa podrodzaje i aż siedem sekcji. W związku z subtelnymi różnicami pomiędzy poszczególnymi roślinami botanicy od lat napotykają na liczne

trudności w ich dokładnym i poprawnym sklasyfikowaniu. Niektórzy z nich w swoich badaniach taksonomicznych wykorzystują najnowocześniejsze techniki obrazujące sekwencje znaczników w jądrze komórkowym (Barber i in. 2002). Dzięki tym badaniom udało się ustalić, że najstarsze gatunki należą do sekcji *Empedoclia* i to głównie one stosowane były w tradycyjnej medycynie, a teraz stanowią obiekt badań w celu pozyskania biologicznie czynnych składników o właściwościach prozdrowotnych. Wiele roślin z tej sekcji należących do rodzaju *Sideritis* określanych jest wspólną nazwą herbaty górskiej, oczywiście ze względu na miejsce występowania (Papanikolaou i Kokkini 1982). Nie jest to jedyna nazwa jaka pojawia się w literaturze i powszechnym użyciu, dla przykładu w Anglii funkcjonuje pod zwyczajową nazwą – żelazne ziele, w Rosji to żeleźnica, czasem swą nazwę zawdzięcza górze, na której zboczach można go spotkać i dlatego w Grecji to tak zwana herbata olimpijska (choć rośliny rodzaju *Sideritis* występują nie tylko na górze Olimp). Jak podaje Font Quer (Font Quer 2000) pierwsze wzmianki o gojniku pochodzą z I wieku naszej ery i zostały zawarte w wybitnym dziele Dioskuridesa „De materia medica”. Prawdą jest jednak to, że ze względu na mnogość gatunków nie mamy pewności, który dokładnie przedstawiciel rodzaju *Sideritis* autor opisywał. W przypadku opisywanego rodzaju już samo studiowanie nazw własnych, powszechnie stosowanych w różnych regionach świata, daje pogląd na ciekawe właściwości lecznicze konkretnych roślin. Dla przykładu wywar z *Sideritis raeseri* stosowany jest jako środek ogólnie wzmacniający wyczerpany chorobami organizm, herbata z *Sideritis condensata* wykorzystywana jest jako lek uspakajający, a *Sideritis scardica* stosowany jest w celach relaksacyjnych i rozluźniających w długotrwałym napięciu. Ponad to etnomedycyna zna przypadki łączenia ziół w specjalne mieszanki służące do terapii bardziej złożonych chorób i dolegliwości. Jak podaje Lentini (Lentini 2000) wysuszone liście *Sideritis italica* stosowane były w leczeniu ran ludzi i zwierząt (stąd głównymi propagatorami ich stosowania byli pasterze owiec). Co warto jest również podkreślenia, w wielu krajach Europy zachodniej powraca się do codziennego picia herbat ziołowych, zatem pozyskiwanie nowych, leczniczych oraz posiadających niepodważalne walory smakowe ziół jest odpowiedzią na zapotrzebowanie stale rosnącego rynku.



Rys.1 *Sideritis scardica*.

3. Przegląd literatury

3.1 Choroby układu oddechowego

Istnieje wiele doniesień odnośnie korzystnego wpływu ekstraktów z *Sideritis* na działanie układu oddechowego. Napary z *Sideritis syriaca* i *Sideritis perfoliata* stosowane są jako lekarstwo na mokry kaszel (tzw. kaszel produktywny). Podobnie badania etnobotaniczne przeprowadzone w Kolonii (Niemcy) na grupie tureckich emigrantów wykazały stosowanie naparu z wysuszonych liści i kwiatów *Sideritis congesta* i *Sideritis libanotica* na kaszel różnego pochodzenia (Akbulut 2015). Najbardziej rozpowszechnionym gatunkiem w Turcji jest *Sideritis trojana*, napary z niego

stosowane są w stanach zapalnych krtani i oskrzeli. Dodatkowo wykazuje on działanie wykrztuśne, stąd powszechne jego zastosowanie w medycynie ludowej jako środka na kaszel mokry, oskrzelowy (Celik i in. 2008). W podobnych schorzeniach ludność Bułgarii wykorzystuje napary z *Sideritis scardica*, pierwsze doniesienia o takim zastosowaniu odnotowano w bułgarskich czasopismach i podręcznikach już na początku XX wieku jednak z powodu bariery językowej bardzo długo pozostawały w cieniu innych doniesień ze świata etnobotaniki (Aneva 2013). Występujący w basenie Morza Śródziemnego *Sideritis raeseri* to powszechna przyprawa, jego napary z powodzeniem stosowane są w leczeniu uporczywego kaszlu, głównie ze względu na działanie przeciwkaszlowe, przeciwzapalne, przeciwbakteryjne i znieczulające (Iatrou i Kokkalou 1997).

3.2 Choroby układu pokarmowego

Sideritis caesarea jest od lat z powodzeniem stosowany we wszelkich schorzeniach żołądkowo-jelitowych. Istnieją również doniesienia w literaturze o korzystnym wpływie *Sideritis congesta* u osób zmagających się z otyłością, zaś *Sideritis pisdica* i *Sideritis trojana* wykorzystywane są jako roślinny lek na bóle żołądkowe (Gurbuz i in. 2005). Jako środki o działaniu wiatropędnym stosowane są napary z *Sideritis galatica* i *Sideritis stricta*, zaś w różnego rodzaju schorzeniach żołądkowo-jelitowych używane są napary z *Sideritis raeseri*. Powszechnie występujące w Grecji gatunki (*Sideritis euboea*, *Sideritis perfoliata*, *Sideritis raeseri*, *Sideritis scardica* i *Sideritis syriaca*) tradycyjnie wykorzystywane są w leczeniu dyspepsji o różnej etiologii. *Sideritis sipylea* i *Sideritis tmolea* są z kolei skutecznym lekarstwem na biegunki oraz wykorzystywane są w terapii kamicy żółciowej (Celik i in. 2008).

3.3 Choroby układu moczowego

W niektórych regionach Turcji, Grecji i Bułgarii gojnik wykorzystywany jest jako roślina o działaniu moczopędnym, dodatkowo *Sideritis syriaca* i *Sideritis leptoclada* przejawiają również właściwości przeciwwgorączkowe. Bułgarscy naukowcy (Aneva i in. 2019) zaobserwowali także ciekawe działanie wodnego ekstraktu z *Sideritis scardica* w przypadku terapii kamicy moczanej. Wykazali oni, że ekstrakt ten choć ma umiarkowane działanie moczopędne, nie działa drażniąco na nerki, a dodatkowo wpływa normalizująco na poziom pH moczu, przez co zapobiega powstawaniu złogów moczanych w układzie moczowym. Ponad to ci sami badacze stwierdzili korzystny wpływ wyciągów z *Sideritis scardica* na działanie męskiego układu płciowego (wykazuje terapeutyczne działanie w przypadku łagodnego rozrostu prostaty). *Sideritis trojana* w lecznictwie ludowym wykorzystywany jest jako środek na stany zapalne nerek (Aneva 2013).

3.4 Choroby układu naczyniowo-sercowego

Pieroni wraz ze współpracownikami donoszą o normalizującym ciśnienie krwi działaniu wyciągów z *Sideritis congesta*, *Sideritis libanotica* i *Sideritis pisdica*. W całych południowych Włoszech, a w szczególności w Kalabrii liście *Sideritis syriaca* stosowane były w opatrunkach ze względu na zdolność hamowania krwi oraz przyspieszanie gojenia się ran (Pieroni i in. 2005). Ciekawym działaniem przeciw anemii wyróżniają się także *Sideritis euboea*, *Sideritis perfoliata* i *Sideritis raeseri* (Plieyliakusic i in. 2011).

Wszechstronność działań jakie przejawia rodzaj *Sideritis* na wszystkie układy ludzkiego organizmu nie byłaby możliwa gdyby nie szerokie właściwości farmakologiczne substancji czynnych zawartych w poszczególnych gatunkach. Jednym z lepiej poznanych i opisanych w literaturze jest działanie przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe. Według najnowszych badań większość przebadanych ekstraktów działa bakteriobójczo na *Staphylococcus aureus* (Aneva 2019). Głównymi i najaktywniejszymi substancjami wyizolowanymi między innymi z *Sideritis trojana* były: siderol, nepetalakton i beta-amiryn. Dodatkowo po raz pierwszy w rodzaju *Sideritis* zaobserwowano kwasy oleanolowy i ursolowy, których działanie przeciwwirusowe testowane było na ludzkich patogenach – odnotowano nieznaczny wpływ na herpes wirusy (Sattar i in. 1995). Badania prowadzone na *Sideritis scardica* i jego odpowiednich frakcjach (eter, octan etylu i n-butanol) wykazały działanie bójcze w stosunku do siedmiu szczepów patogenów, były to zarówno bakterie i grzyby. Najaktywniejsza okazała się być frakcja n-butanolowa i jej działanie przeciwko *Staphylococcus epidermidis*. Inne ekstrakty pozyskane z rodzaju *Sideritis* (m.in. *Sideritis pisdica* i *Sideritis albiflora*)

hamowały namnażanie drożdży oraz bakterii zarówno gram dodatnich jak i gram ujemnych (Aneva 2019). Innym ważnym z punktu widzenia terapii wielu chorób jest działanie przeciwzapalne. Zaobserwowano je między innymi w etanolowym ekstrakcie *Sideritis scardica* oraz w wodnym ekstrakcie *Sideritis lycia*. Głównymi substancjami odpowiadającymi za powyższe działanie są glikozydy flawonowe reprezentowane przede wszystkim przez osturkozyd A, B i C (całkowita zawartość w mieszaninie ekstrakcyjnej na poziomie 13-24%). Łagodząco na stany zapalne działają także *Sideritis raeseri* i *Sideritis perfoliata*, przede wszystkim ze względu na obecność pochodnych hypoletyny, które oprócz silnego działania przeciwzapalnego charakteryzują się również brakiem właściwości drażniących ścianę żołądka (Charami i in. 2008). Najpopularniejszym i zarazem najczęściej podkreślanym przez badaczy działaniem jest działanie antyoksydacyjne. Sam problem walki ze stresem oksydacyjnym na różnych polach jest bardzo rozpowszechniony, wiemy bardzo dobrze i z różnych źródeł naukowych że szkodliwy wpływ wolnych rodników przyczynia nie tylko do przyspieszenia procesów starzenia ale także stoi niejednokrotnie na początku patogenezы nie jednej z chorób, w tym chorób nowotworowych i cywilizacyjnych. Rodzaj *Sideritis*, co warto podkreślić, także stanowi niezwykle bogactwo przeciwutleniaczy. Co więcej naukowcy głównie w tych właściwościach upatrują możliwości przyszłego, komercyjnego ich zastosowania. Antyoksydacyjne działanie możliwe jest przede wszystkim dzięki obecności związków polifenolowych i co stwierdzono wieloma testami najwyższe ich stężenie, a zatem największe właściwości przeciwutleniające obserwuje się w gatunku *Sideritis scardica* (Geneva i in. 2010). Tenże gatunek prezentuje jeszcze jedną ciekawą cechę, a mianowicie widocznie poprawia funkcjonowanie centralnego układu nerwowego. Wykazano jego pozytywny wpływ w terapii osób z zespołem nadpobudliwości psychoruchowej (ADHD) i z zaburzeniami funkcji poznawczych. Usprawnia procesy pamięciowe oraz redukuje stres, a jego etanolowe wyciągi testowane były pod kątem chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimer'a, choroba Parkinsona). Wykazano również działanie przeciwdepresyjne w wyciągach z *Sideritis clandestina* (Vasilopoulou i in. 2013). Knorle analizował także ekstrakt *Sideritis scardica* jako jeden z inhibitorów monoaminotransferaz, odpowiedzialnych za transport monoamin odgrywających zasadniczą rolę w systemie nerwowym (dopamina, serotonina, noradrenalina). Otrzymane wyniki sugerują możliwość wykorzystania alkoholowych ekstraktów *Sideritis* w terapii różnego rodzaju zaburzeń behawioralnych (Knorle 2012).

4. Podsumowanie

Istnieje ponad 150 gatunków w rodzaju *Sideritis*, coraz częściej wzbudzają one zainteresowanie badaczy, już nie tylko etnobotaników ale przede wszystkim farmakologów. Tradycyjne zastosowanie tych roślin datuje się na setki lat wstecz jednak, dzisiejsza medycyna z nadzieją spogląda na nowe możliwości terapii przy użyciu dobrze znanych lecz wciąż zaskakujących gojników. Górskie ludy południowo-wschodniej Europy stosowały na przeróżne dolegliwości właśnie herbatkę ziołową z najczęściej występujących przedstawicieli rodzaju *Sideritis*. Leczone nimi rany, wrzody, problemy żołądkowe, kaszel i stany zapalne. Co ciekawe napary z gojnika stosowano także w celu zniesienia bóli głowy i łagodnych odmian choroby wysokogórskiej, dzięki czemu również dzisiaj wspinacze mogą posiłkować się naturalnymi metodami walki z niedogodnościami w czasie aklimatyzacji. Rośliny z rodzaju *Sideritis* z powodzeniem mogą być również wykorzystywane jako znakomity środek w walce z zapaleniem płuc i grypą. Tak szeroki wachlarz właściwości i różnorodności zastosowania możliwy jest dzięki bogatemu składowi chemicznemu ekstraktów, gdzie wyróżniamy diterpeny, flawonoidy, irydoidy, sterole. Rodzaj *Sideritis* prezentuje prawdziwe bogactwo, które dzięki poprzednim pokoleniom udało się na nowo dostrzec.

5. Literatura

Akbulut S (2015) Differences in the traditional use of wild plants between rural and urban areas: the sample of Adana. *Studies on Ethno-Medicine* 9:141-150

- Aneva I (2013) Traditional uses of *Sideritis scardica* Griesb. in Bulgaria. In Krupina N (ed.) First International Conference Bulgarian Medicinal Plants: Fundamental and Applied Problems. 21-22.05.2013. Publicity House of Novosybirsk State Agrarian University, Novosybirsk, Russia 469-471
- Aneva I, Zhelev P, Kozuharova E i in. (2019) Genus *Sideritis*, section *Emedoclia* in southeastern Europe and Turkey – studies in ethnopharmacology and recent progres in biological activities. DARU Journal of Farmaceutical Sciences 27: 407-421
- Barber JC, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A i in. (2002) Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets. Molecular Phylogenetics and Evolution 23: 293-306
- Celik S, Karabacak A, Uysal I (2008) Plants have been collected from mythological Kazdagi (Mt. Ida) National Park, West Turkey by turkmens and their folk, cultural and social uses. European Journal of Scientific Research 19: 835-843
- Charami MT, Lazari D, Karioti A i in. (2008) Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae) Phytotherapy Research 22: 450-454
- Fon Quer P (2000) Plantas Medicinales. El Dioscorides Renovado. Barcelona: Ediciones Peninsula
- Geneva M, Hristozkova M, Yonova P i in. (2010) Effect of endomycorrhizal colonization with *Glomus intraradices* on growth and antioxidant capacity of *Sideris scardica* Griseb. General and Applied Plant Physiology 36: 47-54
- Gurbuz I, Ozkan AM, Yesilada E i in. (2005) Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey) Journal of Ethnopharmacology 101: 313-318
- Iatrou G, Kokkalou E (1997) Rarity conservation, importance and ethnopharmacological knowledge of the Greek flora. In: Heywood VH, Skoula M (ed.) Identification of wild food and non-food plants of the Mediterranean region. Centre International des Hautes Etudes Agronomiques Mediterraneennes 65-75
- Knorle R (2012) Extracts of *Sideritis scardica* as triple monoamine reuptake inhibitors. Journal of Neural Transmission 119: 1477-1482
- Lentini F (2000) The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. Fitoterapia 71: 83-88
- Obon De Castro C, Rivera Nunez D (1994) A taxonomic revision of the section *Sideritis* (Labiatae). Lubrecht Cramer Ltd.
- Papanikolaou K, Kokkini S (1982) A taxonomic revision of *Sideritis* L. section *Empedoclia* (Rafin.) Benntam (Labiatae) in Greece. Aromatic plants: basic and applied aspects. The Hague: Martinus Nijhoy Publishers, 101-128
- Pieroni A, Muenz H, Akbulut M i in. (2005) Traditional phytotherapy and trans-cutural pharmacy among Turkish migrants living in Cologne, Germany. Journal of Ethnopharmacology 102: 69-88
- Plieyliakusic D, Savikin K, Jankovic T i in. (2011) Chemical properties of the cultivated *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *Raeseri*. Food Chemistry 124: 226-233
- Sattar A, Bankova V, Kujumgiev A i in. (1995) Chemical composition and biological activity of leaf exudates from some Lamiaceae plants. Pharmazie 50(1): 62-65
- Szymczyk-Madeja A, Welna M, Pohl P (2012) Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. Trends in Analytical Chemistry 35: 165-181
- Vasilopoulou C, Kontogianni V, Linardaki Z i in. (2013) Phytochemical composition of „mountain tea” from *Sideritis clandestina* subsp. *clandestina* and evaluation of its behavioral and oxidant/antioxidant effects on adult mice. European Journal of Nutrition 52: 107-116

8. Rodzaj *Rhodiola* źródłem naturalnych adaptogenów

The *Rhodiola* genus as a source of natural adaptogens

Widelska Gabriela ⁽¹⁾, Głaz Patrycja ⁽²⁾, Straszak Dominik ⁽²⁾, Widelski Jarosław ⁽³⁾, Chodun Wiktoria ⁽⁴⁾, Oniszczyk Anna ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra Chemii Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾ Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾ Katedra Kosmetologii, Wydział Wychowania Fizycznego i Zdrowia, Akademia Wychowania Fizycznego w Warszawie Filia w Białej Podlaskiej
Opiekun naukowy: dr hab. Anna Oniszczyk

Widelska Gabriela: gabrielachodun@yahoo.com

Słowa kluczowe: *Sideritis* spp., działanie przeciwzapalne, stres oksydacyjny

Streszczenie

Rodzaj *Rhodiola* to najprawdziwsza perełka w królestwie roślin. Reprezentowana przez ogromną ilość gatunków przejawia różnorodność zarówno w składzie chemicznym jak i prezentowanych działaniach. Od wieków stosowana w medycynie ludowej coraz śmielej radzi sobie na płaszczyźnie nowoczesnych badań. Ze względu na mnogość zastosowań zwraca uwagę badaczy z całego świata. Właściwości antyutleniające, adaptacyjne, immunomodulujące dają szerokie możliwości wielu chorób, również tych ciężkich do opanowania nawet w obecnych czasach. Działanie przeciwdepresyjne i przeciwlękowe zaobserwowane na ekstraktach etanolowych to także doskonała alternatywa lub uzupełnienie klasycznego leczenia. Możliwość zastosowania nowoczesnych technik izolacyjnych oraz analitycznych daje również szansę na to by w końcu ujednolicić otrzymywane na całym świecie wyniki badań.

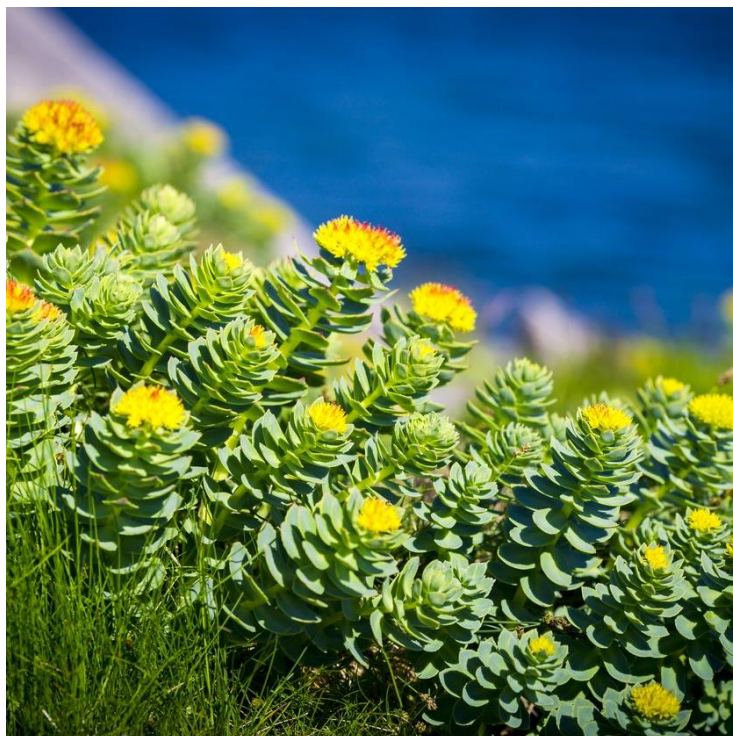
1. Wstęp

Ziołolecznictwo od wieków stosowane było w celu przystosowania się do nadmiernego i długotrwałego stresu oraz do przeciwdziałania jego negatywnym skutkom, takim jak zaburzenia poznawcze, zmęczenie, bezsenność czy stany depresyjne. Adaptogeny to naturalne związki lub ekstrakty roślinne, które właśnie zwiększają zdolność przystosowania się i tym samym przetrwania organizmów żyjących w stałym napięciu. Tak jak witaminy i przeciwutleniacze, adaptogeny stanowią kategorię składników odżywczych mogących być częścią składową dla wyspecjalizowanej żywności funkcjonalnej. Wykazują one zarówno działanie przeciwsresowe, jak i działanie terapeutyczne w zaburzeniach behawioralnych związanych z wiekiem (Panossian i Gerbarg 2016). Adaptogeny stymulują zarówno komórkowe jak i ogólnoustrojowe systemy obronne, aktywując wewnętrz- i zewnątrzkomórkowe ścieżki sygnalizacyjne. Dodatkowo wpływają na ekspresję białek i neuropeptydów aktywowanych stresem oraz zwiększają ich odporność na działanie stresu oksydacyjnego (Schriner i in. 2009). Dodatkowo w przypadku terapeutycznego działania na zaburzenia behawioralne wieku podeszłego, adaptogeny aktywując geny zaangażowane w walkę ze stresem, wpływają na szlaki sygnałowe tychże zaburzeń przez co znacznie je opóźniając (Calabrese i in. 2010). Podnoszą one także niespecyficzną odporność organizmu na długotrwały stres, co określane jest zasadą „przystosuj się i przeżyj”.

2. Opis zagadnienia

Rodzaj *Rhodiola* należy do rodziny Crassulaceae i obejmuje ponad 100 roślin wieloletnich tworzących bujne kępy, przez co nazywane są rozchodnikami. Jasnozielona, gruba łodyga, okrągła

w przekroju może osiągnąć nawet 40 cm długości. Po jej roztarciu uwalnia się charakterystyczny, przyjemny różany aromat. To dzięki niemu Rhodiola zawdzięcza swoją nazwę zwyczajową – różeniec.



Rys.1 Rhodiola rosea.



Rys.2 Rhodiola crenulata.

Liście rośliny są grube i mięsiste, zakończone na brzegach małymi ząbkami, z natury są sinzielone jednak jesienią zyskują pomarańczowo-czerwonawe zabarwienie. Drobne kwiaty zebrane są na szczytach pędów w kwiatostany, zwane podbaldachimami. *Rhodiola* należy do gatunków dwupiennych, występują tu zarówno kwiaty męskie jak i żeńskie. Wiele gatunków tego rodzaju, zwłaszcza *Rhodiola crenulata* i *Rhodiola rosea*, znajduje szerokie zastosowanie w tradycyjnej medycynie Europy i Azji. Dzieje się tak głównie ze względu na ich właściwości przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwgorączkowe, wzmacniające odporność i dodające energii. Biorąc pod uwagę również jej wartości odżywcze rodzaj *Rhodiola* stanowi doskonały składnik dla żywności funkcjonalnej, a dodatkowo uważa się, że rośliny z tego rodzaju mogą stanowić idealny składnik dermokosmetyków. Istnieją co prawda różnice w nawykach ludowego stosowania *Rhodioli*, ale ich przyczyn należy dopatrywać się głównie w rozmieszczeniu geograficznym poszczególnych gatunków. Rosną one głównie na dużych wysokościach oraz na zimnych obszarach półkuli północnej, w tym w Tybecie, na Dalekim Wschodzie, w krajach skandynawskich, na Islandii, a także na Alasce. Być może zatem niesprzyjające warunki rozwoju rośliny sprawiają, że ma ona dodatkowo silne działanie jako adaptogen przystosowujący do niekorzystnych, stresujących warunków organizm ludzki. Ponad to tak niedogodne warunki dla rozwoju roślin, a także uprzednie nadmierne eksploatowanie jej zasobów sprawiły, że rodzaj *Rhodiola* znalazł się na skraju wyginięcia, zaś gatunki *Rhodiola rosea* i *Rhodiola crenulata* nabrały szczególnej wartości ekonomicznej. Nic zatem dziwnego, że na rynku rośnie ilość zafałszowanych produktów, o niskiej zawartości substancji czynnych, a czasem nie zgodnych z pierwotną deklaracją składu. Istnieje zatem pilna potrzeba jak najdokładniejszej analizy specyficznych różnic w chemizmie, farmakologii i znaczeniu klinicznym między różnymi gatunkami *Rhodioli*, tak by w przyszłości potencjalne braki jednych surowców można było zastąpić innymi przedstawicielami z rodzaju *Rhodiola*. Dałoby to szansę na odbudowanie zasobów, a także na ochronę zagrożonych obszarów i zachowanie różnorodności genetycznej roślin. Nad rodzajem *Rhodiola* prowadzone były liczne badania naukowe i kliniczne, w dalszym ciągu jednak mechanizm jego działania jako adaptogenu wymaga dokładniejszego poznania. Dotychczas stwierdzono, że kilka związków aktywnych (salidrozyd, rozawina, triandrin, tyrozol) stymuluje mózg i zwiększa poziom stężenia neuroprzekaźników, takich jak noradrenalina, serotonina, acetylocholina i dopamina (Harmer i in. 2017). Najprawdopodobniej najstławniejszym gatunkiem *Rhodioli* jest *Rhodiola rosea*, zwana także różencem górskim, złotym korzeniem lub korzeniem arktycznym. *Rhodiola rosea* od wieków używana jest w medycynie ludowej Rosji i Skandynawii. Pierwsze doniesienia o jej leczniczych właściwościach pochodzą z wybitnego dzieła Dioskuridesa „De Materia Medica”. Została ona uznana za botaniczny adaptogen o działaniu znośącym zmęczenie, antystresowym i przeciwdepresyjnym (Panossian i Wikman 2009). Jednakże dopiero w 1969 roku radzieckie Ministerstwo Zdrowia jako pierwsze zarejestrowało i dopuściło do użytku medycznego ekstrakty pozyskane z *Rhodiola rosea*, inne kraje poszły tym samym śladem. Obecnie Europejska Agencja Leków dopuszcza wyciąg z *Rhodiola rosea* jako lek znośzący działanie stresu. W Azji w dalszym ciągu stosowana jest w postaci wyciągów wodnych i alkoholowych w celu eliminacji zmęczenia, poprawy aktywności fizycznej i łagodzenia chorób wysokościowych. Wzmianki o różencu można odnaleźć także w monografiach tybetańskich (datowanych na 1000 lat wstecz). *Rhodiola rosea* opisywana tam jest jako lek ludowy stosowany w przypadku krwiotłucia, zapalenia płuc i kaszlu (wszystkie te objawy są charakterystyczne dla ostrej choroby wysokogórskiej). O bogactwie rodzaju *Rhodiola* może świadczyć fakt, że prawie każdego roku Farmakopea Chińska dodaje nowy gatunek do spisu roślin leczniczych. Możemy napotkać tam opisy *Rhodiola kirilowii*, *Rhodiola algida*, *Rhodiola wallichiana* oraz najpopularniejszej *Rhodiola rosea* i *Rhodiola crenulata*. Odzwierciedla to złożoność rodzaju *Rhodiola*, a ponad to pozwala na dokładniejsze zbadanie mniej popularnych gatunków. Dzięki nowoczesnym badaniom farmakologicznym ujawniono wiele ich bioaktywności, między innymi działanie przeciwutleniające, immunomodulujące, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, neuroprotektoryjne, antystresowe i przeciwdepresyjne (Battistelli i in. 2005). Jeśli chodzi o chemizm ekstraktów z rodzaju *Rhodiola* to najlepiej poznane są związki występujące w *Rhodiola rosea* i *Rhodiola crenulata*. Wszystkie te związki podzielić można na odpowiednie podgrupy: acykliczne pochodne alkoholowe, pochodne benzylu i fenolu, kwas galusowy i jego pochodne, flawonoidy i ich glikozydy oraz pochodne nitrylu. Za charakterystyczne dla rodzaju

Rhodiola uważane są w szczególności tyrozol i jego pochodne (w tym salidrozydy) oraz kwas galusowy ze swoimi pochodnymi (Hongxun i in. 2019). Warto zwrócić uwagę właśnie na kwas galusowy, który jako aktywny polifenol przejawia potencjalne właściwości antyutleniające, a ponad to może stanowić idealną cząsteczkę bazową dla nowych leków.

3. Przegląd literatury

Wiele jest w literaturze opisów różnych bioaktywności ekstraktów roślin z rodzaju *Rhodiola*. Wśród nich dominuje działanie adaptogenne, immunomodulujące, przeciwutleniające, przeciwzapalne, ale zgłaszane są także właściwości przeciwcukrzycowe, przeciwnowotworowe, przeciwmęczyeniowe, co więcej większość z nich została przeanalizowana zarówno na modelach *in vitro*, *in vivo* oraz w trakcie badań klinicznych. Niestety metody pozyskiwania ekstraktów, czyli warunki ekstrakcji (czas i temperatura), rodzaj ekstrakcji i użyte rozpuszczalniki nie są ujednolicone, a badacze wciąż poszukują najlepszej techniki. Co więcej od jakości pozyskanego ekstraktu w dużej mierze zależy ilość substancji czynnej, a na ty z kolei opiera się identyfikacja działania terapeutycznego (Hongxun i in. 2019).

3.1 Działanie przeciwutleniające

Prawie połowa związków wyizolowana z rodzaju *Rhodiola* przejawia działanie antyoksydacyjne, wśród nich na szczególną uwagę zasługują tyrozol, salidrozyd, kwas galusowy oraz flawonoidy. Naukowcy badali aktywność przeciwutleniającą na różnych liniach komórkowych, między innymi na ludzkich erytrocytach (Hernandes-Santana i in. 2014). Co ciekawe nie zaobserwowano by poziomu ekspresji hem-oksygenazy-1 (czyli pierwsza linia obrony przeciwutleniającej) uległ zmianie pod wpływem ekstraktu z *Rhodiola rosea*. Przypuszcza się zatem, że przeciwdziałanie stresowi oksydacyjnemu odbywa się na drodze mechanizmu hormonalnego (Calcabrini i in. 2010).

3.2 Działanie antystresowe i przeciwdepresyjne

Wiadomo, że rośliny z rodzaju *Rhodiola* są bogate w adaptogeny, które mogą zapobiegać lub zmniejszać zaburzenia behawioralne wywoływane długotrwałym stresem. Należy wspomnieć, że dwa produkty adaptogenne pochodzące z *Rhodiola rosea*, a mianowicie SHR-5 oraz ADAPT-232 opracowane przez szwedzkich naukowców zostały poddane badaniom klinicznym. Pierwszy z nich, SHR-5, to standaryzowany ekstrakt zawierający w swoim składzie 1,7% salidrozydu i 4,5% całkowitej sumy rozawinów. Drugi natomiast jest kombinacją trzech oryginalnych wyciągów z *Rhodiola rosea* (w tym SHR-5) (Panossian i in. 2010). W przeciwieństwie do *Rhodiola rosea* nie ma dostatecznie wiarygodnych badań dotyczących adaptogennego działania *Rhodiola crenulata*. Chen wraz ze współpracownikami (Chen i in. 2009) wykazali, że u szczurów z depresją poddanych działaniu etanolowego ekstraktu z *Rhodiola rosea*, obserwowane jest działanie przeciwdepresyjne. Przypuszcza się, że dzieje się to na skutek podniesienia poziomu 5-hydrokсыtryptaminy (5-HT) oraz przez indukcję proliferacji nerwowych komórek macierzystych w hipokampie. W innym badaniu również etanolowego ekstraktu z *Rhodiola rosea* wykazano działanie przeciwłękowe (Cayer i in. 2013). Podsumowując, można stwierdzić, że *Rhodiola rosea* może selektywnie redukować stres oraz lęki z tego stresu wynikające.

3.3 Działanie immunomodulujące

Jako zasobne w adaptogeny, rośliny z rodzaju *Rhodiola* zostały uznane za wzmacniacze odporności, czyli immunomodulatory. W badaniu sprawdzono działanie 50% etanolowego ekstraktu *Rhodiola rosea* i *Rhodiola qudrifida*, obydwa prezentowały aktywność proliferacyjną badaną na mysich limfocytach pozyskiwanych ze śledziony. Na badaniach na szczurach wykazano także możliwość hamowania apoptozy limfocytów T grasicy w skutek działania 70% etanolowego ekstraktu *Rhodiola rosea* (Chou Lin i in. 2011). Ponad to salidrozyd wykazuje zdolność do stymulacji wzrostu wydzielania zarówno cytokin typu Th1 jak i interferonu gamma. Wykazano także, że zarówno wodny jak i etanolowy ekstrakt z *Rhodiola kirilowii* stymuluje rozrost i aktywność granulocytów (Skopir'Iska-Rojewska 2011).

3.4 Działanie aklimatyzujące

Rhodiola crenulata od dawna stosowana jest w celu łagodzenia reakcji organizmu narażonego na wpływ dużych wysokości. Medycyna ludowa to jedno, a wnikiwe badania laboratoryjne to drugie. W trakcie badań farmakologicznych testy ujawniły mechanizmy działania ekstraktów z roślin rodzaju *Rhodiola*. W kilku badaniach szczury Sprague-Dawley wystawiono na symulowaną wysokość 8000 m n.p.m. w komorze z panującą hipoksją na 9 godzin, wszystko by osiągnąć model wysokogórskiej choroby wysokościowej. Wykazano, że etanolowy ekstrakt z *Rhodiola crenulata* na skutek modulacji śródbłonkowej syntazy tlenu azotu może łagodzić objawy choroby górskiej (Hsu i in. 2017). Ponad to osłabione zostały także powikłania po obrzęku płuc równie często występującym na dużych wysokościach oraz odwrócono niedotlenienie komórek wywołane stresem oksydacyjnym

4. Podsumowanie

Rodzaj *Rhodiola* to perełka w królestwie roślin, popularna zarówno wśród zwykłych ludzi stosujących medycynę tradycyjną jak i wśród badaczy zgłębiających skład chemiczny i właściwości różnic. Zasadniczo badania kliniczne potwierdziły większość tradycyjnych zastosowań gatunków należących do rodzaju *Rhodiola*. Najpewniejsze i najrzetelniejsze dowody pochodzą z badań nad *Rhodiola rosea* i *Rhodiola crenulata*. *Rhodiola rosea* stosowana od dawna jako adaptogen coraz częściej wchodzi w skład leków i suplementów diety. Jest ona również cennym remedium działającym antystresowo i przeciwdepresyjnie. Rozkład geograficzny gatunków *Rhodiola rosea* i *Rhodiola crenulata* różni się od siebie, a więc i ich zastosowanie w medycynie ludowej jest odmienne. W odróżnieniu od tej pierwszej *Rhodiola crenulata* wykorzystywana jest jako środek ułatwiający uczenie, poprawiający sprawność fizyczną oraz znosi efekty niedotlenienia. Obydwie rośliny mogą być stosowane zamiennie, a ich działanie idealnie się uzupełnia. W dalszym ciągu istnieje ogromne pole dla nowych odkryć, choćby w kierunku działania przeciwnowotworowego ekstraktów. Choć ocena farmakologiczna ekstraktów została przeprowadzona zarówno na modelach zwierzęcych, jak i in vitro, jednak podstawowe mechanizmy molekularne nie są dokładnie poznane.

5. Literatura

- Battistelli M, De Sanctis R, De Bellis R i in. (2005) *Rhodiola Rosea* as antioxidant in red blood cells: ultrastructural and hemolytic behaviour. *European Journal of Histochemistry* 49(3): 243-254
- Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-Kostova AT i in. (2010) Cellular stress responses the hormesis paradigm and vitagenes novel target for therapeutic intervention in neurodegenerative disorders. *Antioxidants & Redox Signaling Journal* 13: 1763-1811
- Calabrini C, De Bellis R, Mancini U i in. (2010) *Rhodiola rosea* ability to enrich cellular antioxidant defences of cultured human keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* 302(3): 191-200
- Cayer C, Ahmed F, Filion V i in. (2013) Characterization of the anxiolytic activity of Nunavik *Rhodiola rosea*. *Planta Medica* 79(15): 1385-1391
- Chen QG, Zeng YS, Qu ZQ i in. (2009) The effects of *Rhodiola rosea* extract on 5-TH level, cell proliferation and quantity of neurons at cerebral hippocampus of depressive rats. *Phytotherapy* 16(9): 830-838
- Chou Lin SS, Chin LW, Chao PC i in. (2011) In vivo Th1 and Th2 cytokine modulation effects of *Rhodiola rosea* standardised solution and its major constituent, salidroside. *Phytotherapy Research* 25(11): 1604-1611
- Harmer CJ, Duman PJ, Cowen PJ (2017) How do antidepressants work? New perspectives for refining future treatment approaches. *Lancet Psychiatry* 39: 112-123
- Hernandez-Santana A, Perez-Lopez V, Zubeldia JM i in (2014) A *Rhodiola rosea* root extract protects skeletal muscle cells against chemically induced oxidative stress by modulating heat shock protein 70 (HSP70) expression. *Phytotherapy Research* 28(4): 623-628

- Hongxun T, Xu W, Jiliang C i in. (2019) *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study. *Medicinal Research Reviews* 39: 1779-1850
- Hsu SW, Chang TC, Wu YK i in. (2017) *Rhodiola crenulata* extract counteracts the effect of hypobaric hypoxia in rat heart via redirection of the nitric oxide and arginase 1 pathway. *BMC Complementary Medicine and Therapy* 17(1): 29
- Lee SY, Li MH, Shi LS i in. (2013) *Rhodiola crenulata* extract alleviates hypoxic pulmonary edema in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 718739
- Panossian A, Gerbarg P (2016) Potential use of plant adaptogens in age related disorders. In Lavretsky H, Sajatovic M, Reynolds III CF, (Eds.), *Complementary, Alternative, and Integrative Interventions in Mental Health and Aging*. Oxford University Press, New York 197-211
- Panossian A, Wikman G (2009) Evidence-based efficacy of adaptogens in fatigue, and molecular mechanisms related to their stress-protective activity. *Current Clinical Pharmacology* 4(3): 198-219
- Panossian A, Wikman G, Sarris J (2010) *Rosenroot (Rhodiola rosea)*: traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine* 17(7): 481-493
- Schriner SE, Avanesian A, Liu Y i in. (2009) Protection of human cultured cells against oxidative stress by *Rhodiola rosea* without activation of antioxidant defenses. *Free Radical Biology & Medicine Journal* 47: 557-584
- Skopir'Iska-Rojewska E (2008) The effect of *Rhodiola quadrifida* extracts on cellular immunity in mice and rats. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 11(2): 105-111

9. Ocena efektywności nawadniania i nawożenia sadu gruszowego na glebie lekkiej

Evaluation of irrigation and pear orchard efficiency on light soil

Katarzyna Wójcik, Treder Waldemar, Wójcik Paweł

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Waldemar Treder

Katarzyna Wójcik: Katarzyna.Wojcik@inhort.pl

Słowa kluczowe: gruszka, składniki pokarmowe, fertygacja, azot, potas

Streszczenie

Grusza jest gatunkiem dość trudnym w uprawie, ze względu na wysokie wymagania żywieniowe, klimatyczne i glebowe. W warunkach klimatycznych naszego kraju, gdzie w ostatnich latach zaobserwowaliśmy zdecydowane ocieplenie klimatu istnieje, konieczność nawadniania upraw sadowniczych oraz odpowiedniego nawożenia sadów w celu osiągnięcia wysokich plonów dobrej jakości owoców. W wyniku prowadzonych doświadczeń największe plony odnotowano na poletkach nawadnianych i jednocześnie zasilanych posypowo N i K, a także na poletkach z fertygacją. Najmniejsze owoce otrzymano z poletek kontrolnych – nienawadnianych. Liście gruszy nienawadnianych i jednocześnie zasilanych doglebowo N i K zawierały najmniej azotu, fosforu i potasu.

Uzyskane wyniki wskazują na konieczność nawadniania intensywnych sadów gruszowych. Wyniki oceny stanu odżywienia roślin w zależności od zastosowanego nawożenia wskazują na konieczność opracowania specjalnego programu nawożeniowego dla intensywnych nasadzeń gruszy.

1. Wprowadzenie

Grusza (*Pyrus communis* L.) to gatunek, który dotychczas nie odgrywał znaczącej roli w polskim sadownictwie. Jednak ze względu na atrakcyjną cenę owoców i wzrastający popyt powinniśmy bardziej zainteresować się jej produkcją. Grusza należy do rodzaju drzew z rodziny różowatych. Jest drzewem owocowym uprawianym w całej Europie, zaś jej największe plantacje występują we Francji i Belgii. Powierzchnia upraw gruszy zajmuje w Polsce około 10 tys. ha, co stanowi jedynie 3% upraw sadowniczych ogółem (GUS 2017). Światowa produkcja gruszek wynosi około 24 milionów ton.

Owoce gruszy są popularne dzięki swojemu słodkiemu i orzeźwiającemu miąższowi oraz wysokiej zawartości składników odżywczych. Zawierają wit. A, B₁, B₂, B₆, C i PP oraz składniki mineralne takie jak: potas, fosfor, wapń, magnez, sód, żelazo, bor oraz miedź. Ze względu na składniki odżywcze gruszek poleca się je stosować jako składnik zdrowej diety (Wójcik 2014).

Zabiegiem agrotechnicznym wpływającym zarówno na produktywność roślin, jak i jakość plonu jest nawożenie. Szacuje się, że w warunkach glebowo-klimatycznych Polski udział nawożenia w produkcji roślin wynosi 40-50%. Jednocześnie niewłaściwe stosowanie nawozów obniża żyzność gleby przez jej zakwaszenie, zachwianie równowagi jonowej między składnikami, ograniczenie aktywności mikrobiologicznej, wprowadzenie szkodliwych pierwiastków oraz indukowanie zasolenia. Podstawowym celem nawożenia nie powinno być uzyskanie maksymalnych plonów, lecz takich, przy których zapewniona jest opłacalność produkcji oraz wysoka jakość plonu z jednocześnie minimalnym obciążeniem środowiska naturalnego. Dodatkowym celem nawożenia jest polepszenie lub podtrzymanie żyzności gleby, co umożliwi uzyskanie wysokich i stabilnych plonów przez długi czas. Nawożenie, które realizuje powyższe cele jest nawożeniem zrównoważonym. W warunkach glebowo-klimatycznych Polski nawożenie jednym lub nawet dwoma składnikami w większości przypadków nie daje dobrych efektów produkcyjnych, gdyż pozostałe, niezbędne dla roślin składniki, na ogół są w glebie ale w niewystarczających ilościach. W konsekwencji prowadzi to do ograniczenia produktywności roślin lub obniżenia jakości plonu. Dlatego też zabiegiem dodatkowym, ale jednocześnie koniecznym w celu uzupełnienia brakujących składników pokarmowych jest

zastosowanie fertygacji podawanej przez system kroplowy (Wójcik 2014). Grusza jest gatunkiem trudnym w uprawie ze względu na duże wymagania klimatyczne. Jej drzewa są mniej wytrzymałe na mróz niż jabłonie, a kwiaty są częściej uszkodzane przez przymrozki, ze względu na wcześniejsze kwitnienie. Gatunek ten ma również duże wymagania glebowe oraz pokarmowe (Sosna 2000). Dlatego też uprawa gruszy sprawia sadownikom wiele kłopotów zwłaszcza jeśli chodzi o uzyskanie stabilnych, wysokich plonów i wysokiej jakości owoców. Na rozwój i plonowanie gruszy negatywnie wpływa zwłaszcza niedostatek potasu, odpowiadający za jakość pąków kwiatowych a przez to i plonowanie. Potas(K) jest również bardzo ważnym składnikiem odżywczym, jego dostępność pozytywnie wpływa nie tylko na wielkość plonu ale także na: jędrność, kolor skóry, kwasowość soczystość i aromat owoców (van Arkel 2007). Przy niewielkim niedoborze potasu również liście drzew są małych rozmiarów. Przy większych niedoborach tego pierwiastka na liściach tworzą się chlorotyczne plamy. W krótkim czasie chloroza liści przechodzi w nekrozę. Również pędy z małą zawartością potasu są krótkie, cienkie oraz podatne na przemarzanie w okresie zimy. Potas wpływa także bezpośrednio na gospodarkę wodną w roślinie, aktywację enzymów oraz odporność rośliny na stresy (Jadczuk-Tobiasz i Zygmuntowska 2008). Zawartość potasu wpływa także na ich przechowywanie. Wysokie dawki potasu mają co prawda wpływ na poprawę smaku owoców, ale w niektórych przypadkach mogą pogorszyć ich wartość przechowalniczą (Jadczuk 2004). Potas jest szczególnie dobrze pobierany w warunkach wysokiej temperatury powietrza i wilgotności gleby. Dlatego na nawożenie potasem należy szczególnie zwracać uwagę w sadach nawadnianych, gdzie zazwyczaj należy zwiększyć dawki tego składnika (Brunetto et al. 2015). Innym bardzo ważnym składnikiem pokarmowym w uprawie gruszy jest azot (N). Zastosowanie odpowiedniej dawki nawożeniowej azotem (N) w uprawie gruszy ma na celu osiągnięcie optymalnej siły wzrostu drzew oraz wysokości i jakości plonowania (Botelho et al. 2010; Ikinci et al. 2014). Optymalne dawki azotu pozwala na utrzymanie proporcji pomiędzy wzrostem wegetatywnym a plonowaniem. Nadmierne nawożenie azotowe pogarsza jakość owoców a szczególnie kolor ich skórki i wartość przechowalniczą. Rośliny przenawożone N później wchodzi w okres owocowania. Pędy późno kończą swój wzrost, zwiększając ryzyko ich przemarznięcia w okresie zimowym. Liście są duże, grube i ciemnozielone. Są podatne na wiele chorób grzybowych oraz chętnie zasiedlane przez szkodniki (głównie mszyce i przędziorki). Przy drastycznym przenawożeniu N wierzchołki pędów wraz z najmłodszymi liśćmi zasychają. Owoce są słabo wybarwione, miękkie, mało smaczne, podatne na pękanie oraz wykazują małą zdolność przechowalniczą i trwałość w obrocie handlowym. Optymalna dostępność azotu pod koniec spoczynku zimowego pozwala na szybki rozwój liści, który zapewnia asymilację nowych owoców i wzrost pędów. Niedobory azotu w czasie sezonu wegetacyjnego mogą jednak istotnie obniżyć plon m.in. poprzez spowodowanie drobnienia owoców. Według Tagliaviniego i in.(1997) wzrost wiosenny gruszek zależy od azotu przechowanego w organach trwałych takich jak korzenie, pień, gałęzie i gałązki. Grusze na glebach o niskiej dostępności azotu wykazują jaśniejszą barwę liści, zmniejszona zostaje fotosynteza oraz odnotowujemy niższą wydajność i mniejszy rozmiar owoców. Przy dużym niedoborze azotu dochodzi również do zahamowania wzrostu pędów, słabego wiązania kwiatów i owoców (Wójcik 2014). Wysokie dawki azotu zapewniają lepszą barwę liści, zwiększają średnicę owoców oraz zaspokajają zapotrzebowanie roślin na składniki odżywcze (Sete et al. 2019). Dlatego tak ważnym zagadnieniem jest umiejętność obliczenia odpowiedniej dawki nawożeniowej a w konsekwencji opracowanie odpowiedniego programu nawożeniowego. Na pobieranie składników mineralnych przez rośliny istotny wpływ ma nie tylko ich zawartość w glebie, ale także przebieg warunków atmosferycznych. Szczególnie ważnym parametrem jest temperatura powietrza i wielkość opadów. W naszych warunkach klimatycznych czynnikiem istotnie ograniczającym wysokość i jakość plonu gruszy jest susza glebowa. W ważnych rejonach sadowniczych położonych w środkowej, zachodniej i południowo-zachodniej Polsce, niedobory opadów przeciętnie wynoszą od 120 do 180 mm rocznie (Treder i in. 2006). W nowoczesnym sadzie, przy tak zmiennych warunkach klimatycznych, nie uda się uzyskać plonowania na pożądanym poziomie bez stosowania nawadniania.

Grusza należy do gatunku roślin wrażliwych na suszę. Według Rzekanowskiego (2009) zaliczamy ją do roślin sadowniczych charakteryzujących się stosunkowo wysokimi potrzebami wodnymi. Jej zapotrzebowanie na wodę zwiększa się w miarę wydłużania okresu wzrostu

i dojrzewania owoców (Rzekanowski 1998). Zastosowanie odpowiedniej dawki nawodnieniowej powinno zależeć nie tylko od pogody, ale także od wieku drzew, ich kondycji i wysokości plonowania. W większości przypadków niski plon gruszy związany jest z trudnością doboru odmian, podkładek, a także z brakiem wiedzy na temat najlepszego zarządzania praktyką która ogranicza występowanie szkodników i chorób (Van Arkel 2007). Krótkotrwały niedobór wody w okresie intensywnego wzrostu drzew może doprowadzić do zahamowania wzrostu pędów drzew, a także prowadzić do znacznego ograniczenia wielkości i jakości plonu (Treder 2011). Niedobór wody czy też ograniczenie jej dostępności zakłóca wszystkie fizjologiczne procesy zachodzące w roślinie, co prowadzi do braku zawiązywania pąków kwiatowych, a w konsekwencji do uzyskania źle wykształconych owoców i niskiego plonu.

Podczas zastosowania nawadniania w zwilżanej strefie gleby intensywnie rozwijają się korzenie, pobierane są z tego obszaru składniki pokarmowe. W miejscach, gdzie gleba jest sucha, pobieranie jest znacznie ograniczone. Nawadniając, rozcieńczamy stężenie makro i mikroelementów zawarte w roztworze glebowym, co pozwala roślinom na intensywne ich pobieranie, konsekwencją czego jest ubytek składników mineralnych z tej strefy. Trudno jest uzupełnić składniki tylko w strefie, gdzie dociera woda. Jedynym sposobem jest podawanie składników mineralnych przez system nawodnieniowy - fertygacja. Rozpuszczone w wodzie nawozy docierają bezpośrednio do aktywnej strefy korzeniowej roślin uzupełniając niedobory składników mineralnych w glebie. Nawożenie wraz z nawadnianiem charakteryzuje się wysoką efektywnością wykorzystania nawozów co pozwala na ograniczenie ich dawek (Dasberg et al. 1988; Klein et al. 1999). Długotrwałe intensywne nawadnianie może powodować lokalne obniżenie składników mineralnych w glebie. Dotyczy to szczególnie potasu i azotu. Dzięki podwyższonej wilgotności gleby w strefach zwilżanych przez system nawodnieniowy składniki te są intensywnie pobierane, a w przypadku azotu ($N-NO_3$) dochodzi jeszcze wymywanie tego składnika w głąb gleby. Jeżeli nie uzupełniamy tych składników w glebie, to rośliny zaczynają reagować obniżeniem dynamiki wzrostu i gorszym plonowaniem. Dlatego w intensywnej produkcji sadowniczej ten sposób nawożenia nabiera coraz większego znaczenia.

Celem badawczym prowadzonego doświadczenia była ocena skuteczności nawadniania oraz różnych sposobów nawożenia na wzrost i plonowanie gruszy.

2. Materiał i metody

Doświadczenie prowadzone było w Sadzie Doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach. Obiektem badawczym były grusze odmiany „Konferencja” szczepione na Pigwie C, posadzone wiosną 2013 roku w rozstawie 3 X 2 m. W doświadczeniu tym zastosowano 6 kombinacji:

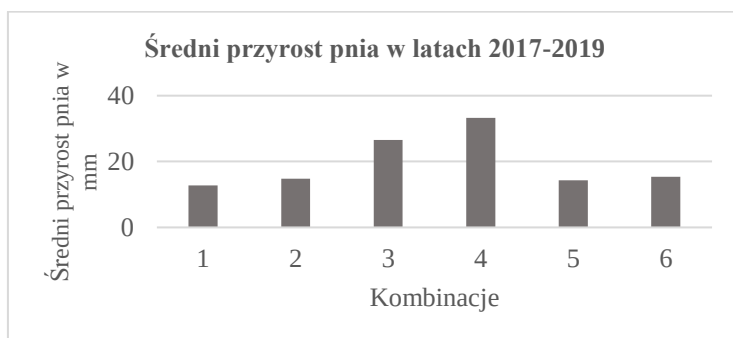
- a) 1 - bez nawadniania + nawożenie posypowe nawożenie N i K;
- b) 2 - bez nawadniania + posypowe nawożenie N i K + nawożenie dolistne;
- c) 3 – nawadnianie + posypowe nawożenie N i K;
- d) 4 – nawadnianie + posypowe nawożenie N i K + nawożenie dolistne;
- e) 5 – nawadnianie + posypowe nawożenie N i K w 1/3 dawki;
- f) 6 – nawadnianie + nawożenie NK przez system nawodnieniowy(fertygacja).

W czasie trwania doświadczenia dokonano pomiaru plonu w kg/drzewo w zastosowanych kombinacjach, a także oceny średniej masy owocu wyliczonej na podstawie losowo zebranej skrzynki owoców z każdej kombinacji. Na 20 owocach z każdej kombinacji dokonano pomiarów jędrności miąższu. Oceniono również zawartość składników mineralnych w liściach (suchej masy) w poszczególnych kombinacjach. Ponadto dokonano pomiaru siły wzrostu drzew poprzez pomiaru obwodu pni na wysokości 30 cm od powierzchni gleby.

3. Wyniki i wnioski

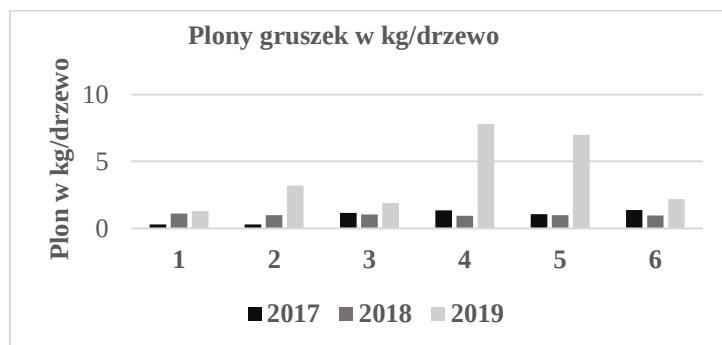
W trakcie prowadzonych badań przeprowadzono ocenę wzrostu wegetatywnego drzew, zawartości składników mineralnych w liściach oraz ocenę plonowania. Stwierdzono, iż zastosowanie nawadniania kropłowego istotnie wpłynęło na siłę wzrostu drzew wyrażoną za pomocą średnicy pnia

(mm). Wyniki potwierdzające tę tezę, w badaniach nad jabłoniami uzyskała również Tryngiel-Gać A. i in. (2015).



Rys.1. Średni przyrost pnia (mm) w poszczególnych kombinacjach w latach 2017-2019.

Najwięcej przyrosły drzewa gruszy w kombinacjach, gdzie zastosowane było nawadnianie i nawożenie N i K – kombinacja 3 i 4 (Rys.1). Średni przyrost w tych kombinacjach wynosił od 26 do 33 mm, natomiast w kombinacjach nie nawadnianych - kontrolnych (1,2), ale nawożonych otrzymano zdecydowanie niższy średni przyrost na drzewo - wyniósł on od 12 do 14 mm.



Rys.2. Plonowanie gruszek w kg/drzewo w latach 2017-2019.

Plony z drzew w poszczególnych kombinacjach były niewielkie i wahały się od 1,6 do 7,8 kg na drzewo. Największe zbiory uzyskano z drzew nawadnianych i zasilanych jednocześnie posypowo N i K i dolistnie nawozem wieloskładnikowym - kombinacja 4,5 (Rys.2). Podobnie dodatni wpływ nawożenia potasem na wielkość plonu odnotował w swych badaniach Greenham (1965), który stwierdził, że nawożenie tym składnikiem wpłynęło na wzrost plonu roślin.

Tab.1. Średnia masa owocu (g) w poszczególnych kombinacjach.

Kombinacja	Rok		
	2017	2018	2019
1	175	90	90
2	206	123	123
3	212	131	121
4	221	138	138
5	216	141	141
6	215	151	151

Najmniejsze owoce o masie ok. 90 g uzyskano z poletek nienawadnianych a największe z poletek, gdzie stosowana była fertygacja ok. 215g (Tab.1). Największe owoce zebrano w 2017 roku,

ich masa wynosiła od 175- 221g/owoc. Również Klein i in.(1999) osiągnął wyższe plony podczas zbiorów stosując fertygację. Nie stwierdzono różnic między kombinacjami w jędrności owoców oraz zawartości ekstraktu w czasie zbioru (Tab.2)

Tab.2. Ekstrakt (%)i jędrność (kG) owoców w poszczególnych kombinacjach i latach zbioru.

Kombinacje	Rok					
	2017		2018		2019	
	Ekstrakt (%)	Jędrność (kG)	Ekstrakt (%)	Jędrność (kG)	Ekstrakt (%)	Jędrność(k G)
1	12,4	6,51	14,8	6,41	13,4	6,15
2	12,5	6,58	14,7	6,71	13,5	6,31
3	12,5	6,50	14,7	6,35	13,1	6,22
4	12,6	6,61	14,0	6,63	12,9	6,12
5	12,8	6,58	14,1	6,41	12,9	6,01
6	12,6	5,47	13,9	6,23	12,9	5,91

W trakcie oceny zawartości składników mineralnych w suchej masie liści gruszy nienawadnianych i jednocześnie zasilanych doglebowo N i K stwierdzono, że zawierały one najmniej azotu, fosforu i potasu. Największą zawartość składników mineralnych zanotowano na poletkach fertygowanych N i K, a także nawadnianych i zasilanych doglebowo N i K oraz dolistnie nawozem wieloskładnikowym (Tab. 3,4,5)

Tab.3. Zawartość składników mineralnych w liściach gruszy w 2017 roku (s.m%)

Kombinacje	N (%)	P (%)	K (%)	Mg (%)	Ca (%)
1	2,10	0,10	1,41	0,31	1,87
2	2,23	0,13	1,68	0,37	1,95
3	2,18	0,11	1,56	0,30	1,98
4	2,24	0,13	1,68	0,38	1,87
5	2,05	0,12	1,60	0,28	1,90
6	2,39	0,11	1,72	0,29	1,83

Badania Dasberga i in.(1988), informują nas, że fertygacja ma na celu zwiększenie efektywności wykorzystania przez roślinę składników pokarmowych a zwłaszcza azotu, który bardzo szybko przemieszcza się w głąb systemu korzeniowego i jest w najlepszy sposób wykorzystywany przez rośliny. W przeprowadzonym przez nas doświadczeniu w suchej masie liści zanotowano największy % udział azotu (Tab. 3,4,5).

Tab.4.Zawartość składników mineralnych w liściach gruszy w 2018 roku (s.m%)

Kombinacje	N (%)	P (%)	K (%)	Mg (%)	Ca (%)
1	2,15	0,12	1,55	0,32	1,82
2	2,28	0,14	1,71	0,38	1,99
3	2,26	0,13	1,65	0,30	1,99
4	2,31	0,15	1,79	0,38	1,87
5	2,12	0,13	1,64	0,31	1,92
6	2,39	0,12	1,75	0,30	1,85

Również Treder (2003),podaje, że najlepsze efekty produkcyjne uzyskujemy przy łącznym stosowaniu fertygacji wraz z nawożeniem posypowym.

Tab.5. Zawartość składników mineralnych w liściach gruszy w 2019 roku (s.m%).

Kombinacje	N (%)	P (%)	K (%)	Mg (%)	Ca (%)
1	1,90	0,16	0,77	0,30	2,15
2	2,07	0,19	0,93	0,35	2,18
3	1,97	0,19	1,06	0,29	2,19
4	2,05	0,20	1,20	0,35	2,15
5	1,82	0,17	1,00	0,29	2,13
6	2,04	0,20	1,19	0,26	2,14

4. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono konieczność zastosowania nawadniania w produkcji intensywnych sadów gruszkowych na glebie lekkiej w celu uzyskania wysokich plonów dobrej jakości owoców. Uzyskanie opłacalności produkcji gruszek jest tylko możliwe dzięki zastosowaniu nawadniania oraz intensywnego nawożenia azotem i potasem. Pozytywne efekty uzyskano także dzięki nawożeniu poza korzeniowemu oraz fertygacji. Zaletą tego nawożenia jest możliwość dostarczenia rozpuszczonych składników pokarmowych do całej warstwy gleby penetrowanej przez główną masę korzeni roślin. Ta forma nawożenia stwarza również warunki do precyzyjnego dokarmienia roślin w określonych fazach rozwojowych, nadaje się do dolistnego stosowania nawozów (np. azotowych) i umożliwia dzielenie nawozów na mniejsze jednorazowe dawki. Dla zintensyfikowania produkcji gruszek koniecznym jest opracowanie odpowiedniego programu nawożenia i fertygacji.

5. Literatura

- Botelho RV, Muller MML, Basso C et al. (2010) Estado nutricional de diferentes cultivares de pereira nas condições edafoclimáticas de Guarapuava-PR. *Rev. Bras. Frutic.* 32:884-891.
- Brunetto G, Nava G, Ambrosini VG et al. (2015) The pear tree response to phosphorus and potassium fertilization. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal-SP* 37(2):507-516.
- Dasberg S, Bar-Akiva A, Spazisky S et al. (1988) Fertigation versus broadcasting in an orange grove. *Fert. Res.* 15:147-154.
- GUS. Rocznik statystyczny 2017:257-260.
- Greenham DW (1965) A long-term manurial trials on dessert apple trees. *J. Hort. Sci.* 40: 213-235.
- Ikinci A, Bolat I, Ercisli S et al. (2014) Influence of rootstocks on growth yield, fruit quality and leaf mineral element contents of pear cv. „Santa Maria” in semi-arid conditions. *Biol. Res.* 47, 1-8.
- Jadczuk E (2004) Racjonalne nawożenie sadów potasem na podstawie badań SGGW w Warszawie. IX Ogólnopolskie Spotkanie Sadowników w Grójcu: 110-117.
- Jadczuk-Tobiasz E, Zygmuntowska K (2008) Reakcja gruszy na zróżnicowanie nawożenia potasem w zależności od odmiany, podkładki i nawadniania. „Czynniki wpływające na plonowanie i jakość owoców roślin sadowniczych” 5: 147-168.
- Klein I, Meimon A, Skedi D (1999) Drip nitrogen, phosphorus and potassium fertigation of „Apadona” pear. *J. Plant Nutr.* 22: 489-499.
- Rzekanowski C (2009) Kształtowanie się potrzeb nawodnieniowych roślin sadowniczych w Polsce. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* 3:19-27.
- Rzekanowski C (1998) Wpływ nawadniania kroplowego na plonowanie trzech odmian jabłoni. Materiały II Krajowej Konferencji Naukowo-Technicznej SGGW-AR, s. 142–149.
- Sosna I (2000) Wpływ dwóch klonów pigwy oraz dwóch sposobów prowadzenia drzew na wzrost i owocowanie kilku odmian gruszy. *Zesz. Nauk. Inst. Sadow. Kwiac.* 8:209-216.

- Sete PB, Comin JJ, Ciotta MN et al. (2019) Nitrogen fertilization affects yield and Fruit quality in pear. *Scientia Horticulturae* 258:1-7.
- Tagliavini M, Quartieri M, Millard P (1997) Remobilised nitrogen and root uptake of nitrate for leaf growth, flowers and developing fruits of pear (*P. communis*) trees. *Plant and Soil*, Dordrecht, 195:137-142.
- Treder W, Wójcik K, Tryngiel-Gać A i in. (2011) Rozwój nawodnień roślin sadowniczych w świetle badań ankietowych. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* 5: 61-69.
- Treder W, Pacholak E (2006) Nawadnianie roślin sadowniczych. Nawadnianie roślin(pr. Zbior. Pod red. S. Karczmarczyka i L. Nowaka), Poznań:PWRiL, 333-365.
- Treder W (2003) Wpływ fertygacji nawozami azotowymi i wieloskładnikowymi na zmiany chemiczne gleby oraz wzrost i owocowanie jabłoni. *Monografie i Rozprawy, ISK, Skierniewice*.
- Tryngiel-Gać A, Treder W, Wójcik K i in. (2015) Efektywność nawadniania jabłoni w sadzie replantowanym. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* II/1: 257-267.
- Wójcik P (2014) Zrównoważone nawożenie roślin sadowniczych. *IUNG* s. 5-11.
- Van Arkel P (2007) Nawożenie jabłoni i gruszy w Holandii. *XXVII Seminarium sadownicze, Limanowa*: 61-64.

10. Wpływ biopreparatów na uprawę roślin przemysłowych

Biofertilizers impact on the cultivation of industrial plants

Katarzyna Zamłyńska⁽¹⁾, Mikołaj Feculak⁽¹⁾, Katarzyna Suśniak⁽¹⁾, Dominika Kidaj⁽¹⁾, Iwona Komaniecka⁽¹⁾, Anna Sroka-Bartnicka^(1, 2)

⁽¹⁾ Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

⁽²⁾ Zakład Biofarmacji, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Katarzyna Zamłyńska: k.zamlynska@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: rizobium, czynniki Nod, bakterie promujące wzrost roślin (PGPR)

Streszczenie

Wzrost konsumpcji owoców i warzyw pochodzących z upraw ekologicznych w ostatnich latach spowodował, że rolnicy coraz częściej wykorzystują biopreparaty w produkcji roślinnej. W Polsce dostępnych jest wiele preparatów zawierających wyselekcjonowane mikroorganizmy, bądź substancje pochodzenia naturalnego wywierające korzystny wpływ na wzrost i jakość plonów. Stosowanie biopreparatów w uprawach pozwala na znaczne ograniczenie sztucznego nawożenia oraz stosowania oprysków chemicznych. Aspekt środowiskowy, ekonomiczny (związany z niższymi kosztami produkcji substancji naturalnych) i społeczny (bezpieczeństwo dla użytkowników i konsumentów) powoduje rosnący popyt na tego typu preparaty. W związku z tym naukowcy poszukują nowych naturalnych środków stymulujących wegetację roślin.

Celem poniższego artykułu jest przybliżenie zagadnień dotyczących biopreparatów zawierających wyselekcjonowane szczepy bakterii symbiotycznych (rizobiów) oraz bakterii promujących wzrost roślin (PGPR). Przedstawiono także doniesienia na temat nowoczesnego bionawozu opartego na izolowanych rizobiowych czynnikach Nod.

1. Wprowadzenie

Stosowanie sztucznych nawozów w uprawach roślin jest podstawowym zabiegiem agrotechnicznym wpływającym pozytywnie na wydajność upraw i jakość plonów. Jednocześnie niewłaściwe ich wykorzystanie obniża żyzność gleby, powoduje eutrofizację wód powierzchniowych i zanieczyszczenie wód gruntowych oraz potęguje efekt cieplarniany (Wójcik i in. 2014). Negatywne oddziaływanie nawozów sztucznych na środowisko oraz ich wysokie ceny powodują, że rolnicy coraz częściej sięgają po biopreparaty.

Biopreparaty definiuje się jako preparaty pochodzenia naturalnego, zawierające wyselekcjonowane mikroorganizmy, materię organiczną lub aktywne związki organiczne. Celem biopreparatów jest stymulacja wzrostu i rozwoju roślin uprawnych, ich ochrona przed patogenami oraz wzbogacanie gleb w składniki odżywcze. W zależności od składu biopreparatów wyróżnia się ich trzy typy: bakteryjne, bakteryjno-enzymatyczne i enzymatyczne. Preparaty bakteryjne dodatkowo można podzielić na zawierające pojedyncze szczepy mikroorganizmów (tzw. jednoskładnikowe) oraz na wieloszczepowe (tzw. konsorcja) mające w składzie różne mikroorganizmy. Konsorcja wykazują różnorodne właściwości i charakteryzują się szerokim spektrum działania (Grzyb i in. 2019). W zależności od mechanizmu działania wśród biopreparatów wyróżnia się biopestycydy oraz bionawozy. Biopestycydy stanowi grupa środków ochrony roślin zawierających m.in. mikroorganizmy (wirusy, bakterie i grzyby) oraz nicienie. Biopestycydy dzielą się na bioherbicydy, biobakteriocydy, biofungicydy, bioinsektocydy i bionematocydy. Do drobnoustrojów będących składnikami czynnymi tego typu biopreparatów należą głównie bakterie z rodzajów *Bacillus* i *Pseudomonas* oraz grzyby: *Trichoderma*, *Beauveria*, *Coniothyrium*, *Matharhizium*, *Pythium* (Martyniuk 2012). Do grupy biopestycydów zalicza się także substancje biologicznie czynne, pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego (olejki, saponiny, kwasy organiczne, chitozan), regulatory wzrostu roślin oraz semiozwiązki (feromony, atraktanty i repelenty) (Tomalak 2010; Martyniuk

2012). Przykładem jest biopreparat zawierający chitozan. Stosuje się go w celu ograniczenia rozwoju bakterii i grzybów porażających pomidory oraz rośliny ozdobne (Pięta i in. 2004; Saniewska 2002).

Bionawozy definiuje się jako biopreparaty, zawierające wyselekcjonowane mikroorganizmy, które poprzez interakcje w ryzosferze powodują poprawę jakości gleb oraz wzrost przyswajania trudnodostępnych składników pokarmowych przez rośliny (Vessey 2003). Za bionawozy uznawane są także preparaty zawierające materię organiczną oraz aktywne związki organiczne (np. aminokwasy, witaminy, enzymy, hormony roślinne, makro- i mikroelementy), które stymulują wzrost i rozwój roślin uprawnych. Jako bionawozy wykorzystywane są m.in. bakterie z rodzajów: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*. W Polsce popularnym bionawozem jest preparat pochodzenia japońskiego - tzw. Efektywne Mikroorganizmy (EM) i jego różne modyfikacje (EM1, EM5, Ema). Preparat ten zawiera m.in. bakterie kwasu mlekowego i fotosyntetyczne, drożdże, promieniowce oraz grzyby (Mayer i in. 2010). Według producenta EM poprawia żyzność gleb oraz odporność i wzrost roślin uprawnych. Jednak faktyczna skuteczność EM poddawana jest ciągłej dyskusji (Martyniuk 2011).

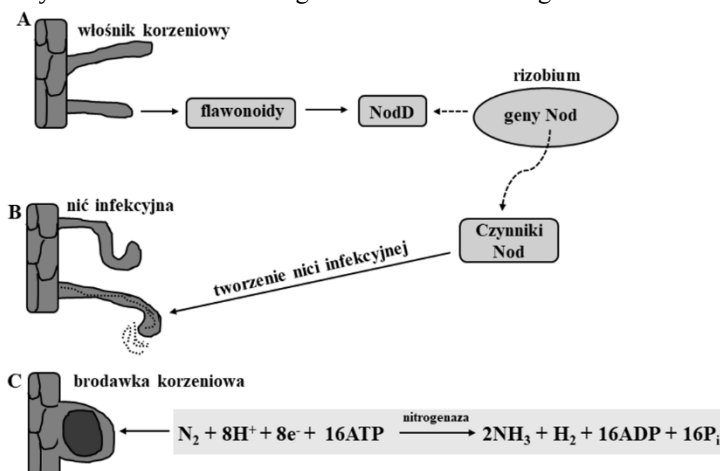
Głównym celem stosowania biopreparatów jest dostarczenie roślinom niezbędnych substancji, naturalnie przez nie syntetyzowanych w wielu procesach biochemicznych oraz zabezpieczenie systemu korzeniowego przed infekcjami. Dzięki bionawożeniu roślina oszczędza energię, która może być wykorzystywana do zachodzących w niej innych procesów biochemicznych. W ostatnich latach opracowano wiele biopreparatów zawierających zliofilizowane wyselekcjonowane szczepy bakterii symbiotycznych (rizobiów), które wchodząc w układy symbiotyczne z roślinami bobowatymi, pozwalają na ograniczenie sztucznego nawożenia azotowego. Obecnie wiele prac naukowych skupia się na opracowaniu coraz skuteczniejszych bionawozów zawierających rizobakterie promujące wzrost roślin (PGPR, ang. plant growth promoting rhizobacteria), bądź bionawozów opartych o substancje biologicznie czynne pochodzenia naturalnego. Obiecujące wyniki pokazują prace badawcze nad nowoczesnym biopreparatem opartym na izolowanych rizobiowych czynnikach Nod.

2. Bionawozy oparte na szczepionkach rizobiowych

Symbioza bakterii glebowych określanych jako „rizobia” z roślinami z rodziny bobowate (*Fabaceae*) jest jednym z kluczowych procesów warunkujących obieg azotu w przyrodzie. Interakcje rizobiów z roślinnym gospodarzem prowadzą do wytworzenia brodawek korzeniowych lub łodygowych, wewnątrz których bakterie redukują azot atmosferyczny do amoniaku, który staje się źródłem azotu dla roślin (Rys. 1). Dzięki symbiozie rośliny mogą rosnąć nawet na glebach o ograniczonej dostępności tego pierwiastka. Wśród roślin bobowatych znajdują się liczne rośliny wykorzystywane do produkcji wysokobiałkowej żywności i pasz, np. groch, fasola, soja, łubin, konieczyna, bób. Z tego powodu szczepionki rizobiowe należą do biopreparatów szeroko stosowanych w praktyce rolniczej na całym świecie, także w Polsce. Technologia wytwarzania tych szczepionek obejmuje kilka etapów tj.: zgromadzenie kolekcji różnych szczepów drobnoustrojów; kontrolowanie czystości i jakości (efektywności symbiotycznej) tych szczepów; wieloetapowe rozmnażanie mikroorganizmów i kontrolowanie czystości uzyskiwanej biomasy; przygotowywanie jałowego nośnika (drobno zmielony torf lub węgiel brunatny); mieszanie biomasy bakterii z nośnikiem i konfekcjonowanie szczepionki (Martyniuk 2009). Szczepionki zawierające rizobia stosowane są najczęściej do otoczkowania nimi nasion roślin bobowatych. Aplikowanie rizobiów w ten sposób znacznie ułatwia wprowadzenie ich dużej liczby (10^3 – 10^6 komórek na jedno nasiono) bezpośrednio do strefy korzeniowej siewek roślin. W efekcie zwiększa się szanse (konkurencyjność) bakterii symbiotycznych na nawiązanie efektywnej symbiozy z rośliną bobowatą (Martyniuk 2011). Podczas procesu symbiozy bakterie dostarczają roślinie zredukowanych form azotu. W zamian roślina zapewnia bakteriom odpowiednią niszę ekologiczną oraz źródło węgla.

W Polsce preparaty mikrobiologiczne zawierające bakterie symbiotyczne dopuszczane są do obrotu przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi (MRiRW), po spełnieniu wymogów stosownej procedury rejestracyjnej. Procedura ta obejmuje szczegółowe dane dotyczące składu, opisu procesu produkcyjnego i sposobu stosowania produktu. Wymagane jest także przedstawienie wyników doświadczeń laboratoryjnych i polowych, które potwierdzają skuteczność rejestrowanego

biopreparatu w praktyce. Z tego powodu szczepionki rizobiowe są biopreparatami o sprawdzonej efektywności i dobrej jakości po względem mikrobiologicznym (Martyniuk 2011; Sobiczewski 2011). Na polskim rynku dostępnych jest wiele preparatów zawierających liofilizaty bakterii symbiotycznych, po które rolnicy chętnie sięgają. Należą do nich m.in. seria szczepionek do zaprawy nasion roślin bobowatych Mikroflor, seria preparatów bakteryjnych Agrarius, seria preparatów do zaprawiania nasion roślin bobowatych Bio Gen. Zastosowanie szczepionek rizobiowych w uprawach jest istotne dla rozwoju zrównoważonego, ekologicznego rolnictwa. Pozwala na znaczne ograniczenie, a nawet wyeliminowanie sztucznego nawożenia azotowego.



Rys. 1. Symbioza roślina bobowata-rizobium: A) Roślina wydziela flawonoidy, które aktywują u bakterii syntezę czynników Nod, B) Czynniki Nod są rozpoznawane przez specyficzne receptory rośliny, a to powoduje tworzenie nici infekcyjnej i rozwój brodawki korzeniowej, którą zasiedlają bakterie symbiotyczne, C) Wewnątrz brodawki bakterie przekształcają się w bakteroidy, które redukują N_2 , zaopatrując roślinę w przyswajalne dla niej formy azotu (NH_3 lub glutaminę) (wg. Laranjo i in. 2014).

3. Rizobiowe czynniki Nod

Czynniki Nod (NF, ang. Nod factors) to lipochitooligosacharydy sygnałne, odgrywające istotną rolę w początkowych oddziaływaniach rizobiów z rośliną-gospodarem (Rys. 1). NF są syntetyzowane przez rizobia w odpowiedzi na wydzielane przez rośliny do ryzosfery flawonoidy, które są chemoatraktantami dla zgodnych mikrosymbiontów. Czynniki Nod indukują wczesne reakcje symbiotyczne zachodzące na korzeniach roślin. Inicjują rozwój wyspecjalizowanych organów, którymi są brodawki korzeniowe, wewnątrz których zachodzi proces biologicznego wiązania azotu (Oldroyd i Downie 2004).

Interesujące są badania dotyczące zastosowania izolowanych rizobiowych czynników Nod jako bionawóz. Liczne doświadczenia laboratoryjne i polowe pokazują, że aplikowanie izolowanych czynników Nod bezpośrednio na nasiona, bądź opryskiwanie ich roztworem kilkunastu dniowych siewek wywołuje zwiększenie liczby brodawek korzeniowych zasiedlanych przez rizobia autochtoniczne, przyspiesza kiełkowanie oraz wpływa korzystnie na liczbę i masę brodawek korzeniowych (Podleśny i in. 2013; Kidaj i in. 2012). Stwierdzono, że stosowanie czynników Nod produkowanych przez *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* powoduje wzrost świeżej i suchej masy pędu i korzenia wyki oraz grochu, jak również liczby brodawek korzeniowych na tych roślinach (Uzdowska i in. 2019). Wykazano także, że preparaty czynników Nod w połączeniu z mikrosymbiontami konkretnego gatunku rośliny bobowatej lub same czynniki Nod korzystnie wpływają na rozwój i kondycję roślin. Dowiedzono, że czynniki Nod syntetyzowane przez *Bradyrhizobium japonicum* zwiększają kiełkowanie ważnych uprawnych roślin bobowatych, takich jak groch, wyka, soja i fasola, jak również roślin nienależących do bobowatych, takich jak kukurydza, ryż, buraki cukrowe, rzepak,

jęczmień czy bawełna w warunkach szklarniowych i polowych (Souleimanov i in. 2002; Prithiviraj i in. 2003; Miransari i in. 2009; Kidaj i in. 2012; Schwinghamer i in. 2015; Smith i in. 2015). Badania te pokazują, że biopreparaty zawierające izolowane rizobiowe czynniki Nod mogą być skutecznym sposobem zwiększenia plonowania nie tylko roślin bobowatych, ale także innych ważnych roślin uprawnych.

4. Bakterie promujące wzrost roślin (PGPR)

W ostatnich latach szczególne zainteresowanie biotechnologów wzbudza wprowadzanie do gleby lub bezpośrednio na rośliny mikroorganizmów, które wywierają korzystny wpływ na wegetację roślin. Do tej grupy zalicza się tzw. bakterie PGPR (ang. plant growth-promoting rhizobacteria), czyli wolnożyjące rizobakterie promujące wzrost roślin. Bakterie PGPR bytują w strefie korzeniowej, bądź jako endofity i ektofity w powierzchniowych tkankach roślin. Wśród PGPR znajdują się bakterie sklasyfikowane do wielu rodzajów np. *Pseudomonas* (np. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. marginalis*, *P. putida*), *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*, *Bacillus* (np. *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. laterosporus*, *B. coagulans*, *B. mycoides*, *B. sphaericus*, *B. pasteurii*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*, *E. cloacae*), *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*), *Azospirillum* (*A. lipoferum*), *Methylobacterium* (*M. oryzae*, *M. aquaticum*, *M. nodulans*). Korzystny wpływ PGPR na rośliny może przejawiać się na dwa sposoby: bezpośredni i pośredni. Wspomaganie bezpośrednio polega m.in. na dostarczeniu roślinie składników mineralnych (np. poprzez redukcję azotu atmosferycznego przez bakterie do form przyswajalnych przez rośliny, rozpuszczanie związków fosforu, czy wiązanie żelaza przez siderofory), na syntezie fitohormonów (np. auksyn, giberelin, cytokinin), na obniżeniu poziomu etylenu, który niekorzystnie wpływa na ukorzenianie roślin. Natomiast pośredni sposób stymulacji opiera się na biologicznym zwalczaniu fitopatogenów (grzybów i bakterii) (Pociejska i in. 2014). Odbyna się to dzięki syntezie przez PGPR antybiotyków, enzymów litycznych, czy innych metabolitów powodujących śmierć lub ograniczenie rozwoju patogenów. PGPR mogą także stymulować wytworzenie indukowanej odporności systemicznej (ISR) u roślin (Penrose 2003).

Liczne badania wykazały, że szczepienie roślin bakteriami PGPR, szczególnie z rodzaju *Pseudomonas*, pozwala złagodzić stresy powodowane czynnikami abiotycznymi i przyczynia się do wzrostu plonów niektórych roślin nawet o 144% (Saharan i Nehra 2011). Dowiedziono, że zastosowanie bakterii *P. fluorescens* jako bionawóz, spowodowało zwiększenie biomasy i zawartości alkaloidów wybranych roślin w warunkach suszy (Abdul Jaleel i in. 2007). W innych badaniach stwierdzono wzrost biomasy, zawartości wody oraz zmniejszenie utraty wody przez liście u roślin kukurydzy szczepionych *Pseudomonas* spp. (Sandhga i in. 2010). Rośliny te ponadto wykazywały wyższy poziom proliny i cukrów w stosunku do roślin kontrolnych (Natywa i Selwet 2012). Dzięki szczepieniu PGPR upraw kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*) w warunkach nawożenia azotowego i przy jego braku odnotowano znaczący wzrost wysokości roślin, masy korzeni i całkowitej biomasy (Shahaaroon i in. 2006). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono także, że mimo optymalnego poziomu nawożenia azotowego, zastosowanie PGPR poprawia wydajność kiełkowania i wzrost inokulowanych roślin (Shahaaroon i in. 2006). W doświadczeniach z zastosowaniem niektórych szczepów *Methylobacterium* wykazano, że bakterie z tego rodzaju spowodowały znaczny wzrost wysokości i biomasy cytrusów (*C. limonia* i *C. sunki*) (Bogas i in. 2016), korzystnie wpływały na wzrost i rozwój papryki czerwonej (Lee i in. 2011) oraz promowały wzrost mikroalg (Krug i in. 2020). Relacja *Methylobacterium* z mikroalgami być może w przyszłości pozwoli na znaczne obniżenie kosztów ich produkcji (Krug i in. 2020).

Na polskim rynku dostępne są biopreparaty oparte o PGPR. Podobnie jak preparaty „rizobiowe” wprowadzenie ich na rynek musi być poprzedzone rejestracją przez MRiRW, a ich skuteczność potwierdzona odpowiednimi badaniami. Przykładem biopreparatu zawierającego PGPR jest Novodor S.C. Preparat ten zawiera bakterie *Bacillus thuringiensis* i przeznaczony jest do zwalczania stonki ziemniaczanej. Jego działanie polega na syntezie toksyn przez *B. thuringiensis*, które powodują perforację przewodu pokarmowego stonki. Według badań Instytutu Ochrony Roślin (IOR) po zastosowaniu tego biopreparatu obserwuje się 78% mniej uszkodzeń liści spowodowanych przez stonkę ziemniaczaną oraz zwiększenie plonu w wysokości 5,4 t/ha w stosunku do kontroli. Do

biologicznej walki z omacnicą prosowianką, która jest szkodnikiem kukurydzy wykorzystuje się preparat o nazwie OstriniaSTOP. Zawarte w nim wyciągi roślinne oraz wyselekcjonowane bakterie z rodzaju *Bacillus* powodują, że kukurydza staje się nieatrakcyjna pokarmowo dla szkodnika. Ponadto metabolity syntetyzowane przez bakterie stymulują naturalne mechanizmy obronne roślin. Nowy preparat o nazwie Proradix, który służy jako biofungicyd do zaprawiania sadzeniaków zawiera bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Metabolity tych bakterii powodują zahamowanie wzrostu grzybnii *Rizoctonia solani* patogenu wywołującego rizoktoniozę ziemniaka. Środkiem wykorzystującym bakterie do walki z patogenami roślin uprawnych jest także Integral Pro. Preparat ten w swoim składzie zawiera bakterie *Bacillus amyloliquefaciens*. Wykorzystywany jest do zaprawiania nasion rzepaku ozimego i jarego, zapobiegając wystąpieniu suchej zgnilizny kapustnych. Środek ten działa również jako stymulator naturalnych mechanizmów obronnych roślin, dzięki czemu zmniejsza szkody powodowane przez pchełki ziemne (<https://www.farmer.pl/produkcja-roslinna/ochrona-roslin/rosnie-zainteresowanie-biopreparatami-w-ochronie-roslin,86639.html>).

5. Podsumowanie

Rozwój zrównoważonego, ekologicznego rolnictwa wiąże się z zastosowaniem nowych strategii w uprawie roślin. Należy do nich m.in. stosowanie biopreparatów, które poprawiają jakość i wielkość plonów oraz pozwalają na skuteczną walkę ze szkodnikami i patogenami roślin. Na polskim rynku coraz więcej jest dostępnych biopreparatów (nawozów i środków ochrony roślin), które w swoim składzie zawierają mikroorganizmy i substancje pochodzenia naturalnego. Ich głównym zadaniem jest stymulowanie rozwoju roślin i zwiększanie ich odporności na warunki stresowe i patogeny oraz poprawa żyzności gleb. Stosowanie biopreparatów pozwala na ograniczenie stosowania sztucznego nawożenia oraz oprysków chemicznych. Taka strategia upraw jest istotnym elementem zrównoważonej gospodarki rolnej oraz w znacznym stopniu przyczynia się do ochrony środowiska przyrodniczego w Polsce.

Praca powstała w ramach realizacji zadań projektu LIDER finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (nr. projektu: LIDER/11/0070/L-8/16/NCBR/2017).

6. Literatura

- Abdul Jaleel C, Manivannan P, Sankar B, et al.(2007). *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids Surf. B* 60: 7–11.
- Bogas AC, Aguilar-Vildoso CI, Camargo-Neves AA, Araújo WL (2016) Effects of growth-promoting endophytic *Methylobacterium* on development of Citrus rootstocks. *Afr. J. Microbiol. Res.* 10 (19): 646-653.
- Grzyb A, Waraczewska Z, Niewiadomski, A i in. (2019) Czy są biopreparaty i jakie jest ich zastosowanie? *Nauka Prz. Technol.* 13(2): 65–76.
- <https://www.farmer.pl/produkcja-roslinna/ochrona-roslin/rosnie-zainteresowanie-biopreparatami-w-ochronie-roslin,86639.html>
- Kidaj D, Wielbo J, Skorupska A (2012) Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. *Microbiol Res.* 167(3) 144-50.
- Krug L, Morauf C, Donat C et al. (2020) Plant growth-promoting *Methylobacteria* selectively increase the biomass of biotechnologically relevant microalgae. *Front. Microbiol.*, 11(425): 1-12.
- Laranjo M., Alexandre A., Oliveira S. (2014) Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus? *Microbiol. Res.* 169: 2-17.
- Lee M, Chauhan PS, Yim W et al. (2011) Foliar colonization and growth promotion of red pepper (*Capsicum annuum* L.) by *Methylobacterium oryzae* CBMB20. *J. Appl. Biol. Chem.*, 54(2): 120-125.
- Martyniuk S (2009) Wytwarzanie preparatów mikrobiologicznych na przykładzie bakterii symbiotycznych roślin motylkowatych. *J. Res. Appl. Agrict. Eng.* 55, 20–23.

- Martyniuk S (2011) Skuteczne i nieskuteczne preparaty mikrobiologiczne stosowane w ochronie i uprawie roślin oraz rzetelne i nierzetelne metody ich oceny. *Post. Mikrobiol.* 50(4): 321-328.
- Martyniuk S (2012) Czy rozwój integrowanej ochrony roślin i rolnictwa ekologicznego zwiększy wykorzystanie biopestycydów w praktyce rolniczej? *J. Agric. Eng. Res.* 57: 35-37.
- Mayer J, Scheid S, Widmer F et al. (2010) How effective are "Effective microorganisms (EM)"? Results from a field study in temperature climate. *Appl. Soil Ecol.* 46: 230-239.
- Miransari M, Smith D (2009) Rhizobial lipo-chitoooligosaccharides and gibberellins enhance barley (*Hordeum vulgare* L.) seed germination. *Biotech.* 8: 270-275.
- Natywa M, Selwet M (2012) Wpływ nawożenia azotowego i deszczowania na liczebność bakterii z rodzaju *Pseudomonas* w glebie. *Ekol. Tech.* 20: 115-124.
- Oldroyd GED, Downie JA (2004) Calcium, kinase and nodulation signalling in legumes. *Natl. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 566-576.
- Penrose DM, Glick BR (2003) Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol. Plant.* 118 (1): 10-15.
- Pięta D, Patkowska E, Pastucha A (2004) Oddziaływanie biopreparatów na wzrost i rozwój niektórych grzybów chorobotwórczych dla roślin motylkowatych. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 3(2): 171-177.
- Pociejowska M, Natywa M, Gałązka A (2014) Stymulacja wzrostu roślin przez bakterie PGPR. *Kosmos* 63(4): 603-610.
- Podleśny J, Wielbo J, Podleśna A i in. (2013) Przydatność stosowania preparatu czynników Nod (Lcos) do przedsięwzięcia zaprawiania nasion grochu siewnego (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Eng. Res.* 58(4): 124-129.
- Prithiviraj B, Zhou X, Souleimanov A et al. (2003) A host-specific bacteria-to-plant signal molecule (Nod factor) enhances germination and early growth of diverse crop plants. *Planta* 216: 437-445.
- Saharan BS, Nehra V (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *LSMR* 21: 1-30.
- Sandhga V, Ali S Z, Grover M et al. (2010). Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. *Plant Growth Regul.* 62:21-30.
- Saniewska A (2002) Aktywność antygrzybowa endogennych flawonoidów grejpfruta (*Citrus paradisi*). *Mat. Symp. Nauk. „Fitopatologia polska w Europie”*. Warszawa, 17-19 września 2002, s. 62.
- Schwinghamer T, Souleimanov A, Dutilleul P et al. (2015) The plant growth regulator lipo-chitoooligosaccharide (LCO) enhances the germination of canola (*Brassica napus* L.). *J. Plant Growth Regul.* 34: 183.
- Shaharoon B, Arshad M, Zahir ZA, Khalid A (2006) Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biol. Biochem.* 38: 2971-2975.
- Smith S, Habib A, Kang Y et al. (2015) LCO applications provide improved responses with legumes and nonlegumes. *Biol. Nitrogen Fixat.*: 1077-1086.
- Sobiczewski P (2009) Bakterie wykorzystywane w produkcji roślinnej. (w) *Biotechnologia roślin*, red. S. Malepszy, PWN Warszawa 2009: 172-213.
- Souleimanov A, Prithiviraj B, Smith DL (2002) The major Nod factor of *Bradyrhizobium japonicum* promotes early growth of soybean and corn. *J. Exp. Bot.* 53: 1929-1934.
- Tomalak M (2010) Rynek biologicznych środków ochrony roślin i przepisy legislacyjne. *Post. Ochr. Roślin* 50: 1053-1063.
- Uzdowska Z, Kidaj D, Krysa M i in. (2019) Wpływ ekologicznego bionawozu na uprawę wyki i grochu. *Kolekcja monografii naukowych: Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie*, wyd. UMCS, Lublin 2019: 168-170.
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. *Plant Soil* 255: 571-586.
- Wójcik M, Sugier P, Siebielec G (2014) Metal accumulation strategies in plants spontaneously inhabiting Zn-Pb waste deposits. *Sci. Total Environ.* 487: 313-322.

11. Kinetyka procesu sorpcji zanieczyszczeń środowiskowych na wymiennicach jonowych różnego typu

Kinetics of the organic compounds sorption process on anion exchanger

Polska-Adach Ewelina

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Nieorganicznej, pl. M. Curie-Skłodowskiej 2, 20-031 Lublin
Opiekun naukowy: dr hab. Monika Wawrzekiewicz

Ewelina Polska-Adach: ewelina.polskaadach@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: sorpcja, kinetyka, barwnik, zanieczyszczenia środowiskowe, PSO, PFO

Streszczenie

W niniejszej pracy omówiono kinetykę sorpcji barwników ze szczególnym zwróceniem uwagi na czynniki przyczyniające się do wzrostu szybkości reakcji. Omówiono najczęściej wykorzystywane modele kinetyczne tj. PFO (pseudo-first-order), PSO (pseudo-second-order) i IPD (intraparticle diffusion).

1. Wstęp

Barwniki mają negatywny wpływ na środowisko naturalne i organizmy żywe. Usuwanie ich z roztworów wodnych odgrywa kluczową rolę w ochronie środowiska, a co za tym idzie zdrowia i życia człowieka. Wymagania w zakresie uzdatniania wód z roku na rok są coraz bardziej restrykcyjne. W związku z tym preferowane są rozwiązania oczyszczania ścieków bardziej wydajne, a zarazem bezpieczne ekologicznie i ekonomicznie opłacalne. W celu usuwania barwników ze ścieków można stosować szereg metod fizycznych i chemicznych. Jedną z najbardziej efektywnych metod to metoda adsorpcyjna, do której zaliczamy m.in. wymianę jonową z wykorzystaniem różnego typu sorbentów.

Szybkość z jaką zachodzi reakcja wymiany jonowej jest złożona i zależna od wielu procesów, do których zaliczamy:

- gradient stężenia w obu fazach,
- gradient ładunku elektrycznego w obu fazach,
- oddziaływania jonowe w obu fazach,
- właściwości adsorbentu (struktura, grupa funkcyjna),
- reakcje chemiczne w dowolnej fazie.

Co więcej, na szybkość reakcji wymiany mają wpływ także różne czynniki wśród których wyróżniamy: budowę jonitu (jego wielkość), rodzaj i ilość grup funkcyjnych, stopień uwodnienia jonitu, wielkość ładunku elektrycznego jonów biorących udział w procesie wymiany, stężenie elektrolitu, pH roztworu, rodzaj zanieczyszczeń obecnych w roztworze, temperaturę procesu.

1.1 Budowa jonitu

Wewnątrz jonitu istnieją pory o różnych przekrojach, do wnętrza których dyfundują jony z elektrolitu. Dlatego też struktura przestrzenna jonitu i rodzaj porów to czynniki mające wpływ na charakter zachodzącej wymiany, jak i na to, czy proces będzie przebiegał na powierzchni cząsteczek czy wewnątrz cząsteczek lub czy będzie miał charakter mieszany.

W przypadku grup funkcyjnych ważne jest, żeby były to grupy o wysokim stopniu dysocjacji np. $-\text{SO}_3\text{H}$ czy $-\text{R}_3\text{N}^+\text{Cl}^-$, które są zdysocjowane prawie w 100%, dzięki czemu mogą być stosowane w całym zakresie pH. Zbyt mała ilość grup funkcyjnych przyczynia się do obniżenia zdolności wymiennej, z kolei zbyt duża ich ilość może skutkować peptyzacją. Dużą zdolność wymienną można uzyskać gdy jonit posiada optymalną ilość grup funkcyjnych i nie posiada charakteru hydrofilowego.

1.2 Wpływ energii wymiennej jonów

Proces przejścia jonów z roztworu do jonitu lub odwrotnie jest uzależniony m.in. od: promienia jonów, stopnia ich hydratacji oraz wielkości ładunku elektrycznego. Wraz ze wzrostem ładunku jonu, siła potrzebna na jego przyciągnięcie przez przeciwnie naładowane jony żywicy musi być większa, co zarazem powoduje wzrost energii wymiennej, a w konsekwencji przyczynia się do szybszej wymiany.

W przypadku kationów o jednakowym ładunku, energia wymienna jest odwrotnie proporcjonalna do hydratowanego promienia (promień jonu z otaczającą go otoczką wodną, który powstaje podczas jego uwodnienia) tych jonów. Zdolność wymienna układu jonit - elektrolit i energii wymiennej jonów jest uzależniona od stopnia ich hydratacji.

1.3 Wpływ stężenia elektrolitu

W roztworach bardziej rozcieńczonych mniejsze ilości jonów wiążą się z grupami funkcyjnymi jonitu, w porównaniu do roztworów posiadających wyższe stężenia co potwierdzają dane eksperymentalne. Przy czym można zaobserwować to tylko dla jonów występujących na różnych stopniach utlenienia. W przypadku jonów występujących na tym samym stopniu utlenienia zmiana stężenia nie wpływa na wartość zdolności wymiennej.

1.4 Wpływ pH

Kolejnym dość istotnym czynnikiem mającym wpływ na proces wymiany jonowej jest pH. Przy niskich wartościach pH występuje tylko proces wymiany jonów, podczas gdy w roztworach silnie zasadowych może zachodzić także oprócz wymiany jonów adsorpcja i absorpcja.

Zdolność wymienna kationitów z grupami sulfonowymi nie zmienia się wraz ze zmianą pH roztworu. Dla wymienniczy ze słabo kwasowymi grupami funkcyjnymi zdolność wymienna uzależniona jest od rodzaju elektrolitu i jego pH. Reasumując, zdolność wymienna kationów w kationicie wzrasta ze wzrostem pH roztworu, natomiast dla anionitów, zdolność wymienna ich anionów wzrasta ze spadkiem pH roztworu.

1.5 Wpływ temperatury

W procesach wymiany jonowej wpływ temperatury jest bardzo trudny do oceny ze względu na złożony charakter zjawisk w nim występujących. Proces wymiany jonów oraz zdolności wymienne jonitów powinny wraz ze wzrostem temperatury rosnąć. W przypadku kationitu pochodzenia mineralnego zmiana temperatury ma nieznaczny wpływ na zdolność wymienną, w przeciwieństwie do kationitów pochodzenia organicznego, gdzie wpływ ten jest duży. Ponadto zdolność wymienna tych kationitów wzrasta prostoliniowo ze wzrostem temperatury. Dla anionitów obserwujemy taki sam wpływ temperatury. Zasadniczą różnicą w procesie wymiany jonowej na jonitach organicznych i nieorganicznych jest to, że wraz ze wzrostem temperatury następuje wzrost szybkości reakcji wymiany, co wynika ze wzrostu szybkości dyfuzji jonów z roztworu do grup funkcyjnych jonitu.

Zrozumienie kinetyki reakcji wymiany jonowej pomaga wyjaśnić naturę różnych mechanizmów transportu jonów, które kontrolują lub przyczyniają się do ogólnej wymiany. Co więcej wyprowadzone liczbowo parametry takie jak stałe szybkości reakcji, współczynniki przenikania masy lub współczynniki dyfuzji pomagają w prognozowaniu odpowiedniego mechanizmu adsorpcji (Trémillon 1970, Harland 1994).

2. Opis zagadnienia

Zjawisko adsorpcji na granicy faz roztwór-ciało stałe odgrywa kluczową rolę w wielu procesach przemysłowych. W szczególności może być wykorzystywane w celu oczyszczenia roztworów wodnych z substancji toksycznych, takich jak jony metali ciężkich, barwniki, detergenty lub związki fenolowe. Poszukiwania nowych, efektywnych adsorbentów o dużej pojemności, dobrych właściwościach mechanicznych oraz innych pożądanых właściwościach zaowocowały dużą ilością prac eksperymentalnych opisujących syntezę takich materiałów oraz opisem ich właściwości adsorpcyjnych. Przeciętny eksperyment sprowadza się do zbadania stanu równowagi adsorpcyjnej,

w celu ustalenia optymalnych warunków procesu, prowadzącego do usunięcia jak największej ilości adsorbentu z roztworu wodnego. Równolegle prowadzone są badania nad szybkością ustalania się równowagi w tym samym układzie. Znajomość kinetyki adsorpcji dostarcza informacji o szybkości usuwania adsorbentu oraz najbardziej prawdopodobnym mechanizmie sorpcji. Zarówno fizyczne, jak i chemiczne właściwości adsorbentu, a także proces przenoszenia masy pomiędzy adsorbentem i adsorbentem określają prawdopodobny mechanizm retencji. Informacje te wykorzystywane są do określania rodzaju mechanizmu opisującego proces sorpcji.

Do opisu kinetyki sorpcji wykorzystuje się najczęściej modele PFO, PSO i IPD, za pomocą których można obliczyć parametry kinetyczne sorpcji. Sam proces polega na dopasowaniu danych eksperymentalnych do różnych równań i wyborze tego, które najlepiej opisuje dane. Najbardziej popularne modele kinetyczne stosowane w ubiegłym dziesięcioleciu to: model kinetyczny pseudo-pierwszego rzędu Lagergren'a oraz model pseudo-drugiego rzędu zaproponowany przez Ho i McKay'a.

Z uwagi na porowatość węgla aktywnych czy jonitów w opisie kinetyki sorpcji znalazł również zastosowanie model IPD (model dyfuzji międzyziarnowej). Model ten wykorzystuje się do opisu mechanizmu dyfuzji adsorpcyjnej w celu zdefiniowania etapu determinującego szybkość reakcji (Farooq 2011).

2.1 Model PFO – pseudo-first-order

Model pierwszego rzędu Lagergren'a określany jest przez następujące wyrażenie (Lagergren 1898):

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2.303} t$$

gdzie: k_1 – stała równowagi dla PFO wyrażona w (1/min), t – czas adsorpcji (min.), q_e, q_t – ilość zaadsorbowanej substancji w stanie równowagi oraz po czasie t wyrażona w mg/g.

2.2 Model PSO – pseudo-second-order

Do opisu kinetyki drugiego rzędu wykorzystano model oparty na pojemności sorpcyjnej adsorbentu. Model ten można przedstawić za pomocą następującego wyrażenia (Ho i McKay 1998):

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$$

gdzie: k_2 – stała równowagi dla PSO wyrażona w (g/mg min), t – czas sorpcji, q_e, q_t – ilość zaadsorbowanego barwnika w stanie równowagi oraz po czasie sorpcji t wyrażona w mg/g.

Jeżeli kinetykę procesu sorpcji opisuje model PSO to wykres t/q_t od t jest liniowy i z jego nachylenia i punktu przecięcia z osią y można określić parametry q_e oraz k_2 .

2.3 Model IPD – intraparticle diffusion

Model dyfuzji międzycząstkowej zaproponowany przez Webera i Morrisa zakłada proporcjonalność sorpcji do pierwiastka kwadratowego z czasu kontaktu faz adsorbent-roztwór (Plaziński 2013):

$$q_t = k_i t^{1/2} + C$$

gdzie: q_t – ilość substancji zaadsorbowanej po czasie t (min) (mg/g), k_i – stała dyfuzji międzyziarnowej, C – stała obrazująca wpływ warstwy granicznej na proces sorpcji, t – czas adsorpcji (min.).

3. Przegląd literatury

Wymieniacze jonowe (jonity) zostały zsyntezowane pod koniec lat 40 ubiegłego wieku, natomiast ich intensywny rozwój jest wynikiem wykorzystania ich do oczyszczania i produkcji wody do celów przemysłowych i spożywczych, katalizowania reakcji w syntezie organicznej, biotechnologii i biochemii, przemysłowych procesach oczyszczania, produkcji żywności i leków oraz ochronie środowiska. Obecnie żywice jonowymienne są dość popularnymi adsorbentami różnego

typu zanieczyszczeń. Rolą jonitów w procesach oczyszczania ścieków jest zmniejszanie wielkości emitowanego do środowiska naturalnego ładunku zanieczyszczeń. Metoda polega na przekształceniu ich w formę mniej toksyczną, a następnie ich usunięciu. Ponadto ważną cechą samego procesu wymiany jonowej jest fakt, że ma zdolność zarówno do separacji, jak i zateżniania zanieczyszczeń.

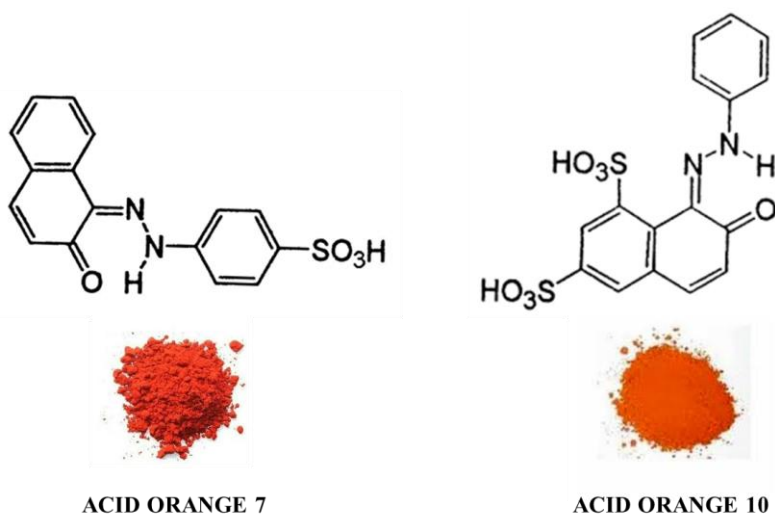
Gode i Pehlivan (Godea i Pehlivan 2006) podjęli próbę usunięcia z roztworów wodnych jonów chromu(III) za pomocą Lewatit S 100 i Chelex-100. Zbadano wpływ masy adsorbentu, początkowego stężenia metalu, czasu kontaktu, pH i temperatury na szybkość usuwania Cr(III). Lewatit S 100 wykazuje wysoką zdolność sorpcyjną względem Cr(III). Proces wymiany jonowej był stosunkowo szybki; stan równowagi ustalił się po około 150 minutach kontaktu faz. Sorpcję jonów Cr(III) na w/w żywicach kationowymiennych opisano za pomocą modelu pseudo pierwszego rzędu.

Greluk i Hubicki (Greluk i Hubicki 2013) zastosowali trzy komercyjne żywice anionowymiennne: silnie zasadowe Amberlite IRA-900 i Amberlite IRA-910 oraz słabo zasadowy Amberlyst A-21, za pomocą których usuwano Acid Orange 7 (AO7) i Acid Orange 10 (AO10) z roztworów wodnych. Zbadano wpływ czasu kontaktu faz w zakresie stężeń barwnika od 50 do 500 mg/L. Dla maksymalnego stężenia barwnika AO7 i AO10 – 500 mg/L czas potrzebny na osiągnięcie stanu równowagi wynosił 60 min, przy czym dla stężenia 50 mg/L wynosił zaledwie 10 min w przypadku sorpcji na silnie zasadowych żywicach jonowymiennych (Amberlite IRA-900 i Amberlite IRA-910), natomiast podczas sorpcji na słabo zasadowym A-21 czas ten był nieco dłuższy. Wraz ze wzrostem czasu kontaktu faz i stężenia początkowego czas potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi rośnie.

Mechanizm adsorpcji AO7 i AO10 na Amberlite IRA-900, Amberlite IRA-910 i Amberlyst A-21 został oceniony przy pomocy najczęściej stosowanych modeli: PFO i PSO. Na podstawie obliczonych parametrów kinetycznych można stwierdzić, że najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych uzyskano do modelu PSO. Wartości współczynników regresji R^2 dla tych wykresów liniowych były wysokie ($> 0,999$). Równanie Lagergrena, nie znalazło zastosowania do opisu kinetyki sorpcji Acid Orange 7 i Acid Orange 10 na Amberlite IRA-900, Amberlite IRA-910 i Amberlyst A-21 ze względu na brak liniowej zależności $\log(q_e - q_t)$ od t , potwierdzonej małymi wartościami R^2 oraz różnicami pomiędzy pojemnością sorpcyjną wyznaczoną eksperymentalnie ($q_{e,exp}$), a tą obliczoną z równania Lagergrena (q_e). W związku z powyższym kinetykę procesu lepiej opisuje model pseudo drugiego rzędu. Modelowanie wyników kinetycznych wykazało, że proces sorpcji adsorpcji barwnika na wymiennicach anionowych w całym zakresie stężeń i czasu odpowiada modelowi pseudo drugiego rzędu. Co więcej, badania kinetyczne wykazały, że proces jest szybki. Acid Orange 10 był szybciej wiązany przez aniony niż Acid Orange 7. Może to być spowodowane ilością grup sulfonowych barwnika i rodzajem grup funkcyjnych wymienniczy anionowych. Acid Orange 10 zawiera dwie grupy sulfonowe przez co mógł wykazać szybszą kinetykę procesu adsorpcji na wymiennicach anionowych w porównaniu do Acid Orange 7, który posiada tylko jedną grupę sulfonową w cząsteczce (Rys.1.).

Wymiennicze jonowe znajdują również zastosowanie w procesach usuwania metali szlachetnych tzn. metali odpornych chemicznie. Wśród nich wyróżniamy: ruten, rod, pallad, osm, iryd i platynę oraz srebro i złoto. Metale te charakteryzują się dużą odpornością na korozję w atmosferze powietrza, nawet przy dość dużej wilgotności. Wołowicz i Hubicki (Wołowicz i Hubicki 2011) podjęli próbę usunięcia palladu(II) z roztworów kwaśnych za pomocą słabo zasadowych żywic anionowymiennych. Zbadali wpływ czasu kontaktu faz, stężenia kwasów i chlorku sodu na sorpcję jonów Pd(II) metodą statyczną i dynamiczną. Dane uzyskane dla Amberlite IRA-92, Amberlite IRA-95, Amberlite IRA-96, Dowex 66, Varion ADAM i Lewatit MP-62 zostały porównane z wynikami uzyskanymi dla Amberlyst A-23, Amberlyst A -24, Dowex WGR-2 i Amberlyst A-21. Zdolność sorpcyjna Varion ADAM wynosiła 121,48 mg/g. Proces sorpcji Pd(II) na słabo zasadowych żywicach anionowymiennych przebiegał szybko i stwierdzono, że na zdolności sorpcyjne mają wpływ stężenie kwasu i chlorku sodu. Badania w układzie dynamicznym potwierdzają większe powinowactwo Varion ADAM do Pd(II) niż w przypadku innych słabo zasadowych wymienniczy anionowych. Kinetyka Pd(II) jest zgodna z równaniem kinetycznym pseudo drugiego rzędu.

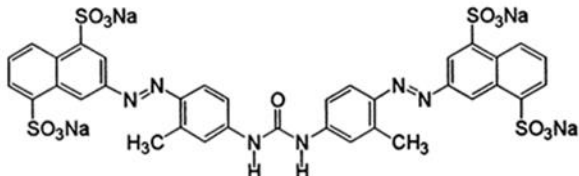
Żywicze jonowymienne stały się również dość przydatne w procesie usuwania barwników bezpośrednich z roztworów wodnych. Wawrzkievicz i in. (Wawrzkievicz i in. 2019) usuwali z roztworów wodnych Direct Yellow 50 (DY50) za pomocą makroporowatych sorbentów różniących się matrycą i rodzajem grup funkcyjnych (Amberlite XAD 7, Amberlite IRA-478, Amberlite IRA-958, Lewatit VPOC-1064, Lewatit MonoPlus MP68, Amberlite IRA-900) (Tab.1.). Proces sorpcji DY50 zbadano w oparciu o stężenie początkowe barwnika, czas kontaktu faz, wpływ soli i substancji powierzchniowo czynnych. Sorpcję barwnika bezpośredniego prowadzono metodą kolumnową i statyczną. Dane kinetyczne uzyskane w układach o różnych stężeniach opisano za pomocą modelu pseudo-pierwszego i pseudo-drugiego rzędu.



Rys.1. Struktura barwnika Acid Orange 7 i Acid Orange 10.

Wpływ czasu kontaktu faz na sorpcję Direct Yellow 50 na jonitach poliakrylowych (Amberlite IRA 478, Amberlite IRA 58) i polistyrenowych (Lewatit MonoPlus MP 68, Amberlite IRA 900) o różnej zasadowości grup funkcyjnych oraz na sorbentach pozbawionych grup funkcyjnych Ambrelite XAD-7 i Lewatit VPOC-1064 zbadano w obecności bezpośredniego barwnika, którego stężenia w roztworach wodnych wynosiły: 100 mg/L, 300 mg/L i 500 mg/L. Dla poliakrylowego Amberlite IRA-958 czas kontaktu potrzebny do osiągnięcia stanu równowagi wynosił 5 min, w roztworze wodnym zawierającym 100 mg/L barwnika, natomiast dla wyższych początkowych stężeń barwnika 300 mg/L i 500 mg/L wynosił kolejno: 10 i 50 min. Dla polistyrenowego Amberlite IRA-900 czas potrzebny do całkowitego wychwytu barwnika był dłuższy i dla początkowych stężeń 100, 300 i 500 mg/L wynosił kolejno: 30, 90 i 120 min. Amberlite IRA-958 i Amberlite IRA-900 są to sorbenty o takiej samej strukturze i grupach funkcyjnych, lecz różnej matrycy w związku z tym można zauważyć, że odgrywa ona dość istotną rolę. Proces sorpcji zachodzi znacznie szybciej w przypadku anionitów poliakrylowych (aniony o bardziej hydrofilowym szkielecie), niż w przypadku polistyrenowych, co może być spowodowane obecnością grupy karbonylowej, większą elastycznością szkieletu czy też możliwością tworzenia wiązań wodorowych co jest bardzo ważne w procesie sorpcji związków organicznych. Parametry kinetyczne obliczone z równań PFO i PSO, pozwalają stwierdzić, że najlepsze dopasowanie danych eksperymentalnych uzyskano do modelu PSO. Świadczą o tym nie tylko wysokie wartości współczynnika determinacji R^2 , ale również wartości $q_{e,exp}$, które są zbliżone do tych wyliczonych z równania Ho. Wynika z tego, że równanie Langergrena, nie znajduje zastosowania do opisu kinetyki sorpcji barwników na wybranych sorbentach. Wyjątek stanowią natomiast anionity polistyrenowe Lewatit MonoPlus MP 68 i Amberlite IRA 900, dla których to właśnie równanie Langergrena najlepiej opisało sorpcję DY 50.

Tab. 1. Struktura barwnika Direct Yellow 50 i właściwości fizykochemiczne użytych sorbentów.

AMBERLITE XAD-7	AMBERLITE IRA-478	AMBERLITE IRA-958
Matryca: poliakrylowa Grupy funkcyjne: - Struktura: makroporowata Powierzchnia [m ² /g]: ≥380 Rozmiar ziarna [mm]: 0,56 – 0,71 Temperatura pracy [°C]: 80 – 100	Matryca: poliakrylowa Grupy funkcyjne: — N ⁺ (CH ₃) ₃ , —N(CH ₃) ₂ Struktura: mikroporowata Pojemność sorpcyjna [eq/dm ³]: ≥1,15 Rozmiar ziarna [mm]: 0,70 – 0,98 Temperatura pracy [°C]: 35	Matryca: poliakrylowa Grupy funkcyjne: —N ⁺ (CH ₃) ₃ Struktura: makroporowata Pojemność sorpcyjna [eq/dm ³]: >0,8 Rozmiar ziarna [mm]: <0,355 Temperatura pracy [°C]: 80
LEWATIT VPOC-1064	LEWATIT MP-68	AMBERLITE IRA-900
Matryca: polistyrenowa Grupy funkcyjne: - Struktura: makroporowata Powierzchnia [m ² /g]: 800 Rozmiar ziarna [mm]: 0,44 – 0,54 Temperatura pracy [°C]: 120	Matryca: polistyrenowa Grupy funkcyjne: — N ⁺ (CH ₃) ₃ , —N(CH ₃) ₂ Struktura: makroporowata Pojemność sorpcyjna [eq/dm ³]: ≥1,3 Rozmiar ziarna [mm]: 0,54 Temperatura pracy [°C]: 70	Matryca: polistyrenowa Grupy funkcyjne: —N ⁺ (CH ₃) ₃ Struktura: makroporowata Pojemność sorpcyjna [eq/dm ³]: ≥ 1,00 Rozmiar ziarna [mm]: 0,65 – 0,82 Temperatura pracy [°C]: 60
BARWNIK DIRECT YELLOW 50 (żółcień bezpośrednia 50) 		
 Wzór sumaryczny: C₃₅H₂₄N₆Na₄O₁₃S₄₄ C.I. No: 29025 Masa molowa: 956,82 g/mol		

4. Podsumowanie

Żywicie jonowymienne charakteryzują się: wysoką efektywnością, wysoką selektywnością względem związków aromatycznych, dobrze rozwiniętą powierzchnią właściwą, porowatą strukturą, a także brakiem strat sorbentu w procesie regeneracji. Pomimo ich wysokiej ceny oraz zależności procesu sorpcji od pH środowiska są ciągle wykorzystywane jako potencjalne sorbenty w procesach adsorpcyjnych prowadzonych w przemyśle.

5. Literatura

Farooq U., Khan M.A, Athar M. i et. al (2011) Effect of modification of environmentally friendly biosorbent wheat (*Triticum aestivum*) on the biosorptive removal of cadmium(II) ions from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal* 171: 400–410.

- Godea F., Pehlivan E. (2006) Removal of chromium(III) from aqueous solutions using Lewatit S 100: The effect of pH, time, metal concentration and temperature. *Journal of Hazardous Materials* 136(2): 330-337.
- Greluk M., Hubicki Z. (2013) Effect of basicity of anion exchangers and number and positions of sulfonic groups of acid dyes on dyes adsorption on macroporous anion exchangers with styrenic polymer matrix. *Chemical Engineering Journal* 215/216: 731-739.
- Harland C.E. (1994) *ION EXCHANGE Theory and Practice* Second Edition, The Royal Society of Chemistry, UK.
- Ho Y.S., McKay G. (1998) Kinetic Models for the Sorption of Dye from Aqueous Solution by Wood. *Process Saf. Environ.* 76: 183-191.
- Lagergren S. (1898) Zur theorie der sogenannten adsorption geloster stoffe, *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens. Handlingar* 24: 1-39.
- Plaziński W., Dziuba J., Rudziński J. (2013) Modeling of sorption kinetics: The pseudo-second order equation and the sorbate intraparticle diffusivity. *Adsorption* 19:1055-1064.
- Trémillon B. (1970) *Jonity w procesach rozdzielczych*, PWN, Warszawa.
- Wawrzekiewicz M., Polska-Adach E., Hubicki Z. (2019) Polacrylic and polystyrene functionalized resins for direct dye removal from textile effluents. *Separation Science and Technology* 53:1065-1075.
- Wołowicz A., Hubicki Z. (2011) Investigation of macroporous weakly basic anion exchangers applicability in palladium(II) removal from acidic solutions – batch and column studies. *Chemical Engineering Journal* 174: 510-521.

12. Badania równowagowe w procesie usuwania barwników reaktywnych z roztworów wodnych

Equilibrium studies in the process of reactive dyes removal from aqueous solutions

Polska-Adach Ewelina

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Chemii, Instytut Nauk Chemicznych, Katedra Chemii Nieorganicznej,
pl. M. Curie-Skłodowskiej 2, 20-031 Lublin
Opiekun naukowy: dr hab. Monika Wawrzekiewicz

Ewelina Polska-Adach: ewelina.polskaadach@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: Langmuir, Freundlich, Temkin

Streszczenie

W niniejszej pracy omówiono najczęściej stosowane modele izoterm: Langmuira, Freundlicha i Temkina, które wykorzystywane są do opisu maksymalnej zdolności sorpcyjnej sorbentu. Porównano zdolności sorpcyjne względem barwników reaktywnych na wymieniaczach jonowych i sorbentach typu „low-cost”

1. Wstęp

Mieszanie zużytej wody oraz substancji ciekłych, stałych, gazowych oraz ciepła, usuwanych z terenów miast oraz zakładów przemysłowych nazywamy ściekami. Zanim są one wprowadzone do odbiornika otwartego lub kanalizacji miejskiej muszą spełniać odpowiednie wymogi. Głównym źródłem zanieczyszczeń wód w Polsce są ścieki pochodzące z przemysłu włókienniczego, papierniczego, spożywczego, garbarskiego, a także z miast i spływów rolniczych. Jeżeli w wodzie obecne są duże ilości substancji chemicznych, bakterii i mikroorganizmów, które nie są jej naturalnymi składnikami możemy stwierdzić, że jest zanieczyszczona. Skutkuje to zmianami jej właściwości fizycznych, chemicznych i bakteriologicznych. Wraz z rozwojem cywilizacyjnym stan czystości wód na świecie ulega pogorszeniu.

W zależności od rodzaju i wielkości produkcji czy też sposobu prowadzenia gospodarki wodno-ściekowej objętość i skład ścieków przemysłowych ulega zmianom. Ścieki pochodzące z przemysłu zawierają głównie związki chemiczne, które są produktem ubocznym wielu procesów technologicznych. W związku z tym, aby określić skład chemiczny ścieków konieczna jest ich analiza chemiczna.

Ścieki tekstylne są mieszaniną zarówno substancji organicznych (węglowodory aromatyczne, fenole, produkty naftowe, żywice, barwniki, detergenty, pestycydy itp.), jak i nieorganicznych (zasady, kwasy nieorganiczne, sole metali ciężkich, siarkowodór, siarczany, chlorki, cyjanki, azotany, fosforany itd.) (Błaszczuk 2007).

Szereg procesów technologicznych prowadzonych w przemyśle włókienniczym związany jest z przeróbką włókien naturalnych i sztucznych. Proces barwienia oparty jest na powinowactwie barwników do określonych substancji, a także na zdolności do rozpuszczania się i tworzenia produktów na barwionym materiale. Przebiega on w kilku etapach. W pierwszym etapie następuje rozpuszczanie

i rozpraszanie barwnika, zaś w kolejnych jego utrwalenie. Podczas barwienia pomiędzy barwnikiem, a barwionym materiałem mogą tworzyć się oddziaływania międzycząsteczkowe np. siły van der Waalsa. Po zakończeniu procesu barwienia włókien lub tkanin kąpiel barwiarska (wraz z pewną ilością barwnika niezaadsorbowanego przez włókna) zostaje odprowadzona do ścieków. Szacuje się, że po procesie barwienia do środowiska naturalnego przedostaje się około 2–50% barwników w zależności od rodzaju zastosowanego barwnika. Ilość niezwiązanego barwnika pozostająca w kąpeli farbiarskiej zależy m.in. od rodzaju barwnika, typu barwionego włókna oraz metody barwienia

(Stiepanow 1980, Greluk 2013). W tabeli 1 przedstawiono ilości barwników, które przedostają się do ścieków włókienniczych z kąpeli farbiarskich.

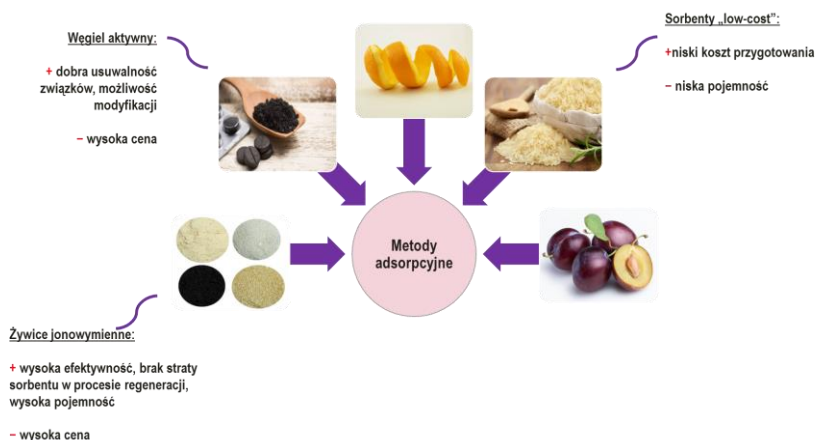
Tab.1. Ilości barwników przedostających się do ścieków włókienniczych z kąpeli farbiarskich (Hessel et al. 2007).

Rodzaj barwnika	Pozostałość w ściekach po procesie barwienia [%]
Barwniki zasadowe	2 – 3
Barwniki bezpośrednie	5 – 20
Barwniki kadziowe	5 – 20
Barwniki kwasowe	7 – 20
Barwniki siarkowe	20 – 40
Barwniki reaktywne	20 – 50

Z uwagi na to, że barwa jest jednym z najszybciej postrzeganych rodzajów zanieczyszczeń w wodzie, jej obecność wpływa na ocenę jakości wody. Barwniki mogą być również silnie toksyczne w stosunku do organizmów wodnych, a także utrudniają przenikanie promieni słonecznych, przez co w konsekwencji hamują proces fotosyntezy i rozwój biocenozy.

Złożona budowa cząsteczki barwników utrudnia ich rozkład metodami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi, w wyniku którego mogą powstawać niewielkie ilości produktów toksycznych lub kancerogennych.

Jedną z najbardziej efektywnych metod usuwania barwników z wód i ścieków jest ich adsorpcja na porowatych sorbentach syntetycznych do których zaliczamy m.in. węgle aktywne, żywice jonowymienne. Jednak wysokie koszty wytwarzania przyczyniły się poszukiwania nowych i tanich adsorbentów (Rys.1.)



Rys. 1. Wady i zalety sorbentów.

Ścieki farbiarskie charakteryzuje więc nie tylko intensywne zabarwienie, ale również wysokie pH i zasolenie oraz wysoki współczynnik ChZT, przy niewspółmiernie niskim współczynniku BZT₅, co powoduje, że są one mało podatne na procesy biologicznego oczyszczania.

BZT jest parametrem określającym ilość zanieczyszczeń w ściekach tzw. biochemiczne zapotrzebowanie tlenu. Jest to ilość tlenu rozpuszczonego w wodzie zużyta przez bakterie aerobowe (tlenowe) (mg/dm³) w ciągu określonego czasu. Ponieważ ok. 50% zanieczyszczeń zostaje utlenione przez bakterie w ciągu 3 dni, a po ok. 20 dniach proces jest zwykle zakończony, przyjmuje się czas 5

dni jako reprezentatywny do wyznaczenia charakterystyki biochemicznego zapotrzebowania tlenu. BZT₅ oznacza się metodą rozcieńczeń lub metodami manometrycznymi.

Innym parametrem jest chemiczne zapotrzebowanie tlenu – ChZT, które jest pojęciem umownym i oznacza ilość tlenu w mg/L pobranego z utleniacza (w umownych warunkach) na utlenienie w ściekach związków organicznych i niektórych nieorganicznych. ChZT jest często wykonywane przy pomiarach zanieczyszczeń w wodach czystych i zanieczyszczonych, takich jak wody spadowe lub ścieki przemysłowe. Do oznaczania ChZT wody stosuje się zwykle metody nadmanganianowe, natomiast do ścieków - dichromianową. ChZT oznaczone metodą nadmanganianową określa się także jako utlenialność. Ze względu na to, że utlenieniu ulega tylko ok. 60% substancji organicznych zawartych w badanych próbkach, utlenialność określa jedynie orientacyjną zawartość zanieczyszczeń. Stosunkowa łatwość wykonania oznaczenia sprawia, że jest ono często stosowane (Bezak-Mazur i Adamczyk 2010).

2. Opis zagadnienia

Do określenia równowagi między stężeniem adsorbentu w fazie stałej, a jego stężeniem w fazie ciekłej służą izotermy adsorpcji. Na podstawie przebiegu wykresu izoterm można uzyskać informację o maksymalnej zdolności adsorpcyjnej sorbentu. Najczęściej wykorzystywanymi modelami są: model Langmuira, Freundlicha i Temkina.

2.1 Model Langmuira

Początki teorii adsorpcji Langmuira należy przypisać na lata 1916-1918. Równanie izoterm Langmuira opisuje bardzo dobrze adsorpcję chemiczną, w przypadku której substancja zaadsorbowana tworzy na powierzchni fazy stałej warstwę jednocząsteczkową oraz w przypadku adsorpcji z roztworów stosunkowo dużych cząsteczek takich jak barwniki.

Założenia modelu Langmuira:

- powierzchnia ciała stałego jest homogeniczna i posiada określoną liczbę miejsc adsorpcyjnych,
- na jednym miejscu adsorpcyjnym może zaadsorbować się jedna cząsteczka adsorbentu,
- wiązaną adsorbentem z miejscem adsorpcyjnym zachodzi na drodze chemisorpcji lub adsorpcji fizycznej,
- zaadsorbowane cząsteczki adsorbentu tworzą warstwę cząsteczek oddziałujących z miejscami adsorpcyjnymi adsorbentu, natomiast nie oddziałują między sobą,
- energia adsorpcji jest stała, ustala się stan równowagi, w którym liczba cząsteczek adsorbujących na miejscach adsorpcyjnych w jednostce czasu równa jest liczbie cząsteczek ulegających desorpcji.

Izoterma adsorpcji Langmuira jest podstawowym i najbardziej rozpowszechnionym równaniem adsorpcji, które można uważać za równanie wyjściowe do szeregu bardziej szczegółowych opracowań. Poniżej podano postać liniową równania izoterm Langmuira:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_0 b} + \frac{C_e}{Q_0}$$

gdzie: C_e – stężenie równowagowe adsorbentu [mg/L], Q_0 – maksymalna pojemność monowarstwy [mg/g], b – stała Langmuira [L/mg], q_e – ilość zaadsorbowanej substancji w stanie równowagi i po czasie sorpcji t (min) [mg/g],

Charakterystyczną cechą izoterm Langmuira jest bezwymiarowy współczynnik separacji R_L , który można obliczyć następująco:

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_0}$$

gdzie C_0 – początkowe stężenie adsorbentu [mg/L], b – jest to stała Langmuira [L/mg]. Ponadto wartość bezwymiarowego współczynnika R_L określa kształt izoterm: niekorzystny ($R_L > 1$), liniowy ($R_L = 1$), korzystny ($0 < R_L < 1$) lub nieodwracalny ($R_L = 0$) (Hameed, El-Khaiary 2008).

2.2 Model Freundlicha

Izoterma Freundlicha to równanie o charakterze eksperymentalnym dobrze opisujące adsorpcję na powierzchniach heterogenicznych (energetycznie niejednorodnych) oraz na adsorbentach mikroporowatych. Jest ona stosowana do opisu odwracalnej adsorpcji i nie jest ograniczona do tworzenia pojedynczej warstwy. Model Freundlicha można opisać za pomocą następującego równania:

$$\log q_e = \log k_F + \frac{1}{n} \log C_e$$

gdzie: C_e – stężenie równowagowe adsorbentu [mg/L], k_F – stała Freundlicha [mg/g], $1/n$ – jest parametrem charakteryzującym heterogeniczność energetyczną powierzchni adsorbentu, q_e – ilość zaadsorbowanego barwnika w stanie równowagi i po czasie sorpcji t (min) [mg/g].

Wartość $1/n > 1$ wskazuje na słabe wiązanie pomiędzy cząsteczkami adsorbentu i adsorbentu, natomiast wartość $1/n < 1$ wskazuje na silne wiązanie adsorpcyjne w wyniku silnego międzycząsteczkowego przyciągania w warstwach adsorbentu. W układach rzeczywistych występuje często ograniczone dopasowanie danych eksperymentalnych do teoretycznych, ponieważ izoterma Freundlicha ma charakter empiryczny (Freundlich 1906).

2.3 Model Temkina

Model izotermy Temkina wykorzystywany jest do opisu adsorpcji na heterogenicznym ciele stałym. Model ten wyjaśnia interakcje pomiędzy adsorbentem i adsorbentem oraz wskazuje na ciągły i nieskończony rozkład energii miejsc adsorpcyjnych. Równanie Temkina zakłada, że ciepło adsorpcji wszystkich cząsteczek w warstwie zmniejsza się liniowo czego powodem może być interakcja adsorbent-adsorbat, a adsorpcję charakteryzuje równomierne rozprzeczanie energii wiązania. Równanie izotermy Temkina przedstawiono poniżej (Temkin i Pyzhev 1940):

$$q_e = \frac{RT}{b_T} \ln A + \frac{RT}{b_T} \ln C_e$$

gdzie: b_T – stała Temkina związana z ciepłem sorpcji (J/mol), A – stała izotermy Temkina [L/g], R – stała gazowa [8,31 J/mol·K], T – temperatura [K].

3. Przegląd literatury

Barwniki (substancje barwiące) są to związki pochodzenia naturalnego i syntetycznego, które nadają barwę innej substancji pozbawionej barwy lub też zmieniające barwę substancji posiadającej już jakąś barwę. Można je podzielić na trzy kategorie:

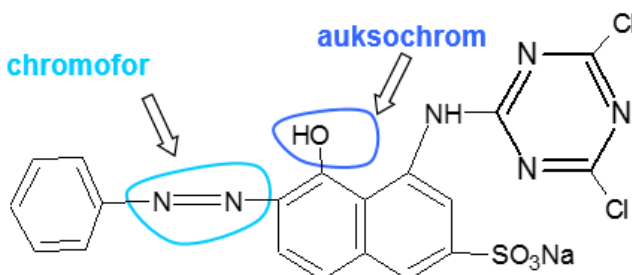
- a) anionowe: kwasowe, bezpośrednie i reaktywne barwniki;
- b) kationowe: podstawowe barwniki;
- c) niejonowe: dyspersyjne barwniki.

Barwniki reaktywne zawierające chromofory azowe mają dobre właściwości wytrzymałościowe dzięki kowalencyjnemu wiązaniu, które zachodzi podczas barwienia. Barwniki reaktywne są najczęściej stosowane do barwienia celulozy, np. bawełny lub lnu. Barwienie reaktywne jest najważniejszą metodą barwienia włókien celulozowych. Barwniki reaktywne można również nakładać na wełnę i nylon; w tym drugim przypadku stosuje się je w warunkach słabo kwasowych. Cechami charakterystycznymi cząsteczki barwnika reaktywnego są: ugrupowanie chromoforowe (odpowiadające za kolor), system reaktywny, który umożliwia barwnikom tworzenie wiązań kowalencyjnych między barwnikiem a podłożem, grupa mostkująca, która łączy układ reaktywny z chromoforem oraz grupy solubilizujące, jedna lub więcej grup nadająca barwnikom rozpuszczalność.

Ugrupowanie reaktywne jest przyłączone bezpośrednio do chromoforu, a większość układów reaktywnych zawiera pierścień heterocykliczny. Charakter grupy mostkowej i innych podstawników w pierścieniu heterocyklicznym ma duży wpływ na reaktywność i inne cechy barwników reaktywnych (Rys.2.).

Barwniki reaktywne mają niski stopień wykorzystania w porównaniu do innych rodzajów barwników, ponieważ grupa funkcyjna wiąże się również z wodą, powodując hydrolizę. Barwniki

reaktywne należą do dość problematycznych związków obecnych w ściekach włókienniczych, ponieważ są one rozpuszczalne w wodzie i znajdują się w ściekach w wyższych stężeniach niż inne klasy barwników. Szacuje się, że 10–20% barwników reaktywnych pozostaje w nich ściekach podczas produkcji tkanin barwnych (Stiepanow 1980).



Rys. 2. Struktura cząsteczki czerwieni reaktywnej 2 z ukazaniem auksochromu i chromoforu.

Greluk i Hubicki (Greluk, Hubicki 2010) zastosowali silnie zasadowe, poliakrylowe wymieniacze jonowe Amberlite IRA-458 i Amberlite IRA-958 do usuwania czerni reaktywnej 5 z roztworów wodnych (Rys.3). Czas potrzebny do ustalenia równowagi wynosił 180 min dla każdego jonitu. Ilość barwnika zaadsorbowanego na Amberlite IRA-458 i Amberlite IRA-958 była uzależniona od stężenia początkowego barwnika w zakresie 50–500 mg/L. Kinetyka procesu sorpcji najlepiej została opisana przez model kinetyczny pseudo drugiego rzędu w całym zakresie badanych stężeń barwnika. Zbadano wpływ temperatury 298, 308, 318 K, przy czasie kontaktu faz 180 min. na adsorpcję czerni reaktywnej 5 na wymieniaczach anionowych. W przypadku Amberlite IRA-458 wraz ze wzrostem temperatury rośnie ilość barwnika zaadsorbowanego w stanie równowagi w całym zakresie badanej temperatury. Natomiast ilość barwnika zaadsorbowana w stanie równowagi na Amberlite IRA-958 rośnie w zakresie temperatur 298-308 K. Dalszy wzrost temperatury ma negatywny wpływ na proces adsorpcji.

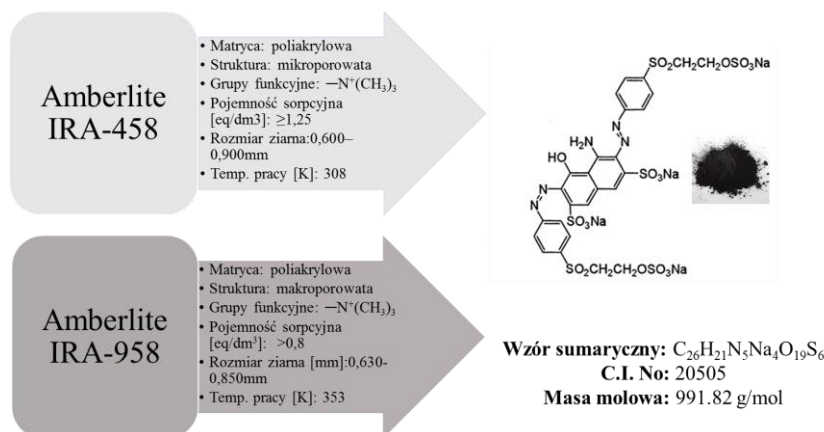
W celu zoptymalizowania procesu adsorpcji zostały wyznaczone parametry izoterm adsorpcji. Do tego celu wykorzystano dwa znane i szeroko stosowane równania, a mianowicie Langmuira i Freundlicha. Kształt izoterm jest bardzo korzystny: początkowo krzywa jest nachylona stromo co może wskazywać na duże powinowactwo materiału do cząsteczki barwnika. Wysokie wartości współczynników korelacji wskazują na fakt, że adsorpcja barwnika anionowego zachodzi zgodnie z modelem adsorpcji Langmuira. Parametry tego modelu były w dużej mierze uzależnione od rodzaju struktury jonitu i temperatury. Wpływ temperatury na usuwanie barwnika wykazał, że maksymalną wydajność adsorpcji uzyskano w temp. 318 i 308 K. Wartości te wynosiły dla Amberlite IRA-458 i Amberlite IRA-958 odpowiednio 1295,93 mg/g i 1723,964 mg/g (Tab.2.).

Tab.2. Zmiany pojemności sorpcyjnych Amberlite IRA-458 i Amberlite IRA-958 w stosunku do czerni reaktywnej wraz ze wzrostem temperatury.

Temperatura [K]	Pojemności sorpcyjne [mg/g]	
	Amberlite IRA-458	Amberlite IRA-958
298	854,32	972,56
308	1007,36	1723,64
318	1295,93	1555,97

Amberlite IRA-958 wykazał dużo większą pojemność sorpcyjną w stosunku do badanego barwnika w porównaniu do Amberlite IRA-458 co może być powodem odmiennej struktury. Amberlite IRA-458 ma strukturę żelowatą, natomiast Amberlite IRA-958 jest jonitem makroporowatym. Amberlite IRA-958 jako anionit makroporowaty posiada znaczące wartości porowatości w porównaniu z żelowym Amberlite IRA-458 o porowatości nie większy niż około 4 nm. Sorbenty o strukturze porowatej łatwiej adsorbują duże cząsteczki takie jak barwniki. Pomimo

to, zarówno Amberlite IRA-958 jak i Amberlite IRA-458 mają znacznie większe pojemności adsorpcyjne w porównaniu do innych sorbentów. Stała Langmuira b jest związana z energią swobodną i wskazuje powinowactwo adsorbentów do adsorbatu. Jego wartość jest odwrotnością stężenia barwnika, przy którym zostaje osiągnięta połowa nasycenie adsorbentu. W związku z tym duża wartość b wskazuje stromy początek izotermy, który odzwierciedla duże powinowactwo adsorbentów do adsorbatu, a w konsekwencji zapewnia stabilność układu.



Rys.3. Właściwości fizykochemiczne Amberlite IRA-458 i Amberlite IRA-958 oraz struktura czerni reaktywnej 5.

Otręby ryżowe są głównym produktem ubocznym przemysłu młynarskiego w Tajwanie. Hong i Wang (Hong, Wang 2017) zaproponowali prostą metodę modyfikacji otrębów ryżowych w celu uzyskania taniego adsorbentu do usuwania błękitu reaktywnego 4 (RB4) z roztworów wodnych. Zbadali wpływ stężenia barwnika (100–500 ppm), dawki adsorbentu (20–120 mg) i temperatura (303–333K) na zdolność adsorpcji barwnika na zmodyfikowanych otrębach ryżowych. Wyniki wykazały, że maksymalna zdolność adsorpcji wynosiła 151,3 mg/g (stężenia barwnika 500 ppm, dawki adsorbentu 65,36 mg, temperatury 333K. Kinetyka adsorpcji była zgodna z modelem pseudo drugiego rzędu, a izotermę opisano stosując model Langmuira. Maksymalna pojemność monowarstwy wyniosła 178,57–185,19 mg/g.

Ong i in. (Ong, Lee, Zainal 2007) zastosowali także otręby ryżowe do usunięcia błękitu zasadowego 3 (BB3) i oranżu reaktywnego 16 (RO16) z roztworów wodnych. Łuskę ryżową poddali modyfikacji za pomocą etylenodiaminy w celu wprowadzenia miejsc aktywnych na jej powierzchni, aby umożliwić adsorpcję zarówno barwników zasadowych, jak i reaktywnych. Sorpcja BB3 i RO16 na łusce ryżowej modyfikowaną etylenodiaminą (MRH) była badana w różnych warunkach. Sorpcja barwnika była uzależniona od pH i stężenia. Jednoczesne usuwanie BB3 i RO16 zachodziło przy pH większym niż 4. Kinetyka sorpcji barwników była zgodna z modelem pseudo drugiego rzędu. Wzrost szybkości mieszania nie miał wpływu na sorpcję BB3, ale zaobserwowano zwiększoną retencję RO16 na MRH. Zmniejszenie wielkości cząstek zwiększyło adsorpcję barwników w binarnych roztworach modelowych barwników. Dane eksperymentalne dotyczące równowagi były zgodne zarówno z modelem izotermy Langmuira, jak i Freundlicha. Maksymalne zdolności sorpcyjne obliczone na podstawie modelu Langmuira wynoszą odpowiednio 14,68 i 60,24 mg/g dla BB3 i RO16.

4. Podsumowanie

Wymieniacze jonowe charakteryzują się dużo większą pojemnością sorpcyjną w porównaniu do sorbentów typu „low-cost”. Procesy równowagowe opisywane są najczęściej za pomocą izoterm Langmuira i Freundlicha. Natomiast najczęściej dane eksperymentalne są zgodne z modelem Langmuira.



Rys. 4. Łuski ryżowe jako adsorbent zastosowany do usuwania barwników zasadowych i reaktywnych.

5. Literatura

- Bezák-Mazur E, Adamczyk D (2010) Adsorpcja mieszaniny dwóch barwników na węglu aktywnym. *Proceedings of ECOpole 4(2)*: 307–311.
- Błaszczak MK (2007) *Mikroorganizmy w ochronie środowiska*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Freundlich HMF (1906) Ober dies adsorption in Losungen. *The Journal of Physical Chemistry* 57: 385-470.
- Greluk M (2013) Zastosowanie jonitów, membran jonowymiennych, sorbentów polimerowych oraz biopolimerów w procesie usuwania barwników kwasowych i reaktywnych z roztworów wodnych. *Przemysł Chemiczny* 92:469-478.
- Greluk M, Hubicki Z (2010) Kinetics, isotherm and thermodynamic studies of Reactive Black 5 removal by acid acrylic resins. *Chemical Engineering Journal* 162:919–926.
- Hameed BH, El-Khaiary MI (2008) Equilibrium, kinetics and mechanism of Malachite Green adsorption on activated carbon prepared from bamboo by K₂CO₃ activation and subsequent gasification with CO₂. *Journal of Hazardous Materials* 157: 344-351.
- Hessel C, Allegre C, Maisseu M et al (2007) Guidelines and Legislation for Dye House Effluents. *Journal of Environmental Management* 89:171 – 180.
- Hong G-H, Wang Y-K (2017) Synthesis of low-cost adsorbent from rice bran for the removal of reactive dye based on the response surface methodology. *Applied Surface Science* 423: 800-809.
- Ong ST, Lee CK, Zainal Z (2007) Removal of basic and reactive dyes using ethylenediamine modified rice hull. *Bioresource Technology* 98: 2792-2799.
- Stiepanow I (1980) *Podstawy chemii i technologii barwników organicznych*, WNT, Warszawa
- Temkin MJ, Pyzhev V (1940) Recent Modifications to Langmuir Isotherms. *Acta Physiochim URSS* 12: 217-225.

13. Zmiany stężenia rtęci w powietrzu nad Polską w latach 2011-2017 na podstawie wyników pomiarów w wybranych lokalizacjach miejskich i pozamiejskich

Variability of mercury concentration in the air over Poland in the years 2011-2017 based on the results of measurements in selected urban and non-urban locations

Słaby Krzysztof, Pyta Halina

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN, Zabrze

Słowa kluczowe: jakość powietrza, Śląsk, monitoring Hg

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki długoterminowego, automatycznego monitoringu rtęci atmosferycznej (Hg) na dwóch stacjach w województwie śląskim, o zróżnicowanej strukturze emisyjnej (tzw. tło miejskie i pozamiejskie). Pierwsza stacja zlokalizowana jest w Zabrzu, w centrum 2-milionowej Aglomeracji Górnośląskiej, druga – w Złotym Potoku (wieś w gminie Janów, pow. częstochowski). Na potrzeby analizy porównawczej przedstawiono również wyniki monitoringu Hg ze stacji Granica (wieś w otulinie Kampinoskiego Parku Narodowego), gdzie obserwuje się najniższe stężenia Hg w Polsce. Wyniki pomiarów w Zabrzu wskazują na wyraźną tendencję spadkową stężenia całkowitej rtęci gazowej (TGM), z poziomu $3,3 \text{ ng m}^{-3}$ w 2011 r. do $2,1 \text{ ng m}^{-3}$ w 2017 r. Prawdopodobnie jest to rezultat redukcji lokalnej emisji Hg z przemysłu i źródeł energetyki zawodowej w efekcie wdrożenia bardziej restrykcyjnego prawodawstwa UE (Dyrektywa w sprawie emisji przemysłowych IED, konkluzje BAT). Rozkłady TGM w Złotym Potoku i Granicy okazały się bardziej stabilne, bez widocznego trendu, a średnie 7-letnie stężenia TGM wynosiły odpowiednio $1,8 \text{ ng m}^{-3}$ i $1,4 \text{ ng m}^{-3}$. Wyższe stężenia w Złotym Potoku wynikały z adwekcji zanieczyszczonych rtęcią mas powietrza znad Aglomeracji Górnośląskiej.

1. Wstęp

Rtęć jest pierwiastkiem występującym w środowisku, w postaci metalicznej (rtęć elementarna Hg^0 w stanie ciekłym lub gazowym), w formie związków nieorganicznych (np. HgCl_2 , HgS) lub połączeń organicznych, alkilopochodnych (metylo- i etylortęć, MeHg i EtHg). Cechuje ją wysoka aktywność chemiczna i biologiczna. Jakkolwiek występuje zwykle w ilościach śladowych, to z uwagi na swoją mobilność (substancja trwale zanieczyszczająca środowisko), stanowi zagrożenie dla organizmów żywych, gdyż nie podlega biodegradacji i kumuluje się w łańcuchach troficznych. Tzw. biomagnifikacja dotyczy w szczególności najbardziej niebezpiecznej metylortęci, która powstaje w procesie metylacji wcześniej zdeponowanych nieorganicznych form Hg w środowisku wodnym lub glebowym, na skutek aktywności mikrobiologicznej (Lehnherr 2014).

Rtęć jest powszechnie znaną neurotoksyną. Pary rtęci Hg^0 oraz związki Hg działają toksycznie na układ nerwowy centralny i obwodowy, ale również - na układ krążenia, dokrewny, szkieletowy, moczowy, płciowy oraz immunologiczny. Jednak biodostępność, ścieżki biotransformacji i kinetyka przemian rtęci zależą od jej formy specyficjnej, stężenia i długości ekspozycji. Szacuje się, że dorosły człowiek pochłania w ciągu doby od 3900 do 21000 ng Hg^0 , ok. 4200 ng nieorganicznych związków Hg oraz 2400 ng organicznych pochodnych Hg. Podstawowa część pochłoniętej dawki pochodzi z amalgamatowych wypełnień dentystycznych i żywności. W wyniku inhalacji z powietrza pobieramy od 40 do 200 ng Hg/dobę. Woda do picia dostarcza śladowej ilości nieorganicznych związków Hg (Lippmann 2009).

Rtęć dostaje się do organizmu człowieka głównie drogą pokarmową (MeHg , nieorganiczne sole Hg) oraz przez inhalację (pary Hg^0 , nieorganiczne sole). Związki organiczne są efektywnie wchłaniane z przewodu pokarmowego (ok. 95% dawki), pary Hg^0 – z płuc (80%). W przypadku ostrych zatruc Hg^0 (np. na stanowiskach pracy) może wystąpić niewydolność układu oddechowego, a przy chronicznym narażeniu – symptomy dysfunkcji centralnego układu nerwowego (Hg pokonuje

barierę krew-mózg), np. depresja, chwiejność emocjonalną, zaburzenia pamięci, samoistne drżenia, pojawienie się/zaostrenie objawów stwardnienia zanikowego bocznego, rozsianego, chorób Parkinsona i Alzheimer. Zatrucia nieorganicznymi solami Hg (głównie ostre zatrucia $HgCl_2$), przebiegają z objawami zapalenia przewodu pokarmowego i niewydolności nerek. (Kot i in. 2016). Zatrucia metaloorganiczną postacią Hg, przebiegają z objawami ze strony centralnego układu nerwowego i krążenia (nadciśnienie, wzrost czynników krzepnięcia krwi, miażdżyca, zawał). Najbardziej narażone na MeHg są populacje, których dieta obfituje w ryby, owoce morza, ssaki morskie lub ryż. MeHg pokonuje barierę krew/mózg i krew/łożysko, a stężenie Hg w krwi i w tkankach mózgu płodu i niemowląt zwykle jest wyższe niż w organizmach matek poddanych intoksykacji (Piotrowski 2006).

Zatrucie rtęcią może mieć charakter ostry, wskutek niekontrolowanych uwolnień do środowiska lub chroniczny, z powodu zagrożeń na stanowiskach pracy czy nadzwyczajnego skażenia środowiska Hg w rejonach pozyskiwania złota. Wg aktualnego stanu wiedzy, inhalacyjna ekspozycja populacji generalnej na przeciętne poziomy stężenia rtęci atmosferycznej nie stwarza zagrożenia dla zdrowia.

Rtęć jest uwalniana do atmosfery z naturalnych procesów odgazowania skorupy ziemskiej - erupcji wulkanicznych i aktywności geotermalnej, z erozji skał i gleb, z wód powierzchniowych (uwalnianie z osadów dennych), śniegu i lodu, z ekosystemów zielonych, z pożarów lasów i stepów. Głównymi źródłami antropogenicznej emisji Hg są w skali globalnej procesy związane z pozyskiwaniem złota, spalanie paliw kopalnych do celów produkcji energii i ciepła, przetwórstwo rud metali kolorowych oraz żelaza, produkcja cementu (AMAP/UNEP 2013). Znaczny udział w środowiskowym (biogeochemicznym) obiegu rtęci ma naturalna i antropogeniczna reemisja depozytu Hg w oceanach i obszarach kontynentalnych. Wg różnych źródeł, naturalna emisja Hg na świecie wynosi od 3600 Mg rocznie do 5300 Mg rocznie (Sundseth i in. 2017). Najnowsze dane, w których uwzględniono reemisję, podają, że jest to 5207 Mg rocznie (Pacyna i in. 2016). Natomiast ostatni raport AMAP/UNEP donosi, że globalna emisja antropogeniczna stanowi 1960 Mg na rok (AMAP/UNEP 2013). Tak więc jest to istotny czynnik zakłócający aktualny bilans obiegu Hg. Potwierdzają to badania geologiczne zawartości rtęci w próbach ziemi, osadów dennych i rdzeni lodowych, które pokazały, że jej depozycja jest obecnie 3 - 6 razy wyższa niż w epoce przedindustrialnej, tj. ~1850 r. (Mason i in. 1995). Jest to szczególnie niebezpieczne w kontekście postępującego ocieplenia klimatu, gdyż może doprowadzić do uwolnienia ogromnych ładunków rtęci z dna mórz i oceanów, pokrywy lodowej, obszarów tundry i włączenia jej do łańcucha pokarmowego człowieka oraz do reemisji Hg do atmosfery. Jakkolwiek atmosferyczne stężenie całkowitej rtęci gazowej (TGM, ang. *Total Gaseous Mercury*) w warunkach tzw. tła zanieczyszczeń jest względnie niskie (na półkuli północnej przeciętnie 1,5-1,7 ng m⁻³) (Lindberg i in. 2007), to jego monitorowanie w atmosferze jest jak najbardziej uzasadnione, zarówno w obszarach „tłowych”, jak i gęsto zaludnionych, narażonych na bezpośrednie oddziaływanie licznych źródeł emisji Hg. Rozprzestrzenianie w powietrzu jest bowiem główną drogą przenoszenia Hg pomiędzy różnymi komponentami środowiska. Kontrola obecności tego toksycznego pierwiastka w powietrzu ma więc charakter wskaźnikowy dla oceny stopnia skażenia całego środowiska i zagrożenia zdrowia ludzi, zwłaszcza w skali lokalnej i regionalnej. Natomiast długi czas życia dominującej w powietrzu gazowej formy elementarnej Hg^0 sprawia, że rtęć traktowana jest również jak zanieczyszczenie o zasięgu globalnym, wymagające podjęcia działań na szczeblu międzynarodowym. Takie podejście doprowadziło do uruchomienia specjalnych programów monitoringu różnych form rtęci atmosferycznej w USA, Kanadzie i w krajach skandynawskich. W Europie TGM była mierzona od 1999 r. w ramach programu EMEP (*European Monitoring and Evaluation Program*). EMEP-owska sieć monitoringu uległa rozbudowie po wdrożeniu dyrektywy 2004/107/WE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie arsenu, kadmu, rtęci, niklu i wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w otaczającym powietrzu oraz w związku z realizacją projektu 7 Programu Ramowego UE pn. *Global Mercury Observation System* (GMOS). W celu zapewnienia porównywalności wyników, w 2010 r. opracowano referencyjne metodyki pomiaru stężenia TGM i depozycji rtęci atmosferycznej. Wcześniej, w 2006 r., Europejski Komitet Normalizacyjny CEN określił również standardy w zakresie pobierania próbek i oznaczania zawartości rtęci ogólnej

w gazach odlotowych. W 2010 r. zatwierdzona została dyrektywa 2010/75/UE Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie emisji przemysłowych (dyrektywa IED), którą przepisano do prawa polskiego i wprowadza obowiązek kontroli Hg w gazach odlotowych ze spalania węgla kamiennego lub brunatnego. Do tej pory zawartość rtęci oznaczano obligatoryjnie tylko w gazach odlotowych ze spalania/współspalania odpadów. W 2013 r. została przyjęta, wdrożona w 2017 r., międzynarodowa konwencja w sprawie redukcji emisji Hg (konwencja Minamata). Rtęć pojawiła się w unijnych konkluzjach BAT (*Best Available Techniques*) dla przemysłu oraz w sprawozdawczości systemu EPRTTR (*European Pollutant Release and Transfer Register*). Tak więc problem rtęci w powietrzu – kontrolowania jej emisji i monitorowanie stężenia jest coraz bardziej aktualny, zwłaszcza w kontekście wysokiej emisji tego pierwiastka w Polsce na tle innych krajów UE.

W niniejszej pracy przedstawiono wybrane wyniki 7-letniej serii pomiarów stężenia TGM w Zabrzu – jedyne w Europie Centralnej stanowiska kontroli stężenia rtęci w warunkach aglomeracji miejsko-przemysłowej oraz w Złotym Potoku i Granicy, dwóch stacji pozamiejskich, należących do Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska, z których pierwsza to stacja tła regionalnego dla woj. śląskiego, a druga - to stacja tła dla woj. mazowieckiego, gdzie od lat obserwuje się najniższe w Polsce stężenia TGM.

2. Lokalizacja stacji i metodyka pomiarowa

Stanowisko w Zabrzu należy do Instytutu Podstaw Inżynierii Środowiska PAN (IPIŚ PAN) i znajduje się na jego terenie. Położone w aglomeracji Górnego Śląska Zabrze, charakteryzuje się wysoką gęstością zaludnienia oraz najniższym w aglomeracji wskaźnikiem ucieplownienia. W obrębie miasta lub bezpośrednim jego sąsiedztwie funkcjonują elektrownia i elektrociepłownię, koksownię i węglowe kotłownie przemysłowe. IPIŚ PAN leży poza centrum Zabrze, w dzielnicy mieszkaniowej - głównie bloki mieszkalne z ogrzewaniem centralnym. W odległości 150-200 m na południe znajduje się osiedle niskich budynków komunalnych z indywidualnymi paleniskami węglowymi. Dalej w kierunku południowym i południowo-wschodnim zlokalizowane jest centrum miasta ze starą zabudową mieszkalną (paleniska węglowe). Stanowisko pomiarów Hg znajduje się w 2-kondygnacyjnym budynku Instytutu, z czerpnią na wysokości ok. 14 m n.p.t., co pozwoliło wyeliminować zakłócający, aerodynamiczny lub emisyjny, wpływ przegród budowlanych, terenowych, roślinności, gleby itp.

Automatyczna stacja monitoringu w Złotym Potoku stanowi własność Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska w Warszawie (GIOŚ). Pomiary Hg wykonują służby Wydziału Monitoringu Inspekcji Ochrony Środowiska w Katowicach. Złoty Potok (gmina Janów w pn-wsch części woj. śląskiego) leży w odległości ok. 20 km na południowy wschód od Częstochowy, 25 km na północ od Zawiercia i 60 km na północny wschód od Zabrze. Bezpośrednie otoczenie stacji stanowią łąki i pola uprawne. Stacja ma status stacji tła regionalnego.

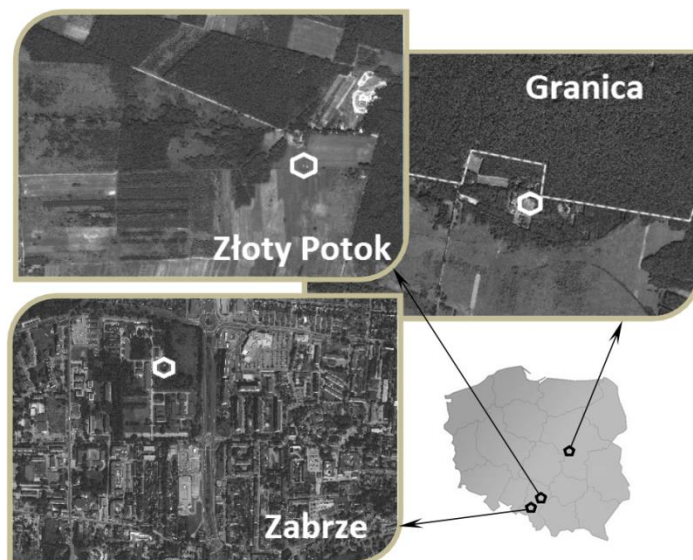
Pomiary Hg w automatycznej stacji monitoringu powietrza w Granicy wykonują służby Wydziału Monitoringu Inspekcji Ochrony Środowiska w Warszawie, a stacja, podobnie jak w Złotym Potoku, należy do GIOŚ. Granica to niewielka osada na skraju Puszczy Kampinoskiej, na północny-zachód od Warszawy. Otoczenie stacji stanowi od północy ekosystem lasów mieszanych, od południa – łąki i tereny upraw rolniczych. Wysokość czerpni powietrza w obu stacjach GIOŚ wynosi ok. 4 m n.p.t. Lokalizację analizowanych stanowisk pomiarowych Hg ilustruje Rys. 1.

Stężenie Hg mierzono na opisanych wyżej stanowiskach za pomocą automatycznego analizatora Tekran 2537B, który działa na zasadzie amalgamacji gazowej rtęci na powierzchni stałego złoża pokrytego złotem, z termodesorpcją zatężonych par Hg i ich detekcją metodą atomowej spektroskopii fluorescencyjnej w układzie zimnych par, przy długości fali $\lambda=253.7$ nm.

W stacjach Granica i Złoty Potok mierzone jest stężenie tzw. całkowitej rtęci gazowej TGM (*Total Gaseous Mercury*), a Tekran 2537B pracuje jako samodzielny moduł detekcji, który w trybie co 5 minut przesyła wynik pomiaru do loggiera stacyjnego. Na stanowisku w Zabrzu, Tekran 2537B stanowi główny moduł detekcji trzech form specjacyjnych - gazowej rtęci elementarnej Hg⁰, oznaczanej w trybie roboczym jako GEM (*Gaseous Elemental Mercury*), gazowej rtęci utlenionej GOM (*Gaseous Oxidized Mercury*) oraz rtęci związanej z cząstkami stałymi. Specjacja Hg zachodzi sekwencyjnie na etapie pobierania próbki, w obrębie dwóch dodatkowych modułów 1130 i 1135.

Wszystkie formy Hg są odzyskiwane termicznie i oznaczane w module detekcji jako Hg^0 (GEM). Cykl pomiarowy 3-modułowego układu pomiarowego trwa 2h i składa się z 1-godzinnej fazy pobierania próbek, z jednoczesnym oznaczaniem Hg^0 (GEM) co 5 minut (łącznie 12 oznaczeń w ciągu 1h) oraz z 1-godzinnej fazy desorpcji formy utlenionej GOM. W tym układzie pomiarowym TGM=GEM+GOM, przy czym GOM stanowi maksymalnie 5% TGM, przeciętnie 1% (Driscoll i in. 2013). Liczba 1h wyników pomiarów stężenia TGM jest w takim układzie o połowę mniejsza niż liczba danych z analizatora 1-modułowego.

Do rutynowej (codziennej) kalibracji Tekran 2537B wykorzystuje wewnętrzne źródło permeacyjne rtęci. Precyzja analizatora deklarowana przez producenta wynosi 2%, a granica oznaczalności Hg^0 dla warunków pomiarowych na każdym stanowisku - $0,06 \text{ ng m}^{-3}$ (Tekran, 2008).



Rys. 1. Lokalizacja ogólna i szczegółowa stanowisk pomiaru stężenia gazowej rtęci.

3. yniki i dyskusja

Podstawowe statystyki opisowe serii 1-godzinnych pomiarów stężenia TGM zestawiono w Tab. 1. Typowy dla przeciętnej doby pomiarowej charakter zmienności stężenia TGM ilustruje Rys. 1. Średnie stężenie TGM w Zabrzu było ponad 1,5-krotnie wyższe niż w stacji Złoty Potok i 2-krotnie wyższe niż w Granicy. Znacznie wyższa była też dyspersja wyników wokół wartości średniej. Współczynnik zmienności stężenia TGM dla Zabrza wynosił 89%, a w przypadku stacji tła pozamiejskiego, odpowiednio 28 i 26% dla Złotego Potoku i Granicy. Charakter sezonowego rozkładu stężenia TGM pokazuje Rys. 3.

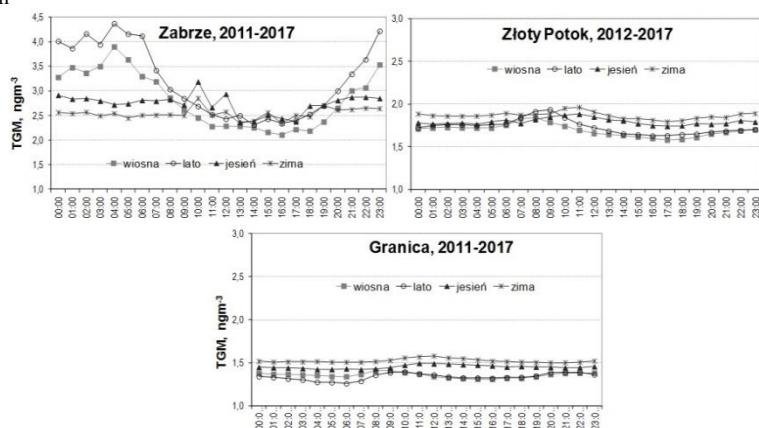
W przypadku Zabrza, wyższe stężenia TGM obserwowano w okresie wiosenno-letnim niż jesienią i zimą, co wydaje się sprzeczne z charakterem głównych źródeł emisji (spalanie węgla), których wydajność rośnie w sezonie grzewczym. Jest to efekt nakładania się (1) dobowej cykliczności parametrów meteorologicznych oraz (2) wyniesienia czerpni. Pierwsze - skutkuje dobowymi cyklami zmian stężenia Hg z maksimum przed wschodem słońca (Rys. 4), które występują w miesiącach od kwietnia do września i były obserwowane również w innych miejskich lokalizacjach na świecie (Stamenkovic i in. 2007). Drugie – powoduje, że w sezonie grzewczym nie rejestruje się wysokich stężeń, powodowanych przez lokalne, najczęściej wysokie emitory energetyki zawodowej i komunalnej, z powodu nieciągłości inwersyjnych na drodze transportu Hg do receptora. W przypadku Złotego Potoku i Granicy, wyższe stężenia TGM w ciągu doby notowano w sezonie grzewczym. Warto zwrócić uwagę na podobne godziny występowania maksimum dobowego TGM w obu lokalizacjach pozamiejskich (w sezonie grzewczym pomiędzy 10:00 a 12:00, w sezonie letnim

pomiędzy 8:00 a 10:00), co potwierdza istotne znaczenie czynników meteorologicznych w kształtowaniu rozkładu stężenia TGM.

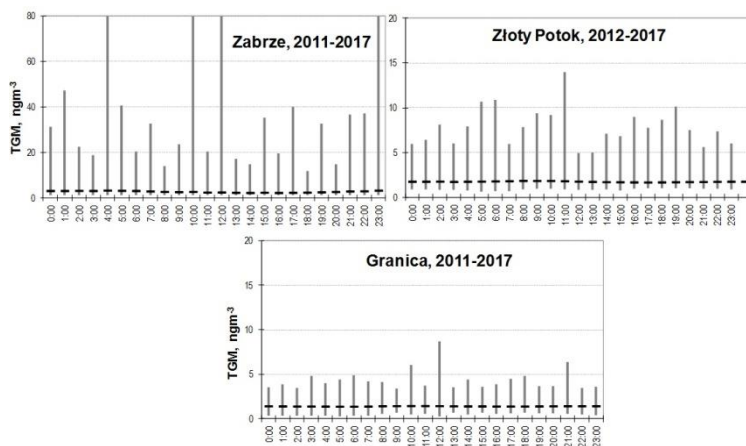
Tab. 1. Parametry statystyczne serii 1h pomiarów stężenia TGM w Zabrze, Złotym Potoku i Granicy, w latach 2011-2017.

Rok	Stężenie TGM [ng m^{-3}]								
	Zabrze			Złoty Potok			Granica		
	średnia	odchyl.	maks.	średnia	odchyl.	maks.	średnia	odchyl.	maks.
2011	3,32	1,74	40,60	b.d.	b.d.	b.d.	1,52	0,37	3,67
2012	3,46	3,67	116,91	1,83	0,53	10,68	1,76	0,36	4,21
2013	3,04	2,64	99,39	1,76	0,47	5,82	1,43	0,36	8,70
2014	2,95	3,90	199,37	1,67	0,48	14,01	1,20	0,25	4,70
2015	2,52	1,54	22,64	1,81	0,46	8,52	1,32	0,32	4,79
2016	2,28	0,92	17,17	1,66	0,45	7,84	1,27	0,32	6,36
2017	2,11	0,83	11,27	1,88	0,52	9,20	1,39	0,28	3,29
łącznie	2,83	2,52	199,37	1,77	0,49	14,01	1,41	0,37	8,70

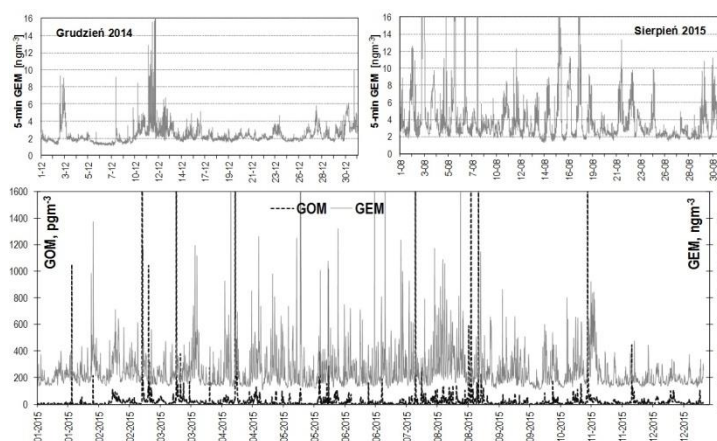
b.d. – brak danych



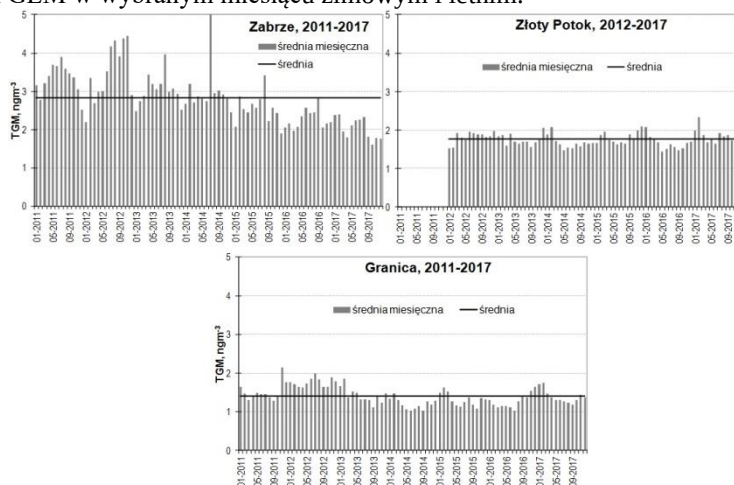
Rys. 2. Dobowy rozkład 1h stężeń TGM w Zabrze, Złotym Potoku i Granicy, w układzie minimum – średnia – maksimum.



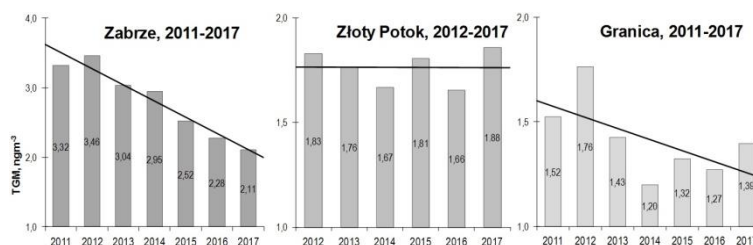
Rys. 3. Dobowy rozkład 1h stężeń TGM w Zabrze, Złotym Potoku i Granicy, w kolejnych porach roku.



Rys. 4. Przykładowa roczna seria 1h pomiarów stężenia GEM i GOM w Zabrze oraz serie 5-min. stężen GEM w wybranym miesiącu zimowym i letnim.



Rys. 5 Serie średnich miesięcznych stężeń TGM w Zabrze, Złotym Potoku i Granicy w latach 2011-2017.



Rys. 6 Liniowy trend zmian średniorocznego stężenia TGM w Zabrze, Złotym Potoku i Granicy w latach 2011-2017.

Analiza chronologicznych serii średnich miesięcznych stężeń TGM w Zabrze pozwoliła zauważyć dość wyraźny spadek stężenia, który postępuje od początku 2013 r. i odbywa się kosztem wyższych poziomów w sezonie letnim (Rys. 5). Niewielką redukcję stężenia można było

zaobserwować również na stacji tła pozamiejskiego w Granicy, podczas gdy w Złotym Potoku stężenie TGM wydawało się utrzymywać na stałym poziomie. Charakter zmian średniorocznego stężenia TGM, aproksymowany liniową funkcją trendu za okres 2011-2017 (przy poziomie istotności $\alpha=0,05$), pokazano na Rys. 6, który potwierdził powyższe obserwacje. Podwyższony poziom tła w Złotym Potoku może wynikać ze stałego dopływu Hg z aglomeracji Górnego Śląska (dominująca cyrkulacja południowo-zachodnia), co uniemożliwia redukcję stężenia TGM, podobną do tej w Granicy. Warto zauważyć, że w stacjach pozamiejskich, na średnioroczne stężenie TGM wpływa głównie sytuacja w sezonie grzewczym. Widać to na przykładzie smogu jesienią 2015 r. oraz smogu z przełomu stycznia/lutego 2017 r. Stały i znaczący spadek stężenia TGM w Zabrzu, z redukcją częstości i wielkości epizodów wysokiego stężenia jest prawdopodobnie efektem działań, związanych z redukcją emisji Hg oraz innych (współwystępujących) zanieczyszczeń z dużych i średnich źródeł energetycznego spalania paliw oraz z procesów przemysłowych, innych niż spalanie, wskutek wdrożenia w Polsce szeregu nowych, bardziej restrykcyjnych uregulowań prawnych UE (dyrektywa IED, dyrektywa MCP, konkluzje BAT).

4. Wnioski

- a) Najwyższe stężenia TGM odnotowano w przypadku stacji tła miejskiego w Zabrzu. Średnia 7-letnia (2011-2017) wynosiła $2,8 \text{ ng m}^{-3}$ i była znacznie wyższa niż przeciętnie na stanowiskach miejskich w Europie i Ameryce Pn., bliżej poziomów obserwowanych w Pd-Wsch Azji i związanych z najwyższą światową emisją Hg (Chiny).
- b) W związku z bliskim sąsiedztwem szeregu różnych źródeł emisji, stężenie TGM w Zabrzu podlegało silnej fluktuacji, z wyraźnymi cechami dekompozycji sezonowej (średnia w sezonie letnim wyższa niż w sezonie grzewczym) i dobową cyklicznością w okresie wiosenno-letnim (wyższe stężenie w porze nocnej niż za dnia), wynikającą z dobowej zmienności temperatury i ciśnienia atmosferycznego. W sezonie grzewczym, z uwagi na wyniesienie czerpni powietrza ponad warstwę szorstkości terenu, rozkład stężenia TGM okazał się mniej podatny na zmiany warunków meteorologicznych niż w stacjach pozamiejskich.
- c) Dane o stężeniu TGM w Zabrzu wskazują na wyraźny trend spadkowy (z poziomu $3,3 \text{ ng m}^{-3}$ w 2011 r. do $2,1 \text{ ng m}^{-3}$ w 2017), spowodowany prawdopodobnie implementacją bardziej restrykcyjnego prawodawstwa UE w odniesieniu do źródeł energetycznego spalania i emisji Hg z przemysłu.
- d) Rozkłady stężenia TGM w stacjach pozamiejskich, w Złotym Potoku i Granicy były znacznie bardziej stabilne, zarówno w kontekście sezonowych zmian stężenia, jak i w odniesieniu do zmian długoterminowych. Przy założonym poziomie istotności, wyniki pomiarów nie wykazały obecności żadnego trendu liniowego (Złoty Potok), bądź słaby trend malejący (Granica).
- e) W przypadku stacji pozamiejskich, potencjalny spadek średniorocznych poziomów TGM, odpowiadający tendencji obserwowanej w wielu miejscach na świecie, był zakłócany (rok 2015 i 2017) przez zjawiska o charakterze smogu zimowego, towarzyszące cyrkulacji wyżowej i adwekcji chłodnych mas powietrza kontynentalnego ze wschodu.
- f) Średnia 7-letnia stężenia TGM w Złotym Potoku wynosiła $1,8 \text{ ng m}^{-3}$, a w Granicy $1,4 \text{ ng m}^{-3}$. O ile w przypadku Granicy można stwierdzić, że stężenie TGM nie odbiega od wartości typowych dla tła na półkuli północnej (Lindbergh i in. 2007), to nieco wyższe stężenie TGM w Złotym Potoku należy jednak wiązać z oddziaływaniem aglomeracji Górnośląskiej na południowym zachodzie i miasta Częstochowa na północnym zachodzie.

5. Literatura

Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP), United Nations Environment Programme (UNEP) Global Mercury Assessment (2013) Technical Background Report for the Global Mercury Assessment 2013. Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. Arctic Monitoring and Assessment Programme, Oslo, Norway/UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland.

- Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, i in. (2013) Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects: *Environmental Science & Technology* 47(10): 4967-4983.
- Kot K, Kosik-Bogacka D, Łanocha-Arendarczyk N i in. (2016) Wpływ związków rtęci na organizm człowieka: *Farmacja Współczesna* 9: 210-216.
- Lehnher I. (2014) Methylmercury biogeochemistry: a review with special reference to Arctic aquatic ecosystems: *Environmental Reviews* 22(3): 229-243.
- Lindberg S, Bullock R, Ebinghaus R, i in. (2007) A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition: *Ambio*. 36(1): 19-32.
- Lippmann M (red.) *Environmental Toxicants – Human Exposures and Their Health Effects*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey 2009.
- Mason RP, Reinfelder JR, Morel FMM (1995) Bioaccumulation of mercury and methylmercury: *Water, Air, and Soil Pollution* 80: 915–921.
- Pacyna JM, Travníkov O., De Simone F. i in. (2016) Current and future levels of mercury atmospheric pollution on a global scale, *Atmospheric Chemistry and Physics* 16: 12495-12511.
- Piotrowski JK (red.) *Podstawy toksykologii*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2006.
- Stamenkovic J, Lyman S, Gustin MS (2007) Seasonal and diel variation of atmospheric mercury concentrations in the Reno (Nevada, USA) airshed: *Atmospheric Environment* 31: 6662-6672.
- Sundseth K, Pacyna JM, Pacyna EG i in. (2017) Global Sources and Pathways of Mercury in the Context of Human Health: *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14: 105.
- Tekran Instr. Co. (2008) *Model 2537B Ambient Mercury Vapor Analyzer, User Manual*. Toronto, Canada.

Podziękowania: Monitoring rtęci w Zabrzu, prowadzony z użyciem systemu Tekran 2537B/1130/1135, finansowany był ze środków na badania statutowe, realizowane w Zespole Imisji IPIŚ PAN. Autorzy dziękują za możliwość wykorzystania w niniejszej pracy danych ze stacji monitoringu powietrza w Złotym Potoku i Granicy, pozyskiwanych w ramach Państwowego Monitoringu Środowiska, koordynowanego przez GIOŚ w Warszawie.

14. Wpływ różnych typów cyrkulacji atmosferycznej na zmiany stężenia rtęci gazowej i związanej z pyłem zawieszonym w województwie śląskim

Impact of various atmospheric circulation types on variability of the gaseous and particle-bound mercury concentrations within Silesia Province

Słaby Krzysztof, Pyta Halina

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN, Zabrze

Słowa kluczowe: jakość powietrza, Śląsk, monitoring Hg

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki analizy rozkładu stężenia rtęci w powietrzu, z uwzględnieniem określonych typów cyrkulacji atmosferycznej, w celu zweryfikowania tezy o zależności pomiędzy stężeniem Hg, a źródłowym obszarem pochodzenia mas powietrza. Analizie poddano wyniki 2-letniej serii ciągłych pomiarów dwóch form rtęci – całkowitej gazowej (TGM) i aerozolowej (PBM), związanej z cząstkami PM_{2,5}. Pomiary prowadzone były w latach 2014-2015 na dwóch stanowiskach w województwie śląskim, o różnej charakterystyce emisyjnej – w Zabrzu (stacja tła miejskiego) i Złotym Potoku (obszar wiejski, stacja tła regionalnego dla woj. śląskiego). Wykorzystano prostą klasyfikację subiektywną, przy użyciu kalendarza typów cyrkulacji wg T. Niedźwiedzia dla Polski Południowej. Kalendarz ten obejmuje sytuacje synoptyczne związane z warunkami antycyklonalnymi, cyklonalnymi oraz kategorię nie poddającą się klasyfikacji. Nie potwierdzono związku stężenia TGM z określoną sytuacją synoptyczną, tak w odniesieniu do lokalizacji, jak i sezonu (grzewczy/letni). Związek z cyrkulacją atmosferyczną zaznaczył się wyraźnie przy analizie stężenia rtęci aerozolowej (PBM). W przypadku Zabrze widać wzrost stężenia PBM w sezonie grzewczym przy adwekcji powietrza z kierunku SE, w przypadku Złotego Potoku – przy napływie mas powietrza z kierunku S i SW (znad Górnego Śląska).

1. Wstęp

Rtęć jest obecna w atmosferze w różnej postaci fizycznej i w wielu formach chemicznych. Występuje zasadniczo w fazie gazowej (w nomenklaturze tzw. całkowita rtęć gazowa – TGM, ang. *Total Gaseous Mercury*) oraz w niewielkim udziale – w formie stałej, związanej z cząstkami pyłu zawieszonego w powietrzu (TPM, *Total Particulate Mercury*), jak również w formie rozpuszczonej w wodzie lub nierozpuszczonej, np. jako molekuly gazu uwięzionego w kryształkach lodu (śniegu) lub jako cząstki stałe, zawieszone w kroplach deszczu, mgły, w chmurach. W powietrzu identyfikuje się pary rtęci elementarnej Hg⁰ (GEM, *Gaseous Elemental Mercury*), jak również rtęć w formie jonowej (Hg⁺, Hg²⁺). Te ostatnią formę Hg stanowią nieorganiczne sole, tlenek, wodorotlenek oraz organiczne związki Hg (mono- i dimetylortęć). Pospolitymi solami rtęci są halogenki HgX₂ (X = F, Cl, Br, J) i związane z pyłem zawieszonym (PM, *Particulate Matter*) siarczany i siarczki Hg. Forma jonowa Hg istnieje zarówno w postaci gazowej, związanej z cząstkami PM, jak i w postaci rozpuszczonej w wodzie. Gazowa postać jonowej formy Hg to in. rtęć utleniona, oznaczana akronimem GOM (ang. *Gaseous Oxidized Mercury*). Zatem, TGM=GEM+GOM. Szacuje się, że GEM stanowi od 95% do 99% całkowitej zawartości Hg w powietrzu, a pozostałą część stanowią łącznie gazowa forma utleniona GOM i aerozolowa TPM (Lindberg i in. 2007). Zróżnicowane własności fizyko-chemiczne i czas życia poszczególnych form Hg w atmosferze sprawiają, że mają one różny udział w lokalnym, regionalnym i globalnym obiegu rtęci, w różnym stopniu przyczyniając się do zanieczyszczenia pozostałych komponentów środowiska. Dobra rozpuszczalność w wodzie większości składników GOM sprawia, że ta forma rtęci jest efektywnie wymywana przez deszcz/śnieg, a czas życia/przebywania GOM w powietrzu szacuje się na kilka – kilkanaście godzin lub dni. Mokra depozycja GOM ma zasięg lokalny i regionalny. Podobny zasięg i skalę oddziaływania przypisuje się suchej depozycji rtęci, związanej głównie z usuwaniem TPM (porównywalny z GOM okres życia w powietrzu). Wielkości suchej i mokrej depozycji są porównywalnego rzędu, a ich efektywność w procesie oczyszczania atmosfery z rtęci może być różna

w zależności od lokalnych warunków topograficznych, klimatycznych itp. (UNEP, 2008). Elementarna forma gazowej rtęci charakteryzuje się słabą rozpuszczalnością w wodzie i jest względnie inerta chemicznie. To sprawia, że GEM postrzegana jest jak zanieczyszczenie o zasięgu globalnym, które może być przenoszone na dalekie odległości, o wyrównanym poziomie tła w troposferze (od $1,1 \text{ ng m}^{-3}$ na półkuli południowej do $1,7 \text{ ng m}^{-3}$ na półkuli północnej) (Lindberg i in., 2007). Proces samooczyszczania atmosfery z GEM przebiega bardzo wolno, a czas życia tej formy Hg w powietrzu ocenia się na 6 do 24 miesięcy) (Slemr i in., 1985). Depozycja GEM do podłoża wymaga bowiem wstępnego utlenienia do GOM i/lub związania z cząstkami PM (Driscoll i in. 2013). Jakkolwiek procesy utleniania GEM są wciąż stosunkowo słabo poznane, to największe znaczenie w reakcjach utleniania przypisuje się cząstkom Br, O_3 i OH (Lin i Pehkonen, 1999, Calvert i Lindberg, 2005).

Ponieważ główną formą rtęci atmosferycznej jest inerta GEM, to matematyczny opis zmian stężenia tego pierwiastka w powietrzu, w zależności od emisji i warunków meteorologicznych napotyka na znacznie większe trudności niż w przypadku innych zanieczyszczeń pyłowo-gazowych. Wykrywane zależności korelacyjne są statystycznie słabsze (Majewski i in. 2013a, Majewski i in. 2013b) i wobec tego trudniej jest modelować rozprzestrzenianie rtęci, czy prognozować epizody jej wysokiego stężenia. Dlatego podjęto próbę powiązania stężenia Hg z cyrkulacją atmosferyczną, o większej reprezentatywności obszarowej niż w przypadku poszczególnych parametrów meteorologicznych. Takie podejście z powodzeniem stosowano do identyfikacji sytuacji smogowych (Godłowska i Tomaszewska 2010, Godłowska 2019) lub opisu zmian stężenia PM_{10} (pył o średnicy aerodynamicznej cząstek do $10 \text{ }\mu\text{m}$), SO_2 i NO_2 (Leśniok i Caputa 2009, Leśniok i in. 2010, Grundstrom i in. 2015, Pilgaj i in. 2018). Wykazano, że cyrkulacja atmosferyczna odgrywa ważną rolę w kształtowaniu stanu zanieczyszczenia powietrza nad danym obszarem. Podstawowe znaczenie dla stężenia zanieczyszczeń ma występowanie mas powietrza o specyficznych cechach termiczno-wilgotnościowych i określony układ baryczny, z którym związany jest pionowy ruch powietrza (warunkujący zachmurzenie) i ruch poziomy (wiatr). Przykładowo, bardziej dynamiczny typ cyrkulacji połączonej z adwekcją zachodnią sprzyja dyspersji zanieczyszczeń blisko źródeł emisji, podczas gdy cyrkulacja charakteryzująca się słabą adwekcją powoduje przygruntową stagnację powietrza i koncentrację zanieczyszczeń. Ta ostatnia jest szczególnie niebezpieczna w zaludnionych ośrodkach miejsko-przemysłowych, np. w aglomeracji Górnego Śląska. Niemal cały obszar aglomeracji leży na otwartej od północy, wschodu i zachodu Wyżynie Śląskiej, gdzie naprzemiennie ścierają się polarne masy powietrza morskiego i kontynentalnego, kształtujące lokalne zjawiska pogodowe. Układ ten jest okresowo modyfikowany przez napływ powietrza z południowego zachodu, od strony naturalnego obniżenia Bramy Morawskiej. Położenie geograficzne aglomeracji i wysoka emisja zanieczyszczeń sprawiają, że występują tu zjawiska pogodowe, niekorzystne pod względem aerosanitarnym („miejska wyspa ciepła”, wyższe zamglenie, częstsze sytuacje smogowe) (Leśniok i Caputa 2009).

W niniejszej pracy przedstawiono rezultaty klasyfikacji średniodobowych (24h) poziomów rtęci atmosferycznej wg kalendarza typów cyrkulacji T.Niedźwiedzia. Analizie poddano wyniki 2-letniej serii ciągłych pomiarów dwóch form rtęci – gazowej TGM oraz aerozolowej, związanej z cząstkami respirabilnej frakcji pyłu $\text{PM}_{2,5}$ (cząstki o średnicy aerodynamicznej do $2,5 \text{ }\mu\text{m}$) i oznaczanej akronimem PBM (*Particulate Bound Mercury*). Pomiary prowadzone były od stycznia 2014 r. do grudnia 2015 r. na stanowisku w centrum aglomeracji Górnego Śląska (Zabrze) oraz dla porównania – na stanowisku pozamiejskim w Złotym Potoku.

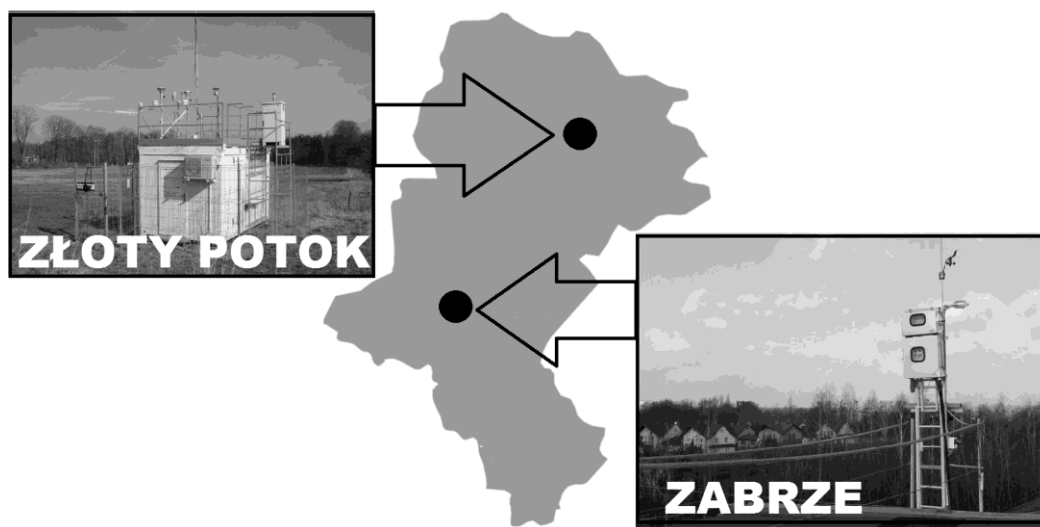
2. Materiał i metody

2.1 Charakterystyka stanowisk pomiarowych

Stanowisko w Zabrzu należy do Instytutu Podstaw Inżynierii Środowiska PAN (IPIŚ PAN). Znajduje się w budynku Instytutu, z czerpnią na wysokości 14 m n.p.t. IPIŚ PAN leży w dzielnicy mieszkaniowo-usługowej. Przeważa zabudowa wielorodzinna, głównie bloki mieszkalne ogrzewane centralnie. W odległości 150-200 m na pd znajduje się osiedle budynków komunalnych z indywidualnymi paleniskami węglowymi, a dalej - centrum miasta ze starą zabudową mieszkalną

(paleniska węglowe). Zabrze (180 tys. mieszk.) jest miastem o najniższym w aglomeracji Górnego Śląska wskaźniku ucieplownienia, z licznymi źródłami antropogenicznej emisji Hg w obrębie miasta lub w jego bezpośrednim otoczeniu, związanymi z energetyką i przemysłem (elektrownia i elektrociepłownie, koksownie i węglowe kotłownie przemysłowe).

Stanowisko w Złotym Potoku znajduje się na terenie automatycznej stacji monitoringu powietrza, należącej do Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska (GIOŚ), obsługiwanej przez służby Wydziału Monitoringu Inspekcji Ochrony Środowiska w Katowicach. Wysokość czerpni powietrza wynosi ok. 4 m n.p.t. Złoty Potok (gmina Janów w pn-wsch części woj. śląskiego) leży w odległości ok. 20 km na pd-wsch. od Częstochowy, 25 km na pn od Zawiercia i 60 km na pn-wsch. od Zabrze. Bezpośrednie otoczenie stacji stanowią łąki i pola uprawne. Stacja ma status stacji tła regionalnego dla woj. śląskiego. Lokalizację i otoczenie obu stanowisk pomiarowych pokazano na Rys. 1.



Rys. 1. Lokalizacja i ogólny widok stanowisk pomiaru stężenia rtęci atmosferycznej.

2.2 Metody pomiarowe

Stężenie TGM na obu stanowiskach mierzono metodą automatyczną z użyciem analizatora Tekran 2537B, który działa na zasadzie amalgamacji gazowej rtęci na powierzchni stałego złoza pokrytego złotem, z termodesorpcją zatężonych par Hg i ich detekcją metodą atomowej spektroskopii fluorescencyjnej, przy długości fali $\lambda=253.7$ nm. W Złotym Potoku mierzone jest stężenie TGM, a Tekran 2537B pracuje jako samodzielny moduł, który w trybie co 5 minut przesyła wynik pomiaru do loggera stacyjnego. Na stanowisku w Zabrzu, Tekran 2537B stanowi główny moduł detekcji trzech form specjacyjnych – rtęci gazowej GEM i GOM oraz rtęci aerozolowej. Specjacja Hg zachodzi sekwencyjnie na etapie pobierania próbki, w obrębie dwóch dodatkowych modułów 1130 i 1135. Wszystkie formy Hg są odzyskiwane termicznie i oznaczane w module detekcji jako Hg^0 (GEM). Cykl pomiarowy 3-modułowego układu pomiarowego trwa 2h i składa się z 1-godzinnej fazy pobierania próbki, z jednoczesnym oznaczaniem Hg^0 (GEM) co 5 minut oraz z 1-godzinnej fazy desorpcji formy utlenionej GOM. W tym układzie pomiarowym TGM=GEM+GOM. Do celów niniejszej pracy, wyniki chwilowych pomiarów TGM były uśredniane w obrębie doby pomiarowej. Analizator Hg podlega codziennej autokalibracji z wykorzystaniem wewnętrznego źródła permeacyjne Hg^0 . Deklarowana przez producenta precyzja analizatora wynosi 2%, a granica oznaczalności Hg^0 - $0,06 \text{ ng m}^{-3}$ (Tekran, 2008).

Próbki pyłu do oznaczeń na zawartość Hg pobierano na obu stanowiskach w sposób ciągły, w cyklach 24-godzinnych, przy użyciu niskoprzepływowych poborników z głowicą PM_{2,5} na wys.

ok. 4 m n.p.t. Natężenie przepływu powietrza wynosiło $2,3 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1} \pm 10 \%$. Na obu stanowiskach wykorzystano jednakowe poborniki Mikro PNS (Umwelttechnik MCZ GmbH, Niemcy) z automatycznym zmieniaczem filtrów. Pył pobierano na filtry z włókna kwarcowego (Whatman QMA). Zawartość Hg w próbkach PM_{2,5} oznaczano z użyciem laboratoryjnego analizatora rtęci MA-2 (Nippon Instruments Co., Japonia). Oznaczenie polegało na termicznym rozkładzie filtra z próbką pyłu i detekcji uwolnionych par Hg⁰ techniką absorpcyjnej spektrometrii atomowej. Próbkę ogrzewano w piecu rurowym w temp. 700°C. Przeszkadzające w oznaczeniu produkty rozkładu były eliminowane poprzez odpowiednie dodatki analityczne i katalityczne utlenianie w drugim piecu. Po neutralizacji i osuszeniu, produkty rozkładu były zateżane na wewnętrznym amalgamatorze, w celu wydzielania par Hg⁰. Wskutek ogrzania amalgamatora, uwolnione pary Hg⁰ przepływały do detektora, gdzie mierzono osłabienie natężenia promieniowania lampy rtęciowej, proporcjonalne do zawartości atomów Hg w analizowanym gazie. Analizę ilościową wykonano po kalibracji MA-2 metodą roztworów wzorcowych. Metodę zwalidowano z użyciem certyfikowanych materiałów odniesienia (NIST1633b i NIST2583). Granice wykrywalności i oznaczalności wynosiły odpowiednio 0,094 i 0,283 ng Hg. Powtarzalność i odtwarzalność metody - odpowiednio 4,5% i 3,9%. Odzysk wzorca - od 90% do 96%.

3. Omówienie wyników

Do analizy uwarunkowań cyrkulacyjnych wykorzystano kalendarz typów cyrkulacji dla Polski Południowej wg T. Niedźwiedzia, dostępny w zasobach cyfrowych Katedry Klimatologii UŚ (Niedźwiedź 2017). Autor wyodrębnił w nim 21 typów sytuacji synoptycznych, z których pierwsze 10 ma charakter cyrkulacji antycyklonalnej „a” (wyżowej), kolejne 10 - cyrkulacji cyklonalnej „c” (niżowej) oraz 1 typ „x”, grupujący sytuacje nie poddające się klasyfikacji. Klasyfikacja nawiązuje do 8 dominujących kierunków adwekcji (napływ powietrza z kierunków N, NE, E, SE, S, SW, W, NW) i uwzględnia typy sytuacji, charakteryzujące się brakiem wyraźnego kierunku adwekcji (sytuacja centralna antycyklonalna Ca i cyklonalna Cc, klin antycyklonalny Ka oraz bruzda cyklonalna Bc). Zastosowano następującą numerację typów sytuacji synoptycznych: 1-Na, 2-NEa, 3-Ea, 4-SEa, 5-Sa, 6-SWa, 7-Wa, 8-NWa, 9-Ca, 10-Ka, 11-Nc, 12-NEc, 13-Ec, 14-SEc, 15-Sc, 16-SWc, 17-Wc, 18-NWc, 19-Cc, 20-Bc, 21-x. Poszczególnym dobom pomiarowym w dwuleciu 2014-2015 przypisano średnie 24h stężenie TGM i PBM na danym stanowisku i typ cyrkulacji, wynikający z kalendarza Niedźwiedzia. Wyniki pomiarów Hg sklasyfikowano względem 21 typów sytuacji synoptycznych w całym analizowanym okresie oraz niezależnie w sezonie letnim (kwiecień – wrzesień) i grzewczym (pozostałe 6 miesięcy).

Sytuację synoptyczną w analizowanych lokalizacjach Południowej Polski, obserwowaną w dwóch sezonach letnich i grzewczych 2014-2015, ilustruje wykres częstości adwekcji - Rys. 2. Rezultaty klasyfikacji wyników pomiarów stężenia TGM i PBM względem typów cyrkulacji atmosferycznych dla całego okresu pomiarowego („łącznie”) przedstawiono na wykresach punktowych – odpowiednio Rys. 3 i Rys. 4.

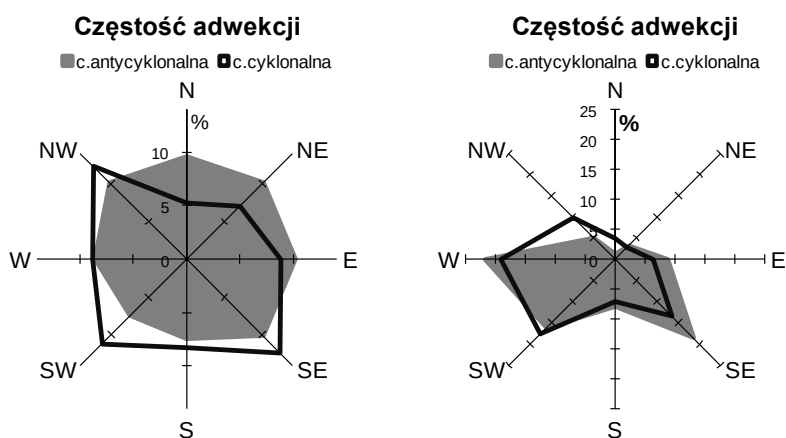
Rozkład średnich wartości stężenia TGM i PBM, przypisanych cyrkulacji antycyklonalnej (wyż) i cyklonalnej (niż), związanej z adwekcją powietrza z 8 sektorów róży wiatrów, pokazano na wykresach kierunkowych - Rys. 5 dla sezonu letniego i Rys. 6 dla sezonu grzewczego. Podstawowe statystyki opisowe rozkładu stężenia TGM i PBM na obu stanowiskach w sezonach letnich, grzewczych oraz łącznie w okresie 2014-2015, uwzględniających sumę wszystkich cyrkulacji wyżowych (a - antycyklon), niżowych (c - cyklon) oraz sytuacje niezaklasyfikowane (x), zestawiono w Tab. 1.

4. Wnioski

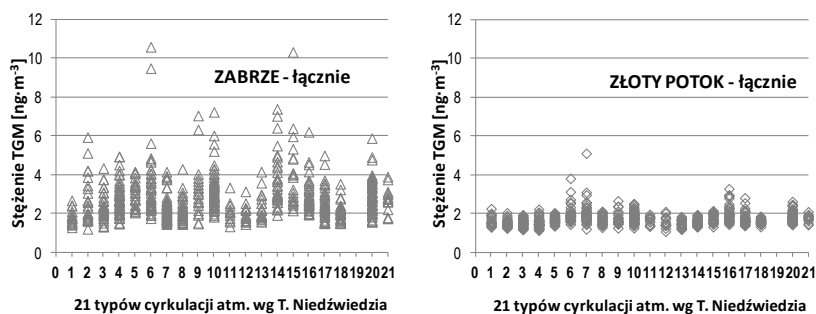
- a) Analiza wpływu sytuacji synoptycznej (antycyklonalna, cyklonalna, niesklasyfikowana), wykazała, że średnie stężenie TGM w Zabrzu i Złotym Potoku nie zmienia się istotnie i przyjmuje podobne wartości w sezonie letnim i grzewczym (tabela 1).
- b) O ile w przypadku Zabrza latem widać powiązanie wyższego stężenia TGM z cyrkulacją wyżową „a”, transportującą masy powietrza z kierunku SW oraz z cyrkulacją niżową „c”

z południa, o tyle w sezonie grzewczym nie sposób określić dominującego kierunku adwekcji. W przypadku Złotego Potoku nie widać związku stężenia TGM z cyrkulacją w żadnym sezonie (wykresy kierunkowe).

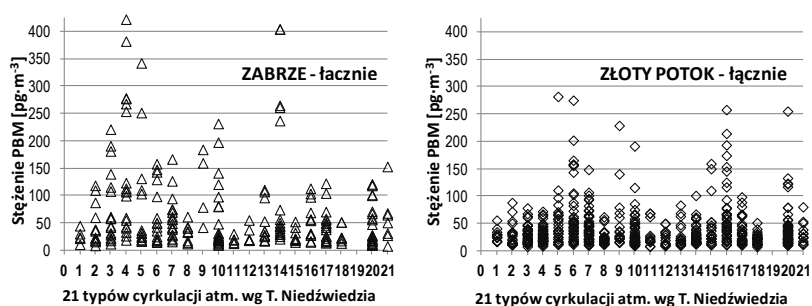
- c) Związek z cyrkulacją atmosferyczną zaznacza się przy analizie stężenia rtęci aerozolowej PBM. Jakkolwiek tylko w przypadku Zabrze (sezon grzewczy) widoczne są istotne różnice pomiędzy średnim poziomem PBM przy cyrkulacji cyklonalnej i antycyklonalnej. W ostatnim przypadku wyższe o 50% (prawdopodobnie oddziaływaniem odległych źródeł energetycznych).
- d) W przypadku Zabrze, w obu sezonach przy cyrkulacji wyżowej (bardziej odległe źródła emisji) i niżowej (źródła w bliższym sąsiedztwie receptora) widać wzrost stężenia PBM przy adwekcji powietrza z kierunku SE. W przypadku Złotego Potoku – podobna prawidłowość dotyczy napływu zanieczyszczonych mas powietrza z kierunków SW i S, w szczególności w sezonie grzewczym (źródła z terenu Górnego Śląska).



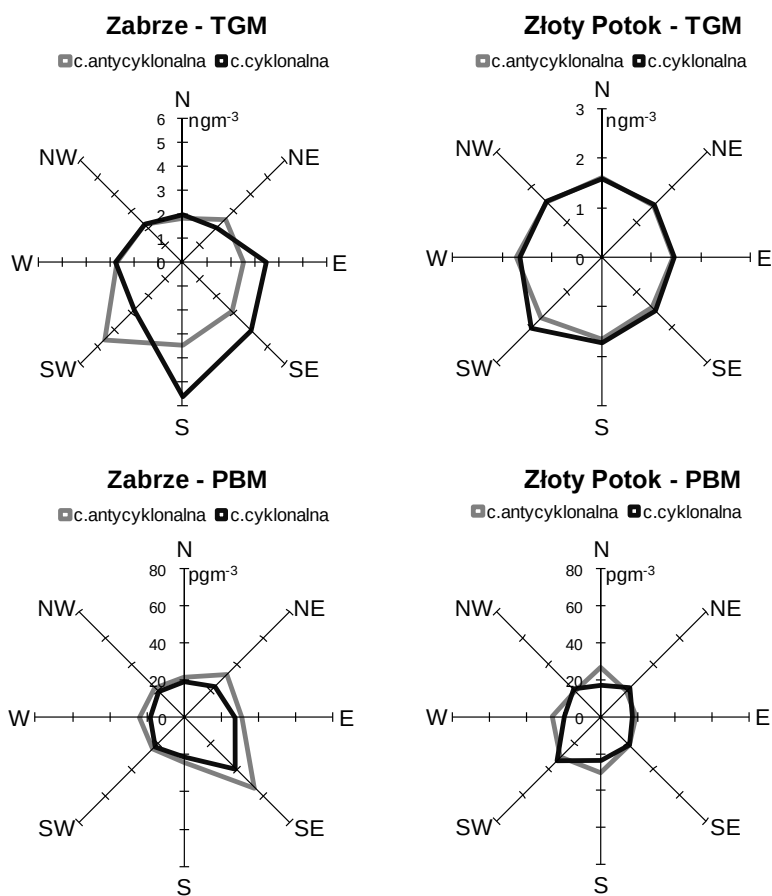
Rys. 2. Częstość adwekcji [%] przy cyrkulacji antycyklonalnej i cyklonalnej w sezonie letnim (lewy wykres) i grzewczym (prawy wykres).



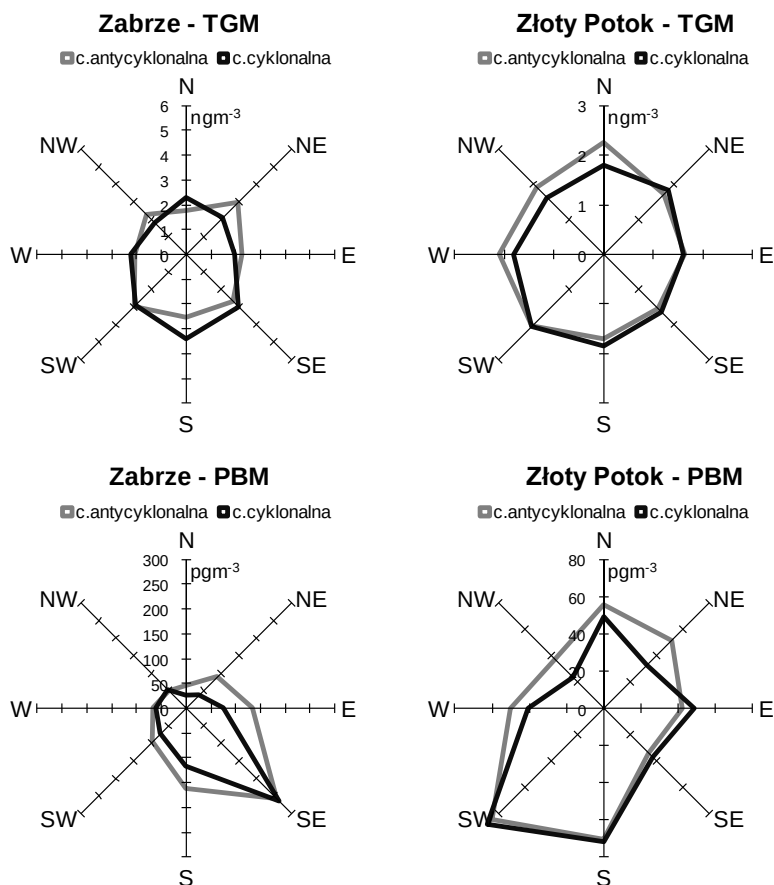
Rys. 3. Rozkład stężenia TGM [ng m⁻³] na stanowisku w Zabrzu i Złotym Potoku dla 21 typów cyrkulacji atmosferycznej, 2014-2015.



Rys. 4. Rozkład stężenia PBM [$\text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$] na stanowisku w Zabrzu i Złotym Potoku dla 21 typów cyrkulacji atmosferycznej, 2014-2015.



Rys. 5. Średnie stężenie TGM [$\text{ng}\cdot\text{m}^{-3}$] i PBM [$\text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$] dla poszczególnych sektorów adwekcji przy cyrkulacji antycyklonalnej i cyklonalnej w sezonie letnim. Zabrze, Złoty Potok, 2014-2015.



Rys. 6. Średnie stężenie TGM [ng m^{-3}] i PBM [pg m^{-3}] dla poszczególnych sektorów adwekcji przy cyrkulacji antycyklonalnej i cyklonalnej w sezonie grzewczym. Zabrze, Złoty Potok, 2014-2015.

Tab. 1. Średnia, mediana i maksimum stężenia TGM i PBM dla wszystkich przypadków cyrkulacji antycyklonalnej, cyklonalnej i sytuacji niesklasyfikowanych w sezonie letnim, grzewczym oraz łącznie w latach 2014-2015.

Okres pomiar.	Sytuacja synoptyczna	Parametr	Stężenie TGM, [ngm^{-3}]		Stężenie PBM, [pgm^{-3}]	
			Zabrze	Złoty Potok	Zabrze	Złoty Potok
Sezon letni	Cyrkulacja antycyklonalna (a)	Średnia	3,01	1,62	29	23
		Mediana	2,67	1,59	23	19
		Maks.	20,43	2,50	107	82
	Cyrkulacja cyklonalna (c)	Średnia	3,13	1,67	26	23
		Mediana	2,63	1,61	20	19
		Maks.	23,26	3,28	121	79
		Średnia	2,85	1,67	28	21

Okres pomiar.	Sytuacja synoptyczna	Parametr	Stężenie TGM, [ngm ⁻³]		Stężenie PBM, [pgm ⁻³]	
			Zabrze	Złoty Potok	Zabrze	Złoty Potok
	Sytuacja niesklasyfik. (x)	Median	2,86	1,71	27	21
		Maks.	3,90	1,84	51	32
Sezon grzewczy	Cyrkulacja antycyklonalna (a)	Średnia	2,58	1,86	135	55
		Mediana	2,38	1,79	108	44
		Maks.	6,02	5,11	566	282
	Cyrkulacja cyklonalna (c)	Średnia	2,55	1,83	99	55
		Median	2,42	1,73	57	41
		Maks.	6,21	2,97	459	258
	Sytuacja niesklasyfik. (x)	Średnia	2,49	1,93	79	49
		Mediana	2,61	1,91	66	51
		Maks.	3,13	2,09	153	80
	Cyrkulacja antycyklonalna (a)	Średnia	2,77	1,74	80	39
		Mediana	2,45	1,69	42	29
		Maks.	20,43	5,11	566	282
Łącznie	Cyrkulacja cyklonalna (c)	Średnia	2,86	1,74	58	38
		Mediana	2,49	1,67	30	26
		Maks.	23,26	3,28	459	258
	Sytuacja niesklasyfik. (x)	Średnia	2,70	1,77	57	32
		Mediana	2,74	1,81	51	26
		Maks.	3,90	2,09	153	80

5. Literatura

- AMAP/UNEP (2008) Technical Background Report to the Global Atmospheric Mercury Assessment, AMAP/UNEP Chemicals Branch, Geneva.
- Calvert JG, Lindberg SE (2005) Mechanism of mercury removal by ozone and OH in atmosphere: Atmospheric Environment 39: 3355-3367.
- Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, i in. (2013) Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects: Environmental Science & Technology 47(10): 4967-4983.
- Godłowska J (2019) Wpływ warunków meteorologicznych na jakość powietrza w Krakowie. Badania porównawcze i próba podejścia modelowego. Seria publikacji naukowo-badawczych, Wydawnictwo IMGW-PIB, Warszawa
- Godłowska J, Tomaszewska AM (2010) Relations between circulation and winter air pollution in Polish urban areas: Archives of Environmental Protection 36/ 4: 55–66.
- Grundstrom M, Tang L, Hallquist M. i in. (2015) Influence of atmospheric circulation patterns on urban air quality during the winter: Atmospheric Pollution Research 6: 278-285.
- Lin C-J, Pehkonen SO (1999) Chemistry of Atmospheric Mercury - A Review: Atmospheric Environment 33: 2067-2079.
- Lindberg S, Bullock R, Ebinghaus R, i in. (2007) A synthesis of progress and uncertainties in attributing the sources of mercury in deposition: Ambio. 36(1): 19-32.
- Leśniok M, Caputa Z (2009). The role of atmospheric circulation in air pollution in Katowice Region (Southern Poland): International Journal of Environment and Waste Management January, 2009

- Leśniok M, Małarzewski Ł, Niedźwiedź T, (2010) Classification of circulation types for Southern Poland with an application to air pollution concentration in Upper Silesia: Physics and Chemistry of the Earth 35/9–12: 516–522.
- Majewski G, Czechowski PO, Badyda AJ i in. (2013a). The Estimation of Total Gaseous Mercury Concentration (TGM) Using Exploratory and Stochastic Methods: Polish Journal of Environmental Studies 22/3: 759-771.
- Majewski G, Czechowski PO, Badyda AJ i in. (2013b) Ocena stężenia całkowitej rtęci gazowej (TGM) na terenie stacji tła regionalnego Granica-KPN (województwo mazowieckie, Polska) w latach 2010-2011: Rocznik Ochrony Środowiska/Annual Set The Environment Protection/ 15: 1302-1317.
- Niedźwiedź T. (2017) Kalendarz typów cyrkulacji dla obszaru Polski południowej – zbiór komputerowy, Uniwersytet Śląski, Katedra Klimatologii, Sosnowiec.
(<http://www.kk.wnoz.us.edu.pl>).
- Pilgaj N, Kendzierski S, Kolendowicz L (2018). Rola typów cyrkulacji atmosferycznej w kształtowaniu stężeń pyłu zawieszonego PM10 w Poznaniu: Przegląd Geograficzny 90: 77-91.
- Slemr F, Schuster G, Seiler W (1985) Distribution, speciation, and budget of atmospheric mercury: Journal of Atmospheric Chemistry 3: 407-434.
- Tekran Instr. Co. (2008) Model 2537B Ambient Mercury Vapor Analyzer, User Manual. Toronto, Canada.

Podziękowania: Monitoring rtęci w Zabrze, prowadzony z użyciem systemu Tekran 2537B/1130/1135, finansowany był ze środków na badania statutowe Zespołu Imisji IPiŚ PAN. Analiza chemiczna próbek PM_{2,5} została sfinansowana z dotacji celowej WFOŚiGW w Katowicach, w ramach współpracy z WIOŚ w Katowicach w zakresie regionalnego monitoringu rtęci atmosferycznej za lata 2014-2015. Autorzy dziękują za możliwość wykorzystania w niniejszej pracy danych GIOŚ o stężeniu TGM ze stacji w Złotym Potoku, pozyskanych w ramach Państwowego Monitoringu Środowiska.

15. Forma chemiczna metali ciężkich w osadach ściekowych jako element oceny ryzyka ekologicznego

Chemical form of heavy metals in sewage sludge as an element of ecological risk assessment

Tytła Malwina

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, Zabrze

Tytła Malwina: malwina.tytla@ipis.zabrze.pl; <https://orcid.org/0000-0003-3059-4471>

Słowa kluczowe: oczyszczalnia ścieków, ekstrakcja sekwencyjna, formy chemiczne metali, analiza ryzyka, Górnośląski Okręg Przemysłowy

Streszczenie

Przeprowadzono analizę ryzyka ekologicznego w oparciu o formy chemiczne metali ciężkich (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn i Hg), w osadach wybranej oczyszczalni ścieków (Górnośląski Okręg Przemysłowy, GOP; woj. śląskie). Próbkę osadów pobierano w dwóch punktach ich przeróbki, tj. na początku (po zagęszczeniu; O1) oraz na końcu (ustabilizowane - po odwadnianiu, O2). Do identyfikacji form chemicznych metali zastosowano 3-stopniową ekstrakcję sekwencyjną wg procedury BCR (Community Bureau of Reference). Analizę ryzyka przeprowadzono w oparciu o następujące wskaźniki: Potential Ecological Risk Factor (ER), Risk Index (RI), Risk Assessment Code (RAC) oraz wskaźniki autorskie: Individual Ecological Risk (IER) i Global Ecological Risk (GER). Wartości wskaźników odnoszących się do ogólnej zawartości metali wskazują, że największe ryzyko pod kątem przyrodniczego zagospodarowania osadów stwarzały: kadm i rtęć, z kolei rozpatrując formy chemiczne metali: cynk, kadm i nikiel. Sumarycznie analizowane metale mogą stanowić potencjalne zagrożenie dla środowiska. Badania wykazały, że osady ustabilizowane charakteryzowały się niższym udziałem metali we frakcjach mobilnych w porównaniu z tymi mobilnymi. Świadczy to o pozytywnym wpływie procesów stabilizacji i odwadniania na zmniejszenie mobilności metali, co skutkuje obniżeniem poziomu ryzyka powodowanego przez te pierwiastki. Reasumując, znajomość form chemicznych metali w osadach ściekowych stanowi istotny element oceny ryzyka ekologicznego, szczególnie w przypadku ich przyrodniczego wykorzystania.

1. Wstęp

Rozwój nowych technologii oraz wzrost efektywności biologicznego oczyszczenia ścieków przyczyniają się do zwiększenia ilości wytwarzanych osadów. Ich charakterystyka zależy głównie od składu chemicznego ścieków surowych i podlega zmianom w kolejnych etapach przeróbki osadów, takich jak: zagęszczanie, stabilizacja, odwadnianie i higienizacja (Tytła i in. 2016). Z uwagi na zagrożenia jakie osady ściekowe stanowią dla środowiska, organizmów żywych oraz w wymiarze gospodarczym, znaczenie tej grupy odpadów rośnie (Li i in. 2014). Co więcej, wg danych Głównego Urzędu Statystycznego (GUS), w roku 2019 na terenie kraju wytworzonych zostało 573283 ton osadów ściekowych, z czego 63593 ton na obszarze województwa śląskiego (GUS, Bank Danych Lokalnych, 2019).

Obecność metali ciężkich obok skażeń mikrobiologicznych i zanieczyszczenia toksycznymi związkami organicznymi stanowi podstawowe kryterium przyrodniczego wykorzystania osadów (Tytła i in. 2016; Gusiatin i in. 2018). Dopuszczalne stężenia metali ciężkich w osadach ściekowych na terenie Polski reguluje Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 6 lutego 2015 roku (Dz.U. 2015 poz. 257).

Sumaryczna zawartość metali ciężkich w osadach ściekowych pozwala jedynie na ocenę ich jakości lub stopnia zanieczyszczenia, natomiast nie jest jednoznaczna z możliwością uwolnienia tych pierwiastków do środowiska gruntowo - wodnego (Yang i in. 2017). Czynnikiem warunkującym mobilność metali jest ich forma chemiczna, (Tytła 2019). Metodą powszechnie stosowaną do identyfikacji form chemicznych metali jest trzy - stopniowa procedura BCR (Community Bureau of Reference; obecnie Standards, Measurements and Testing Programmed), będąca modyfikacją metody

Tessiera (Tessier i in. 1979; Álvarez i in. 2002). Procedura ta pozwala stwierdzić, z jakimi składnikami osadów ściekowych związane są poszczególne metale, a także umożliwia dokładniejszą ocenę zdolności ich migracji z osadów do środowiska (Tytła i in. 2016).

Biorąc pod uwagę, dynamikę zmian zachodzących w środowisku oraz fakt, że głównym sposobem zagospodarowania osadów ścieków w Polsce jest ich przyrodnicze wykorzystanie, koniecznością staje się podjęcie działań zmierzających do wdrożenia wzmoczonego monitoringu osadów nie tylko pod kątem ogólnej zawartości metali ciężkich, ale przede wszystkim ich form chemicznych występowania. Właściwym narzędziem oceny zagrożenia wydaje się być analiza ryzyka ekologicznego. Do oszacowania potencjalnego ryzyka jakie metale stwarzają dla środowiska oraz organizmów żywych służą określone wskaźniki, które mogą odnosić się zarówno do ogólnej zawartości metali jak i form chemicznych ich występowania. Wśród powszechnie stosowanych wskaźników można wyróżnić, m.in. Potential Ecological Risk Factor (ER), Risk Index (RI), Risk Assessment Code (RAC), Individual Contamination Factor (ICF) (Hakanson 1980; Perin i in. 1985). Jak dotąd powstało niewiele prac dotyczących analizy ryzyka ekologicznego uwzględniającej formy chemiczne występowania metali ciężkich w osadach ściekowych. Większość z tych prac dotyczy wyłącznie osadów ustabilizowanych bez uwzględnienia ich wcześniejszej charakterystyki, która ma istotny wpływ na wielkość ryzyka „końcowego”. Ważnym aspektem prezentowanej pracy jest wybór obszaru badań. Górnośląski Okręg Przemysłowy (GOP; woj. śląskie) to obszar charakteryzujący się wyższą zawartością metali ciężkich w środowisku, w porównaniu do innych regionów w Polsce czy w Europie.

Celem badań było przeprowadzenie analizy ryzyka ekologicznego w oparciu o wybrane wskaźniki, odnoszące się przede wszystkim do form chemicznych występowania metali ciężkich (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn i Hg) w osadach ściekowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich początkowej charakterystyki.

2. Materiał i Metody

2.1 Materiał

Materiał badawczy stanowiły osady ściekowe z komunalnej oczyszczalni ścieków, zlokalizowanej na obszarze Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP) w woj. śląskim. Próbkę osadów pobierano w 1- godzinnych interwałach czasowych, w dwóch punktach ciągu przeróbki, tj. na początku (osady po zagęszczeniu - wstępne i nadmierne; O1) oraz na jego końcu (osady ustabilizowane - po odwadnianiu; O2). Takie postępowanie miało na celu uzyskanie jak najbardziej reprezentatywnych próbek do badań. W przypadku osadów ustabilizowanych, były one pobierane po czasie niezbędnym dla przebiegu procesu stabilizacji beztlenowej. Po pobraniu, próbki osadów zostały szczelnie zamknięte w plastikowych pojemnikach i przewiezione bezpośrednio do laboratorium. Do czasu wykonania analiz osady przetrzymywano w temperaturze 4°C.

2.2 Metody

W próbkach osadów ściekowych wykonano pomiar pH oraz potencjału redox (Eh), jak również oznaczono stężenie suchej masy. Do pomiaru wartości pH oraz Eh wykorzystano wielofunkcyjne urządzenie CPR-411 (Elmetron). Oznaczenie suchej masy wykonano zgodnie z normą PN-EN 12880:2004.

Badania osadów obejmowały także analizy pod kątem ogólnej zawartości oraz form chemicznych występowania metali ciężkich (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn i Hg). W tym przypadku przygotowanie próbek do badań polegało na wstępnym suszeniu osadów przez okres 48 godzin w temperaturze 20°C do stanu powietrzno - suchego, a następnie do stałej masy w temperaturze 105°C. Po zakończeniu powyższych czynności, osady mielono w celu uzyskania ziarna analitycznego oraz poddawano mineralizacji. W tym celu przygotowano odważki o masie 0,2 g, do których dodawano wody królewskiej i odparowywano na płycie grzejnej. Całkowitą zawartość metali ciężkich w próbkach osadów ściekowych oznaczano techniką absorpcyjnej spektrometrii atomowej przy użyciu aparatu Avio 200 ICP-OES (PerkinElmer Inc.). Do oznaczenia zawartości rtęci wykorzystano technikę zimnych par (CV-AAS). Powyższe analizy wykonywano w trzech powtórzeniach.

W celu określenia form chemicznych metali ciężkich - osady ściekowe poddano trzy - stopniowej ekstrakcji sekwencyjnej, przeprowadzonej wg procedury BCR zaproponowanej przez European Community Bureau of Reference (obecnie Standards, Measurements and Testing Programmed). Procedura ta umożliwiła wyodrębnienie metali związanych z trzema głównymi frakcjami oraz dodatkową frakcją rezydualną (Alvarez i in. 2002). Schemat ekstrakcji sekwencyjnej przedstawiono w Tab. 1.

Do oceny ryzyka ekologicznego wykorzystano wybrane wskaźniki odnoszące się zarówno do pojedynczego metalu, jak i grupy metali. Wskaźniki ryzyka ekologicznego zaprezentowano w Tab. 2.

Tab. 1. Schemat ekstrakcji sekwencyjnej wg procedury BCR (Alvarez i in. 2002).

	Frakcje	Procedura BCR
Frakcja 1	rozpuszczalna w kwasach; związana z węglanami (mobilna).	Do 0,5 g próbki dodać 20 mL CH_3COOH ($0,11 \text{ mol L}^{-1}$); wytrząsać 16 h.
Frakcja 2	redukowalna; związana z tlenkami żelaza i manganu (mobilna).	Do pozostałości z etapu I ekstrakcji dodać 20 mL $\text{HN}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); wytrząsać 16 h.
Frakcja 3	utlenialna; związana z materią organiczną i siarczkami (niemobilna).	Do pozostałości z etapu II ekstrakcji dodać 5 mL H_2O_2 ($8,8 \text{ mol L}^{-1}$), potem odparować na łaźni wodnej (procedurę powtórzyć), a następnie dodać 25 mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (1 mol L^{-1}); wytrząsać 16 h.
Frakcja 4	rezydualna; pozostałość po poprzednich etapach ekstrakcji (niemobilna)	Do pozostałości z etapu III ekstrakcji dodać HNO_3 and HCl (stosunek 1:3); zmineralizować.

Tab. 2. Wskaźniki ryzyka ekologicznego.

Wskaźnik	Wzór	Skala
Potential Ecological Risk Factor (ER) (Hakanson 1980)	$ER = T_f^i \cdot CF$ T- współczynnik toksyczności metalu; CF - Contamination Factor	$40 \geq ER > 320$ od niskiego do bardzo wysokiego ryzyka
Risk Index (RI) (Hakanson 1980)	$RI = \sum ER_i$ i - metale	$150 \geq RI > 600$ od niskiego do wysokiego ryzyka
Risk Assessment Code (RAC) (Perin i in. 1985)	$RAC = F_1; \%$ F1 - frakcja mobilna	$1\% \geq RAC > 50 \%$ od niskiego do wysokiego ryzyka
Individual Ecological Risk (IER) Wskaźnik autorski (Tytła 2020)	$IER = \frac{F_1 + F_2}{F_3 + F_4} \cdot 100; \%$ F1, F2 - frakcje mobilne; F3, F4 - frakcje niemobilne	$50\% \geq IER > 250\%$ od niskiego do bardzo wysokiego ryzyka
Global Ecological Risk (GER) Wskaźnik autorski (Tytła 2020)	$GER = \sum IER_i; \%$ i - metale	$100\% \geq GER > 500\%$ od niskiego do bardzo wysokiego ryzyka

3. Wyniki i dyskusja

3.1 Charakterystyka fizykochemiczna osadów ściekowych

Oczyszczalnia ścieków, z której pobierano osady do badań prowadzi mechaniczne i biologiczne procesy oczyszczania ścieków. Osady ściekowe pobierano na początku i na końcu ciągu technologicznego ich przeróbki, tj. osady zmieszane (O1) oraz po stabilizacji i odwadnianiu (O2). Działanie to miało na celu wykazanie, że zmiany jakie zachodzą w charakterystyce osadów, w kolejnych procesach ich przeróbki mają wpływ na zawartość oraz formę chemiczną metali ciężkich.

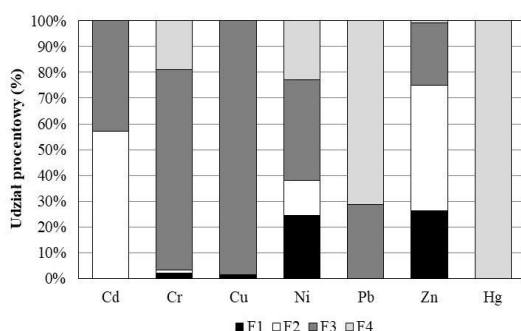
Wyniki badań wskazują, że osady ściekowe pobierane na końcu ciągu ich przeróbki odznaczały się wyższą wartością pH (8,4) oraz niższą wartością Eh (-304,0 mV), w porównaniu do osadów zmieszanych: 6,8 (pH) i -294,0 mV (Eh). Wzrost odczynu osadów po procesie stabilizacji beztlenowej świadczy o ich przefermentowaniu. Stwierdzono również, że osady ściekowe pobierane na końcu ciągu przeróbki odznaczały się wyższą zawartością metali, w porównaniu z osadami zmieszanymi. Średnia zawartość metali w osadach O1 wyniosła: 2,3; 66,1; 174,1; 17,1; 56,0; 2248,9 i 0,3 mg·kg⁻¹, odpowiednio dla Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn i Hg, z kolei w osadach O2: 4,5; 120,3; 280,7; 29,5; 121,5; 3448,5 i 1,2 mg·kg⁻¹. Można przypuszczać, że było to spowodowane wyższą koncentracją suchej masy w osadach O2 (187,4 g·kg⁻¹), w porównaniu do osadów O1 (33,8 g·kg⁻¹). Reasumując, charakterystyka fizykochemiczna analizowanych osadów ściekowych była zgodna z danymi literaturowymi (Tytła i in. 2016; Feizi i in. 2019; Gusiatin i in. 2018; Tytła 2019).

Zawartość poszczególnych metali ciężkich w osadach ściekowych można uszeregować w następujący sposób: Zn > Cu > Cr > Ni > Pb > Cd (szereg nie uwzględnia Hg) (Shrivastava i in. 2004). W badanych osadach, w odniesieniu do całkowitej zawartości metali ciężkich kolejność ta była następująca: Zn > Cu > Cr > Pb > Ni > Cd > Hg. Podobną tendencję stwierdzili również inni naukowcy (Li i in. 2014; Gusiatin i in. 2018). Przeprowadzone badania wykazały, że zawartość metali w analizowanych osadach ściekowych, nie przekroczyła wartości dopuszczalnych przy stosowaniu ich na cele przyrodnicze (Dz.U. 2015 poz. 257), tj. Cd (20 mg·kg⁻¹), Cr (500 mg·kg⁻¹), Cu (1000 mg·kg⁻¹), Ni (300 mg·kg⁻¹), Pb (750 mg·kg⁻¹), Zn (2500 mg·kg⁻¹) i Hg (16 mg·kg⁻¹). Jedynie w przypadku cynku stwierdzono, że jego stężenie w osadach O2 było wyższe od wartości dopuszczalnych przy stosowaniu osadów ściekowych w rolnictwie. Nie wyklucza to jednak wykorzystania tych osadów na inne cele przyrodnicze.

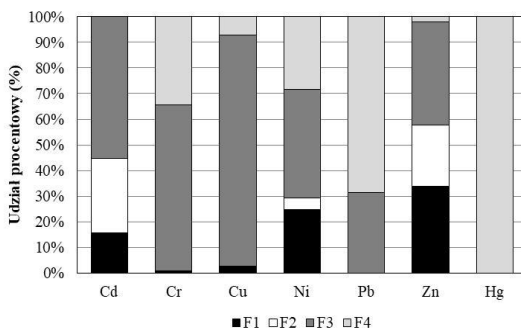
3.2 Wyniki ekstrakcji sekwencyjnej

Wyniki ekstrakcji sekwencyjnej metali ciężkich wg procedury BCR zaprezentowano na Rys. 1 i 2. Ekstrakcja sekwencyjna miała na celu zbadanie możliwości migracji metali ciężkich do środowiska gruntowo - wodnego, w kontekście przyrodniczego wykorzystania osadów ściekowych. Procentowy udział poszczególnych metali ciężkich w wydzielonych frakcjach osadów ściekowych był zróżnicowany i zależny od ich charakterystyki fizykochemicznej. Sumarycznie, poza pewnymi wyjątkami, osady charakteryzowały się większym udziałem metali ciężkich związanych z frakcjami niemobilnymi (F3 i F4), w porównaniu z tymi mobilnymi (F1 i F2), co potwierdzają również dane literaturowe (Yang i in. 2017; Gusiatin i in. 2018). Największy udział we frakcjach mobilnych wykazywały: cynk, kadm i nikiel, tj. odpowiednio: 74,9%; 57,1%; 38,1% (O1) oraz 57,6%; 44,7%; 29,4% (O2). W przypadku rtęci, jej udział ograniczał się wyłącznie do frakcji rezydualnej (F4). Weryfikację procedury ekstrakcji sekwencyjnej przeprowadzono porównując sumę czterech frakcji z całkowitymi stężeniami metali ciężkich w próbkach osadu, tj. stosując współczynnik odzysku (R). Odzysk metali ciężkich wahał się w granicach od 31,2% do 138,4%.

Zaobserwowano również, że osady ustabilizowane charakteryzowały się niższym udziałem poszczególnych metali we frakcjach mobilnych, w porównaniu do osadów zmieszanych. Świadczy to o pozytywnym wpływie procesów beztlenowej stabilizacji i odwadniania osadów na zmniejszenie mobilności metali. Podobną zależność zaobserwowali inni naukowcy (Álvarez i in. 2002; Wang i in. 2006). Powyższe informacje stanowią pozytywny aspekt w kontekście przyrodniczego zagospodarowania osadów ściekowych.



Rys. 1. Ekstrakcja sekwencyjna metali ciężkich w osadach ściekowych O1.

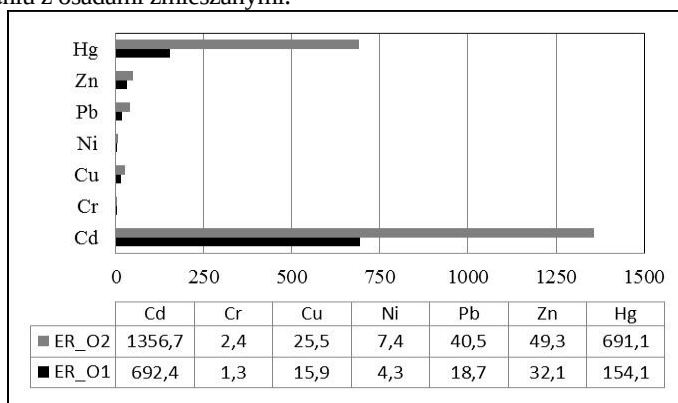


Rys. 2. Ekstrakcja sekwencyjna metali ciężkich w osadach ściekowych O2.

3.3 Ryzyko ekologiczne

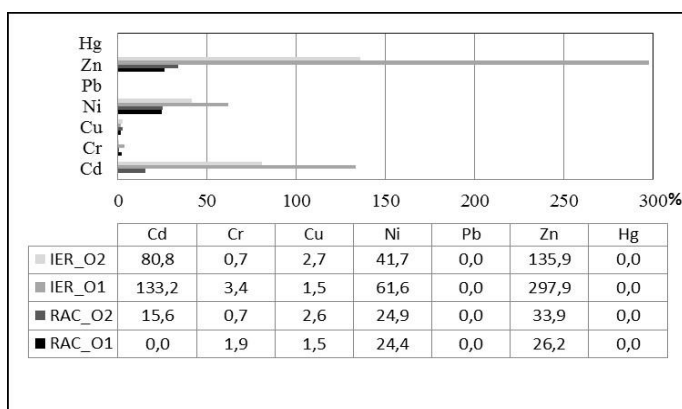
Ocenę ryzyka ekologicznego przeprowadzono w oparciu o wskaźniki odnoszące się do ogólnej zawartości metali ciężkich w osadach ściekowych oraz form chemicznych ich występowania. Biorąc pod uwagę aspekt stosowania osadów ściekowych na cele przyrodnicze, wśród rozpatrywanych wskaźników przeważają te odnoszące się do form chemicznych metali ciężkich, w tym dwa autorskie (Tytła 2020). Wszystkie wskaźniki ryzyka zostały scharakteryzowane w rozdziale „Materiał i Metody” (Tab. 2).

Obliczone wartości wskaźnika Potential Ecological Risk Factor (ER) (Hakanson 1980), odnoszącego się do ogólnej zawartości metali, jak również uwzględniającego ich toksyczność, wskazują że obecne w osadach kadm (ER=1356,7) i rtęć (ER=692,4) mogą stwarzać bardzo wysokie zagrożenie dla środowiska i organizmów żywych, w przypadku przyrodniczego wykorzystania ustabilizowanych osadów ściekowych (O2) (Rys. 3). Podobne obserwacje zaprezentowano również w innej pracach (Li i in. 2015; Duan i in. 2017; Tytła 2019). Ponadto osady te ze względu na wyższą zawartość metali stwarzają wyższe ryzyko w porównaniu z osadami zmieszanymi.



Rys. 3. Wartości wskaźnika ER.

Rozpatrując kolejne wskaźniki odnoszące się wyłącznie do form chemicznych występowania metali w osadach ściekowych, a mianowicie Risk Assessment Code (RAC) (Perin i in. 1985) oraz Individual Ecological Risk (IER) (wskaźnik autorski), potencjalne zagrożenie ekologiczne stwarzały cynk, kadm i nikiel. Powyższe obserwacje potwierdzają również dane literaturowe (Li i in. 2015; Yang i in. 2017; Tytła 2019). Wartości wskaźników RAC i IER obliczone w odniesieniu do cynku, niklu i kadmu, wyniosły odpowiednio: 26,2%; 24,4%; 0% (O1) i 33,9%; 24,9%; 15,6% (O2) (tj. od braku do wysokiego ryzyka) oraz 297,9%; 61,6%; 133,2% (O1) i 135,9%; 41,7%; 80,8% (O2) (tj. od niskiego do bardzo wysokiego ryzyka) (Rys. 4). Prawdopodobną przyczyną wzrostu mobilności kadmu (wyrażonego poprzez RAC), była zmiana charakterystyki osadów w procesie stabilizacji (zmiany pH, zawartości substancji organicznych, itp.). Należy tu jednak podkreślić, że wskaźniki RAC i IER prezentują różny sposób obliczenia wielkości ryzyka. A mianowicie RAC uwzględnia wyłącznie udział danego metalu w pierwszej frakcji (F1), natomiast IER uwzględnia obie frakcje mobilne (F1 i F2). W odniesieniu do wartości RAC, w osadach ustabilizowanych odnotowano wzrost udziału cynku, kadmu i niklu w pierwszej frakcji (F1). Jednakże nie przesądza to jeszcze o ogólnym wzroście mobilności tych pierwiastków, gdyż w oparciu o wartości IER stwierdzono, że osady te stwarzały mniejsze ryzyko ekologiczne, w porównaniu z tymi zmieszany, co jest pozytywnym zjawiskiem w kontekście przyrodniczego zagospodarowania ustabilizowanych osadów ściekowych.



Rys. 4. Wartości wskaźników RAC i IER.

Ostatnia grupa wskaźników, do której należą: Risk Index (RI) (Hakanson 1980) i Global Ecological Risk (GER) (wskaźnik autorski), dotyczy ryzyka stwarzanego przez wszystkie rozpatrywane metale ciężkie, odpowiednio w odniesieniu do ich ogólnej zawartości w osadach ściekowych, jak i formy chemicznej występowania. Przeprowadzone badania wykazały, że zarówno wartości wskaźnika RI, jak i GER wskazują, iż sumarycznie rozpatrywane metale mogą stwarzać bardzo wysokie ryzyko dla środowiska gruntowo - wodnego, co należy rozważyć przy wyborze sposobu zagospodarowania tych osadów ściekowych. Obliczone wartości wskaźników RI i GER wyniosły odpowiednio: 918,7% i 497,6 % (O1) oraz 2172,8% i 261,8% (O2). W odniesieniu do wskaźnika RI, także inni naukowcy wykazali, że pomimo iż wybrane metale w danej grupie pierwiastków nie powodują ryzyka, to w ujęciu ogólnym takie ryzyko istnieje (Li i in. 2015; Duan i in. 2017). Podobnie jak w przypadku wcześniej omawianych wskaźników, w tej grupie również można zauważyć odwrotną tendencję dotyczącą wielkości ryzyka ekologicznego szacowanego w oparciu o znajomość całkowitej zawartości metali ciężkich oraz ich form chemicznych występowania w osadach ściekowych - osady ustabilizowane, ze względu na wyższą zawartość metali ciężkich stanowiły potencjalne zagrożenie dla środowiska. Stwierdzono jednak, że mobilność (F1+F2) tych pierwiastków była mniejsza, niż w przypadku osadów zmieszanych, co stanowi pewnego rodzaju ochronę przed migracją metali ciężkich z osadów ustabilizowanych do środowiska gruntowo - wodnego.

4. Wnioski

Badania miały na celu przeprowadzenie analizy ryzyka ekologicznego, która w głównej mierze opierała się na znajomości form chemicznych metali ciężkich w osadach ściekowych, pobieranych w dwóch punktach ciągu ich przeróbki, tj. osady zmieszane oraz po stabilizacji i odwadnianiu. Stwierdzono, że całkowita zawartość metali w analizowanych osadach ściekowych była zróżnicowana. Prawdopodobnie wynikało to z różnicy w zawartości suchej masy, lub też zmiany charakterystyki osadów w procesie beztlenowej stabilizacji. W rozpatrywanych osadach ściekowych, w największej ilości występowały cynk i miedź, z kolei w najmniejszej kadm i rtęć. Sumarycznie wyższą zawartość metali zaobserwowano w osadach ustabilizowanych. W obu rodzajach osadów stwierdzono przewagę frakcji niemobilnych metali ($F3+F4$) nad tymi mobilnymi ($F1+F2$). Mniejszy udział metali ciężkich związanych z frakcjami mobilnymi odnotowano w osadach ustabilizowanych, co jest zjawiskiem pozytywnym, w aspekcie migracji tych pierwiastków z osadów ściekowych do środowiska gruntowo - wodnego. Największy udział we frakcjach mobilnych wykazywały Zn, Cd i Ni.

Analiza ryzyka ekologicznego w oparciu o wskaźnik ER, odnoszący się do ogólnej zawartości metali ciężkich w osadach ściekowych wykazała, że największe zagrożenie w wymiarze ekologicznym mogą powodować kadm i rtęć. Z kolei według wskaźników RAC oraz IER, uwzględniających znajomość form chemicznych metali, największe ryzyko stwarzały cynk, kadm i nikiel. Wobec tego, zasadnym wydaje się uwzględnienie w analizie ryzyka udziału metali w obu frakcjach mobilnych ($F1$ i $F2$). Analiza ryzyka ekologicznego w oparciu o wskaźniki RI oraz GER wykazała również, że sumarycznie metale obecne w rozpatrywanych osadach ściekowych mogą stwarzać potencjalne zagrożenie dla środowiska. Reasumując, uzyskane wyniki dowodzą, że identyfikacji form chemicznych metali ciężkich w osadach ściekowych stanowi kluczowy element w analizie ryzyka ekologicznego.

Źródło finansowania

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2018/02/X/ST10/02130 („Forma chemiczna metali ciężkich w osadach ściekowych jako wskaźnik ryzyka ekologicznego”) finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

5. Literatura

- Álvarez EA, Callejón Mochón M, Jiménez Sánchez JC i in. (2002) Heavy Metal Extractable Forms in Sludge From Wastewater Treatment Plants. *Chemosphere* 47: 765–775
- Duan B, Zhang W, Zheng H i in. (2017) Disposal Situation of Sewage Sludge from Municipal Wastewater Treatment Plants (WWTPs) and Assessment of the Ecological Risk of Heavy Metals for Its Land Use in Shanxi, China. *International Journal of Environmental. Research and Public Health* 14: 823.
- Feizi M, Jalali M; Renella G (2019) Assessment of Nutrient and Heavy Metal Content and Speciation in Sewage Sludge From Different Locations in Iran. *Natural Hazards* 95: 657–675.
- Gusiatin ZM, Kulikowska D, Klik BK i in. (2018) Ecological Risk Assessment of Sewage Sludge From Municipal Wastewater Treatment Plants: A Case Study. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 53: 1167–1176.
- GUS, Bank Danych Lokalnych (2019) <https://bdl.stat.gov.pl/BDL/start>
- Hakanson L (1980) Ecological Risk Index For Aquatic Pollution Control, a Sedimentological Approach. *Water Research* 14: 975–1001.
- Li J, Luo G, Gao J i in. (2015) Quantitative Evaluation of Potential Ecological Risk of Heavy Metals in Sewage Sludge From Three Wastewater Treatment Plants in Main Urban Area of Wuxi, *Chemistry and Ecology* 31: 235–251.
- Perin G, Craboledda L, Lucchese M i in. (1985) Heavy Metal Speciation in the Sediments of Northern Adriatic Sea - A New Approach for Environmental Toxicity Determination. In: Lakkas TD, editor. *Heavy Metal in the Environment 2*. CEP Consultants; Edinburgh, Scotland 454–456.

- PN-EN 12880:2004 Charakterystyka Osadów Ściekowych, Oznaczanie Suchej Pozostałości i Zawartości Wody, Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2004.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 6 lutego 2015 r. w Sprawie Komunalnych Osadów Ściekowych (Dz.U. 2015 poz. 257).
- Shrivastava SK, Banerjee DK (2004) Speciation of Metals in Sewage Sludge and Sludge - Amended Soils. *Water, Air, & Soil Pollution* 152: 219–232.
- Tessier A, Campbell PGC, Bisson M (1979) Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals. *Analytical Chemistry* 51: 844–851.
- Tyła M, Widziewicz K, Zielewicz Z (2016) Heavy Metals and its Chemical Speciation in Sewage Sludge at Different Stages of Processing. *Environmental Technology* 37: 899–908.
- Tyła M (2019) Assessment of Heavy Metal Pollution and Potential Ecological Risk in Sewage Sludge from Municipal Wastewater Treatment Plant Located in the Most Industrialized Region in Poland - Case Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16:2430.
- Tyła (2020) Identification of the Chemical Forms of Heavy Metals in Municipal Sewage Sludge as a Critical Element of Ecological Risk Assessment in Terms of Its Agricultural or Natural Use. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17:4640.
- Wang C, Li X-C, Ma H-T, Qian J, Zhai J-B (2006) Distribution of extractable fractions of heavy metals in sludge during the wastewater treatment process. *Journal of Hazardous Materials* 137: 1277–1283.
- Yang T, Huang H, Lai F (2017) Pollution Hazards of Heavy Metals in Sewage Sludge from Four Wastewater Treatment Plants in Nanchang, China. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 27: 2249–2259.

16. Zawartość metali w osadach ściekowych a ryzyko ekologiczne

The content of metals in sewage sludge vs ecological risk

Tyła Malwina⁽¹⁾, Widziewicz-Rzońca Kamila⁽¹⁾, Loska Krzysztof⁽²⁾

⁽¹⁾(Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, Zabrze

⁽²⁾Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Politechnika Śląska, Gliwice

Tyła Malwina: malwina.tyla@ipis.zabrze.pl; <https://orcid.org/0000-0003-3059-4471>

Słowa kluczowe: oczyszczalnia ścieków, metale ciężkie, analiza ryzyka

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki analizy ryzyka ekologicznego przeprowadzonej w oparciu o występowanie i stężenie wybranych metali w osadach ściekowych (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg), w kontekście ich przyrodniczego wykorzystania. Próbkę osadów (po procesie odwodnienia i higienizacji) pobierano z dwóch oczyszczalni ścieków (OS1 i OS2), zlokalizowanych na obszarze Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP), województwo śląskie. Jest to jeden z najbardziej zanieczyszczonych regionów w Polsce oraz Europie, tzw. environmental contamination „hot spot” area. Do oceny ryzyka ekologicznego, wykorzystano wybrane wskaźniki, tj. Geoaccumulation Index (I_{geo}), Contamination Factor (CF), Potential Ecological Risk Factor (ER) oraz Risk Index (RI). Wyniki badań wskazują, iż pomimo faktu, że zawartość poszczególnych metali w osadach z OS1 i OS2 nie przekroczyła ich dopuszczalnych stężeń w przypadku przyrodniczego zagospodarowania osadów ściekowych, to nadal pierwiastki te mogą stanowić zagrożenie dla środowiska i organizmów żywych. Przeprowadzone badania wykazały, że osady były w głównej mierze zanieczyszczone kadm, cynkiem i rtęcią (I_{geo} i CF). Biorąc pod uwagę toksyczność tych pierwiastków (ER), największe ryzyko ekologiczne powodowały kadm i rtęć. Stwierdzono również, że ogółem, metale obecne w analizowanych osadach stanowiły potencjalne zagrożenie (RI). Otrzymane wyniki wskazują, że ocena możliwości zastosowania osadów ściekowych na cele przyrodnicze wymaga przeprowadzenia analizy ryzyka ekologicznego, w oparciu o odpowiednie wskaźniki.

1. Wstęp

Najbardziej preferowaną i uzasadnioną ekonomicznie metodą zagospodarowania osadów ściekowych jest ich przyrodnicze wykorzystanie, m.in. w rolnictwie czy do rekultywacji (Li i in. 2015; Tyła i in. 2016). Takie postępowanie niesie ze sobą wiele korzyści, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, iż osady ściekowe charakteryzują się wysoką zawartością związków organicznych i humusowych, jak również substancji mineralnych i związków biogenych (azot i fosfor), które są niezbędne do życia roślinom oraz faunie glebowej (Zhang i in. 2017). Osady te zawierają również metale, w tym te uznawane za toksyczne, m.in. kadm (Cd), chrom (Cr), miedź (Cu), nikiel (Ni), ołów (Pb), cynk (Zn) i rtęć (Hg) (Duan i in. 2017; Tyła 2019). Oznacza to, że w zależności od stężenia i czasu ekspozycji, dany metal może stanowić zagrożenie, zarówno w ujęciu środowiskowym jak i zdrowotnym. Wiąże się to ze zdolnością tych pierwiastków do bioakumulacji w łańcuchu pokarmowym (Cantinho i in. 2016). Za najczęstsze źródła metali ciężkich w osadach ściekowych podaje się: ścieki z przemysłu, korozję przewodów kanalizacyjnych oraz spływy powierzchniowe z obszarów zurbanizowanych, terenów uprawnych i dróg (Milik i in. 2017). Wśród innych źródeł metali ciężkich można wyróżnić: farmaceutyki, środki do pielęgnacji ciała czy nielegalne zrzuty ścieków (Rizzardini i Goi 2014; Tyła 2019).

Aby osady ściekowe były dopuszczone do stosowania na cele przyrodnicze, muszą spełnić określone kryteria. Jednym z nich jest obecność metali. Dopuszczalne stężenia metali w osadach ściekowych w Polsce reguluje Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 6 lutego 2015 r. (Dz.U. 2015 poz. 257). Biorąc pod uwagę, iż poszczególne metale różnią się między sobą właściwościami czy zakresem stężeń w środowisku, jak również, że niektóre z nich są bardziej toksyczne od innych, należy mieć na uwadze, że samo odniesienie ich stężenia w osadach do obowiązujących aktów prawnych, może być niewystarczające w ocenie zagrożenia jakie pierwiastki te mogą stwarzać

zarówno dla środowiska jak i organizmów żywych, w tym ludzi. W związku z tym, rozpatrując szybkość zmian zachodzących w środowisku, a także najbardziej preferowany sposób zagospodarowania osadów ściekowych w Polsce, niezbędnym wydaje się podjęcie stanowczych działań, w zakresie wdrożenia stałego monitoringu osadów ściekowych pod kątem zawartości metali, niezależnie od wielkości czy charakterystyki danej oczyszczalni ścieków.

Przydatnym narzędziem, w ochronie środowiska wodno - gruntowego przed wtórnym zanieczyszczeniem metalami obecnymi w osadach ściekowych, wydaje się być analiza ryzyka ekologicznego. W analizie tej stosowane są różne wskaźniki. Mogą się one odnosić, m.in. do pojedynczego metalu lub grupy metali, ich toksyczności czy też negatywnego oddziaływania na organizmy żywe. Wśród tych wskaźników można wyróżnić, m.in. Geoaccumulation Index (I_{geo}) (Müller 1969), Contamination Factor (CF), Potential Ecological Risk Factor (ER) oraz Risk Index (RI) (Hakanson 1980).

Ważnym aspektem prezentowanej pracy jest również wybór obszaru badań. Osady ściekowe pobierano z dwóch komunalnych oczyszczalni ścieków znajdujących się na terenie Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP), w województwie śląskim. Jest to jeden z najbardziej zanieczyszczonych regionów w Polsce oraz Europie, tzw. environmental contamination „hot spot” area.

Badani miały na celu: (1) przeprowadzenie analizy ryzyka ekologicznego w oparciu o wskaźniki odnoszące się do zawartości metali (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn i Hg) w osadach ściekowych, pochodzących z dwóch komunalnych oczyszczalni ścieków; (2) wykazanie, że analiza ryzyka ekologicznego stanowi nieodłączny element w procedurze wyboru sposobu zagospodarowania osadów ściekowych.

2. Materiał i Metody

Materiał badawczy stanowiły osady ściekowe pochodzące z dwóch komunalnych oczyszczalni ścieków, tj. OS1 (RLM=143 292) i OS2 (RLM=156 667), znajdujących się na obszarze Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP) w województwie śląskim (Rys. 1). W obu analizowanych obiektach prowadzone są mechaniczne i biologiczne procesy oczyszczania ścieków (ścieki bytowo-gospodarcze i z przemysłu), w wyniku których powstają osady wstępne oraz nadmierne, poddawane kolejno zagęszczaniu, stabilizacji beztlenowej, odwadnianiu i higienizacji. Osady do badań pobierano na końcu ciągu ich przeróbki (osady odwodnione po procesie higienizacji). Próbkę pobierano kilkakrotnie w ciągu jednej doby, a następnie mieszano celem uśrednienia. W okresie wykonywania analiz osady ściekowe przechowywano w temperaturze 4°C.



Rys. 1. Lokalizacja oczyszczalni ścieków OS1 i OS2.

2.2 Metody

W próbkach osadów ściekowych wykonano pomiar pH oraz oznaczono stężenie suchej masy. Do pomiaru wartości pH wykorzystano miernik Multi HQ40D (Hach Lange). Oznaczenie suchej masy przeprowadzono zgodnie z normą PN-EN 12880:2004.

Analizy obejmowały również oznaczenie zawartości wybranych metali w osadach ściekowych (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn i Hg). W tym przypadku przygotowanie próbek do badań

obejmowało wstępne suszenie osadów przez okres 48 godzin w temperaturze 20°C do stanu powietrzno - suchego, a następnie do stałej masy w temperaturze 105°C. Po wykonaniu powyższych czynności osady mielono w celu uzyskania ziarna analitycznego (0,2 mm) oraz poddawano mineralizacji. W tym celu przygotowano odważki o masie 0,2 g, do których dodawano 3 cm³ stężonego HNO₃ i odparowywano na płycie grzejnej, po czym wprowadzano do naczyń teflonowych i zadawano 3 cm³ 65% HNO₃. Próbkę osadów mineralizowano w piecu mikrofalowym przez okres 8 minut przy mocy 1000W. Zawartość metali w próbkach osadów ściekowych oznaczano techniką płomieniowej absorpcyjnej spektrometrii atomowej (FAAS). Do oznaczenia zawartości rtęci wykorzystano technikę zimnych par (CV-AAS). Wszystkie wzorce przygotowywano w dniu wykonywania analiz. Każdą z analiz wykonywano w dwóch powtórzeniach.

Do oceny ryzyka ekologicznego wykorzystano wskaźniki, które zaprezentowano w Tab. 1.

Tab. 1. Wskaźniki ryzyka ekologicznego.

Wskaźnik	Wzór	Skala
Geoaccumulation Index (I _{geo}) (Müller 1969)	$I_{geo} = \log_2 \left(\frac{C_n}{1,5B_n} \right)$ C _n - stężenie metalu w próbce B _n - geochemiczna wartość tła w skorupie ziemskiej (Kabata - Pendias 2011) ¹	0 ≥ I _{geo} > 5 od braku do ekstremalnego zanieczyszczenia
Contamination Factor (CF) (Hakanson 1980)	$CF = \frac{C_{0-1}^i}{C_n^i}$ C ₀₋₁ ⁱ - średnie stężenie metalu w próbce C _n ⁱ - geochemiczna wartość tła w skorupie ziemskiej (Kabata - Pendias 2011) ¹	1 ≥ CF > 6 od niskiego do bardzo wysokiego zanieczyszczenia
Potential Ecological Risk Factor (ER) (Hakanson 1980)	$ER = T_f^i \cdot CF$ T - współczynnik toksyczności metalu ² CF - Contamination Factor	40 ≥ ER > 320 od niskiego do bardzo wysokiego ryzyka
Risk Index (RI) (Hakanson 1980)	$RI = \sum ER$	150 ≥ RI > 600 od niskiego do wysokiego ryzyka

¹ Cd (0,1 mg·kg⁻¹); Cr (100 mg·kg⁻¹); Cu (55 mg·kg⁻¹); Ni (20 mg·kg⁻¹); Pb (15 mg·kg⁻¹); Zn (70 mg·kg⁻¹); Hg (0,07 mg·kg⁻¹)

² Cd (30); Cr (2); Cu (5); Ni (5); Pb (5); Zn (1); Hg (40)

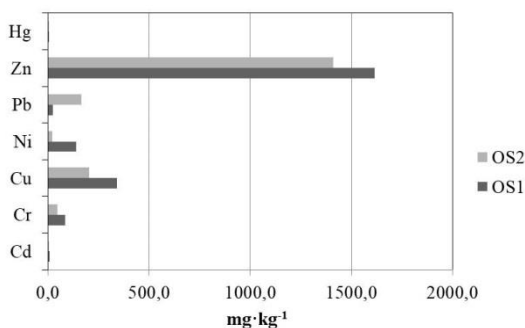
3. Wyniki i dyskusja

3.1 Charakterystyka osadów ściekowych

Osady ściekowych pobierano z dwóch komunalnych oczyszczalni ścieków zlokalizowanych na obszarze Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego. To największy w kraju oraz jeden z największych tego typu obszarów przemysłowych w Europie. GOP mieści się w centralnej części województwa śląskiego. Na jego obszarze znajdują się, takie miasta jak: Katowice, Gliwice, Bytom, Tychy, Zabrze, Ruda Śląska, Dąbrowa Górnicza, Chorzów, i inne. Mieści się tu wiele zakładów z branży przemysłu tradycyjnego, m.in. górnictwa, hutnictwa metali nieżelaznych, hutnictwa żelaza, przemysł elektrotechniczny, maszynowy, środków transportu, metalowy czy chemiczny. Biorąc pod uwagę powyższe fakty można stwierdzić, że wybór obszaru badań był uzasadniony.

Analizowane osady charakteryzowały się zbliżonym odczynem oraz stężeniem suchej masy, tj. 7,5 i 22,2% (OS1) i 7,4 i 20,5% (OS2), które były zbliżone do tych opisywanych w literaturze przedmiotu (Tytła i in. 2016; Feizi i in. 2019; Tytła 2019).

Metale (średnie stężenia) w rozpatrywanych osadach ściekowych tworzyły następujący szereg: $Zn > Cu > Ni > Cr > Pb > Cd > Hg$ (OS1) oraz $Zn > Cu > Pb > Cr > Ni > Cd > Hg$ (OS2). Można przypuszczać, że różnice w zawartości Pb i Ni były związane z odmienną charakterystyką ścieków dopływających do każdej z oczyszczalni ścieków. Jednakże, aby potwierdzić powyższe przypuszczenie konieczne jest przeprowadzenie bardziej szczegółowych badań pod kątem zawartości tych metali również w ściekach surowych. Podobny szereg metali w osadach ściekowych zaobserwowali także inni naukowcy (Shrivastava i in. 2004; Gusiatin i in. 2018). Zawartość kadmu ($9,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ - OS1; $4,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ - OS2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) i rtęci ($1,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ - OS1; $1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ - OS2) w analizowanych osadach ściekowych była niższa, w porównaniu do pozostałych pierwiastków. Wartości odchyłeń standardowych w odniesieniu do zawartości poszczególnych metali wyniosły: Cd ($0,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Cr ($0,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Cu ($6,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Ni ($2,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Pb ($0,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Zn ($40,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) i Hg ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) – dla OS1 oraz Cd ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Cr ($0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Cu ($3,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Ni ($8,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Pb ($16,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Zn ($53,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) i Hg ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) – dla OS2. Badania wykazały również, że stężenia poszczególnych metali nie przekroczyły wartości dopuszczalnych przy stosowaniu osadów ściekowych w rolnictwie oraz do rekultywacji gruntów na cele rolne (Dz.U. 2015 poz. 257), tj. Cd ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Cr ($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Cu ($1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Ni ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Pb ($750 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Zn ($2500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) i Hg ($16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Jest to szczególnie istotne w kontekście ochrony środowiska przed jego wtórnym zanieczyszczeniem tymi pierwiastkami. Zawartość metali w analizowanych osadach zaprezentowano na Rys. 2. Z kolei w Tab. 2, dla porównania zaprezentowano stężenia metali w osadach z innych oczyszczalni ścieków w Polsce i za granicą.



Rys. 2. Zawartość metali w osadach ściekowych.

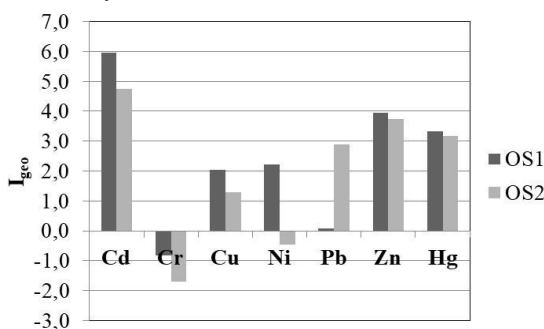
Tab. 2. Zawartość metali w osadach z oczyszczalni ścieków w Polsce i za granicą.

Lokalizacja	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg	Źródło
	mg·kg ⁻¹							
Chiny (Wuxi)	2,3	139,0	312,0	73,4	88,1	861,0	1,6	Li i in. (2015)
Chiszpania (Teneryfa)	-	24,1	37,1	8,0	26,4	544,0	-	Sánchez i in. (2017)
Polska (Warmia i Mazury)	1,6	-	216,9	91,5	8,0	994,5	-	Gusiatin i in. (2018)
Polska (woj. śląskie)	4,1	67,1	194,0	95,2	187,8	1851,6	1,0	Tytła (2019)
Iran (Arak)	15,3	144,7	91,3	48,8	98,5	2077,0	-	Feizi i in. (2019)

3.2 Analiza ryzyka ekologicznego

Analiza ryzyka ekologicznego została przeprowadzona w oparciu o wskaźniki odnoszące się do ogólnej zawartości wybranych metali w osadach ściekowych. Wskaźniki te zostały przedstawione w Tab. 1. Można je podzielić, na te odnoszące się do pojedynczego metalu lub ich grupy. Taki podział wskaźników był prezentowany także w innych pracach naukowych (Li i in. 2015; Duan i in. 2018; Tytła 2019).

W pierwszej grupie wskaźników można wyróżnić: Geoaccumulation Index (I_{geo}) (Müller 1969), Contamination Factor (CF) (Hakanson 1980) i Potential Ecological Risk Factor (ER) (Hakanson 1980). Obliczone wartości I_{geo} , wskazują, że analizowane osady były zanieczyszczone: kadmem, cynkiem, rtęcią oraz niklem i miedzią (OS1), jak również: kadmem, cynkiem, rtęcią oraz ołowiem i miedzią (OS2). Również inni naukowcy wskazywali kadm jako metal, który w największym stopniu zanieczyszcza osady ściekowe (Yang i in. 2017). Z kolei Duan i in. (2017) zaliczyli tu także cynk. W oparciu o uzyskane wyniki badań stwierdzono, że większe ryzyko wśród analizowanych osadów ściekowych stwarzały te pochodzące z oczyszczalni OS1. Wartości wskaźnika I_{geo} obliczone w oparciu o zawartość poszczególnych metali w badanych osadach ściekowych zaprezentowano na Rys. 3.

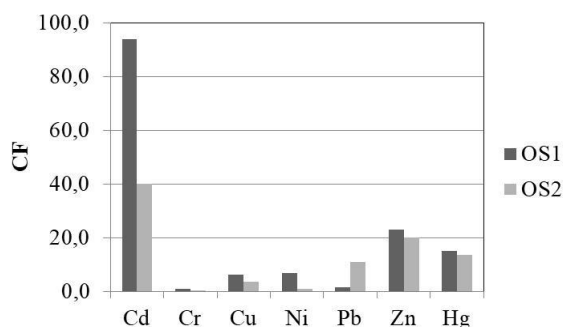


Rys. 3. Wartości wskaźnika I_{geo} .

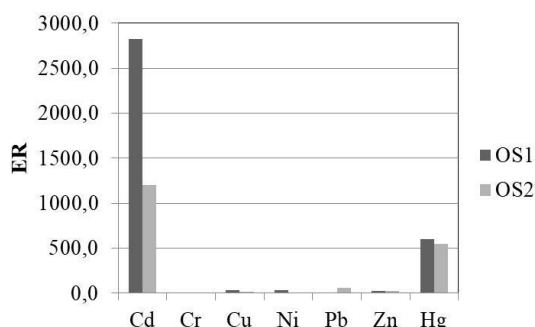
Rozpatrując wartości wskaźnika CF, stwierdzono że osady pochodzące z pierwszej oczyszczalni ścieków, podobnie jak w przypadku I_{geo} , były zanieczyszczone: kadmem, cynkiem, rtęcią oraz niklem i miedzią. Podobne rezultaty otrzymano w przypadku osadów z drugiego obiektu technologicznego, a mianowicie największe zagrożenie stwarzały: kadm, cynk, rtęć oraz ołów i miedź. Jednakże w przypadku osadów z oczyszczalni OS2, obliczone wartości wskaźnika CF wskazywały na niższy poziom zanieczyszczenia tych osadów rozpatrywanymi metalami. Co więcej, w przypadku chromu, nie stwierdzono jego negatywnego oddziaływania na jakość żadnego z osadów ściekowych ($CF=0,9$ - OS1 i $0,5$ - OS2). Podobne obserwacje poczynili również inni naukowcy (Liu i in. 2015). Wartości wskaźnika CF dla analizowanych metali zaprezentowano na Rys. 4.

Kojenym wskaźnikiem wykorzystanym do analizy ryzyka ekologicznego był Potential Ecological Risk Factor. Wskaźnik ten uwzględnia dodatkowo toksyczność każdego z metali. Obliczone wartości ER wskazują, że obecne w osadach kadm i rtęć, mogły stanowić potencjalne zagrożenie dla środowiska i organizmów żywych. Rozpatrując wartości ER, analizowane metale tworzyły następujący szereg: $Cd > Hg > Ni > Cu > Zn > Pb > Cr$ (OS1) oraz $Cd > Hg > Pb > Zn > Cu > Ni > Cr$ (OS2). Zarówno w osadach z pierwszej, jak i z drugiej oczyszczalni ścieków, wartości wskaźnika ER w odniesieniu do kadmu i rtęci były bardzo wysokie i wyniosły odpowiednio: 2820,0 (Cd) i 600,0 (Hg) dla O1 oraz 1200,0 (Cd) i 542,9 (Hg) dla O2. Pozostałe metale nie stwarzały tak wysokiego ryzyka (ER; 1,7-34,7 - OS1; 0,9 – 55,2 - OS2). Podobne obserwacje poczynili również Li i in. (2015). Badali oni osady ściekowe pochodzące z trzech oczyszczalni ścieków w Chinach i wykazali, że zarówno kadm jak i rtęć stwarzały bardzo wysokie ryzyko ekologiczne (średnio: $ER=662,9$ - Cd; $ER=529,7$ - Hg). Prawdopodobną przyczyną różnicy pod kątem wartości wskaźnika ER, obliczonego dla kadmu w osadach pochodzących z Polski i Chin mogła być odmienna charakterystyka ścieków surowych, szczególnie tych pochodzących z przemysłu. Należy tu podkreślić, że pomimo, iż kadm i rtęć występują w niskich stężeniach w środowisku, to są one wysoce

toksyczne dla ludzi i zwierząt (w nadmiernych ilościach), natomiast mniej toksyczne dla roślin (Tiruneh i in. 2014). To ważna informacja mając na uwadze, że główną metodą zagospodarowania osadów ściekowych w Polsce jest ich rolnicze wykorzystanie. Wartości wskaźnika ER dla analizowanych metali przedstawiono na Rys. 5.

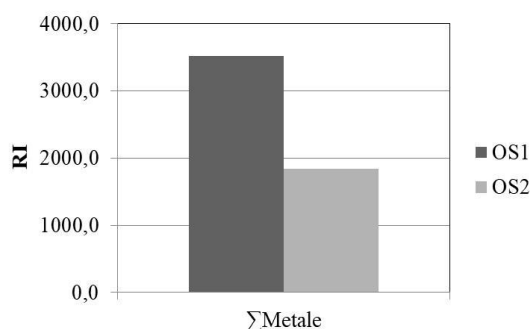


Rys. 4. Wartości wskaźnika CF.



Rys. 5. Wartości wskaźnika ER.

Rozpatrując ostatni z omawianych wskaźników, odnoszący się do wszystkich metali w analizowanych osadach ściekowych, tj. Risk Index stwierdzono, że sumarycznie pierwiastki te stwarzały potencjalne zagrożenie w wymiarze ekologicznym. RI dla osadów z pierwszej i drugiej oczyszczalni ścieków, wyniósł odpowiednio: 3518,4 i 1842,9. Podobne obserwacje poczynili również inni naukowcy (Liu i in. 2015; Li i in. 2015; Yang i in. 2017; Duan i in. 2017). Ponadto potwierdzili oni, że pomimo, iż poszczególne metale w danej grupie analizowanych pierwiastków nie powodują ryzyka, to w ujęciu ogólnym takowe może istnieć. Analogicznie do innych wskaźników, ze względu na niższą zawartość metali, osady ściekowe z oczyszczalni OS2 stwarzały mniejsze zagrożenie dla środowiska i organizmów żywych, w porównaniu z osadami z OS1. Obliczone wartości wskaźnika RI dla metali w osadach ściekowych zaprezentowano na Rys. 6.



Rys. 6. Wartości wskaźnika RI.

4. Wnioski

W niniejszej pracy przeprowadzono analizę ryzyka ekologicznego w oparciu o wybrane wskaźniki, tj. Geoaccumulation Index (I_{geo}), Contamination Factor (CF), Potential Ecological Risk Factor (ER) oraz Risk Index (RI). Badania miały na celu wykazanie, że dla precyzyjnej oceny możliwości przyrodniczego zagospodarowania osadów ściekowych, konieczne jest przeprowadzenie analizy ryzyka ekologicznego, pod kątem zawartości metali. Próbkę osadów do badań pobierano z dwóch komunalnych oczyszczalni ścieków (OS1 i OS2), zlokalizowanych na obszarze Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP), będącego najbardziej uprzemysłowionym regionem w Polsce. Stwierdzono, że osady pochodzące z oczyszczalni OS1 charakteryzowały się wyższą zawartością poszczególnych metali w porównaniu z osadami z OS2, wyjątek stanowiły chrom i ołów. W obu rozpatrywanych osadach ściekowych, w największej ilości występowały cynk i miedź, a w najmniejszej kadm i rtęć.

Analiza ryzyka ekologicznego przeprowadzona, m.in. w oparciu o wartości wskaźnika I_{geo} , wykazała, że rozpatrywane osady były zanieczyszczone: kadmem, cynkiem, rtęcią oraz niklem i miedzią (OS1), jak również: kadmem, cynkiem, rtęcią oraz ołowiem i miedzią (OS2). Powyższe obserwacje potwierdziły również wartości wskaźnika CF. Rozpatrując obliczone wartości wskaźnika ER, który dodatkowo uwzględnia toksyczność metali wykazano, że potencjalne ryzyko w przypadku przyrodniczego zagospodarowania osadów ściekowych stwarzały kadm i rtęć. Należy tu podkreślić, że były to metale których stężenia w osadach ściekowych były najniższe, spośród wszystkich analizowanych pierwiastków. Rozważając ogólne ryzyko jakie mogą powodować metale w danej grupie, oraz w oparciu o wartości wskaźnika RI wykazano, że zarówno w przypadku osadów z oczyszczalni OS1, jak i OS2, sumarycznie pierwiastki te stwarzały potencjalne ryzyko dla środowiska.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują na konieczność uwzględniania w procedurze wyboru sposobu zagospodarowania osadów ściekowych analizy ryzyka ekologicznego, w oparciu o znajomość zawartości metali. Działanie to ma szczególne znaczenie w przypadku przyrodniczego zagospodarowania osadów ściekowych.

Źródło finansowania

Wyniki zawartości metali w osadach ściekowych pozyskano w ramach realizacji projektu „DoktoRIS - program stypendialny na rzecz innowacyjnego Śląska” współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego.

5. Literatura

- Cantinho P, Matos M, Trancoso MA i in. (2016) Behaviour and Fate of Metals in Urban Wastewater Treatment Plants: A Review. *International Journal of Environmental Science and Technology* 13: 359–386.
- Duan B, Zhang W, Zheng H i in. (2017) Disposal Situation of Sewage Sludge from Municipal Wastewater Treatment Plants (WWTPs) and Assessment of the Ecological Risk of Heavy Metals for Its Land Use in Shanxi, China. *International Journal of Environmental. Research and Public Health* 14: 823.
- Feizi M, Jalali M; Renella G (2019) Assessment of Nutrient and Heavy Metal Content and Speciation in Sewage Sludge from Different Locations in Iran. *Natural Hazards* 95: 657–675.
- Gusiatin ZM, Kulikowska D, Klik BK i in. (2018) Ecological Risk Assessment of Sewage Sludge From Municipal Wastewater Treatment Plants: A Case Study. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 53: 1167–1176.
- Hakanson L (1980) Ecological Risk Index For Aquatic Pollution Control, a Sedimentological Approach. *Water Research* 14: 975–1001.
- Kabata-Pendias A (2011) Trace Elements in Soils and Plants, 4th ed.; Taylor & Francis: London, UK, 41–42.

- Li J, Luo G, Gao J i in. (2015) Quantitative Evaluation of Potential Ecological Risk of Heavy Metals in Sewage Sludge From Three Wastewater Treatment Plants in Main Urban Area of Wuxi, Chemistry and Ecology 31: 235–251.
- Liu J, Zhuo Z, Sun S i in. (2015) Concentrations of Heavy Metals in Six Municipal Sludges in Guangzhou and Their Potential Ecological Risk Assessment for Agricultural Land Use. Polish Journal of Environmental Studies 24: 165–174.
- Milik JK, Pasela R, Lachowicz M i in. (2017) The Concentration of Trace Elements in Sewage Sludge From Wastewater Treatment Plant in Gniewino. Journal of Ecological Engineering 18: 118–124.
- Müller G (1969) Index of Geoaccumulation in Sediments of the Rhine River. GeoJournal 2: 108–118.
- PN–EN 12880:2004 Charakterystyka Osadów Ściekowych, Oznaczanie Suchej Pozostałości i Zawartości Wody, Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2004.
- Rizzardini CB, Goi D (2014) Sustainability of Domestic Sewage Sludge Disposal. Sustainability 6: 2424–2434.
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 6 lutego 2015 r. w Sprawie Komunalnych Osadów Ściekowych (Dz.U. 2015 poz. 257).
- Sánchez CH, Gutiérrez Á, Galindo JM i in. (2017) Heavy Metal Content in Sewage Sludge: A Management Strategy for an Ocean Island. Revista de Salud Ambiental 17: 3-9.
- Shrivastava SK, Banerjee DK (2004) Speciation of Metals in Sewage Sludge and Sludge - Amended Soils. Water, Air, & Soil Pollution 152: 219–232.
- Tiruneh AT, Fadiran AO, Mtshali JS (2014) Evaluation of the Risk of Heavy Metals in Sewage Sludge Intended for Agricultural Application in Swaziland. International Journal of Environmental Science and Technology 5: 197–216.
- Tytła M, Widziewicz K, Zielewicz Z (2016) Heavy Metals and its Chemical Speciation in Sewage Sludge at Different Stages of Processing. Environmental Technology 37: 899–908.
- Tytła M (2019) Assessment of Heavy Metal Pollution and Potential Ecological Risk in Sewage Sludge From Municipal Wastewater Treatment Plant Located in the Most Industrialized Region in Poland- Case Study. International Journal of Environmental Research and Public Health 16: 1–16.
- Yang T, Huang H, Lai F (2017) Pollution Hazards of Heavy Metals in Sewage Sludge From Four Wastewater Treatment Plants in Nanchang, China. Transactions of Nonferrous Metals Society of China 27: 2249–2259.
- Zhang X, Wang X Q, Wang DF (2017) Immobilization of Heavy Metals in Sewage Sludge during Land Application Process in China: A Review. Sustainability 9: 2020.

17. Zawartość wody w aerozolach – analiza bibliometryczna

The contents of water in aerosols – bibliometric analysis

Widziewicz-Rzońca Kamila, Tytła Malwina

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, Zabrze

Widziewicz-Rzońca Kamila: kamila.widziewicz@ipis.zabrze.pl;

<https://orcid.org/0000-0001-5332-0583>

Słowa kluczowe: woda związana z PM, analiza bibliometryczna, CiteSpace, systematic review, pył zawieszony

Streszczenie

Woda związana z cząstkami aerozolu (ang. particulate matter, PM) jest jednym ze składników powietrza oraz ośrodkiem umożliwiającym wiele przemian chemicznych zachodzących w atmosferze. Ten integralny składnik PM wpływa zarówno na klimat, bierze udział w powstawaniu chmur, warunkuje widzialność, jak też pośrednio (poprzez wpływ na szybkość nukleacji ziaren pyłu) warunkuje jego szkodliwość zdrowotną. W ostatnich latach ilościowe określenie zawartości wody w PM stało się jednym z kluczowych zagadnień w obszarze szeroko pojętych nauk o atmosferze. Aby wyznaczyć główne kierunki badań związane z tematyką wody w aerozolach i jasno zdefiniować, które z nich są najbardziej aktywnie rozwijającymi się zagadnieniami, prześledzono bazy literaturowe Web of Science (WOS) w za lata 1996–2018. Praca stanowi dogłębną analizę bibliometryczną badającą istniejące luki i nowe trendy w temacie wody związanej z aerozolem z użyciem pakietu oprogramowania CiteSpace. Za pomocą narzędzi modelowych określono, którzy autorzy, kraje, instytucje i czasopisma w największym stopniu wpłynęli/ły na postęp badań w zakresie wody związanej z PM? Stworzono listę 25 publikacji w tematyce wody związanej z PM, które uzyskały największy oddźwięk wśród społeczności naukowej całego świata. Przeprowadzono także analizę współwystępowania słów, pozwalając na zidentyfikowanie głównych podobszarów w zakresie omawianej problematyki.

1. Wprowadzenie

Chociaż skład chemiczny pyłu zawieszonego jest (ang. PM, particulate matter) jest dość dobrze znany, to jednym ze składników pyłu wzbudzających szczególne zainteresowanie zwłaszcza w ostatnich latach jest obecność w nim wody, zarówno trwale jak i nietrwale związanej ze strukturą cząstek PM (Canepari i in. 2017; Rogula-Kozłowska i in. 2017; Su i in. 2018). Siła tego wiązania różni się w zależności od składu chemicznego pyłu jak również jego pochodzenia, a stosunek ilościowy i jakościowy wody wolnej (sorpcyjnej) do wody trwale związanej z cząstkami PM (tzw. woda konstytucyjna) może być stosunkowo łatwo określony przy pomocy metody termograwimetrycznej (ang. TG analysis). Stosunek masy wody trwale i nietrwale związanej z PM określają dwa kluczowe parametry – tzw. wilgotność względna rozpyłu (DRH, ang. deliquescence relative humidity) i wilgotność względna krystalizacji (CRH, ang. crystallization relative humidity) (Casati i in. 2015), których wartość jest niezbędna np: do kalkulacji wzrostu higroskopijnego aerozolu, wykorzystywanego w różnych praktycznych zastosowaniach, jak np.: w teledetekcji (Gholizadeh i in. 2016). Wspomniane parametry określają progi wilgotności względnej powietrza, przy których zachodzą zmiany fazy wodno-stałej od roztworu nasyconego do ciała stałego (Casati, 2015). W miarę wzrostu RH związki PM, takie jak krystaliczne rozpuszczalne sole $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lub NH_4NO_3 , przechodzą przemianę fazową i stają się cząstkami wodnego roztworu (EPA, 2004). W warunkach malejącej wilgotności względnej cząstki poruszają się po krzywej równowagi do punktu rozpyłu i pozostają rozpuszczone w przesyconym roztworze. Gdy RH wciąż ulega zmniejszeniu, cząstki w roztworze nasyconym tracą parę wodną i wracają do początkowej postaci krystalicznej. Cząsteczki aerozolu w atmosferze występują w postaci kropelek roztworu przesyconego (cząstki cieczy), a także cząstek stałych (PM). Woda konstytucyjna - trwale związana ze strukturą PM podlega zmianom ilościowym w mniejszym stopniu w stosunku do wody kondensującej na powierzchni cząstek PM, choć zasadniczo stosunek masowy tych klas wody jest

przesunięty w kierunku wody związanej. Woda konstytucyjna może zostać odparowana dopiero w wyższych temperaturach lub pod wpływem środków odwadniających. Innymi słowy oznacza to, że kondycjonowanie filtrów z pyłem zawieszonym poprzedzające etap pomiarów grawimetrycznych nie gwarantuje usunięcia z cząstek pyłu wody odpowiedzialnej za błędy ważenia. Prace naukowe których celem było oszacowanie ilości wody zawartej w cząstkach pyłu wskazują, że w warunkach wilgotności powietrza i temperatury charakterystycznych dla rzeczywistych warunków pobierania pyłu ilość wody związanej z PM wynosić może od kilku do kilkudziesięciu procent jego masy (Rogula-Kozłowska i in. 2017; Canepari i in. 2017; Perrino i in. 2016). Obfitość wtórnych składników nieorganicznych, takich jak azotany i siarczany, jest jednym z najważniejszych czynników determinujących higroskopijność aerozolu (Świetlicki i in. 2008). Woda związana z PM przyspiesza również tworzenie wtórnego aerozolu nieorganicznego i organicznego, a przy wysokich poziomach wilgotności względnej powietrza może promować częstotliwość epizodów smogowych (Wang i in. 2019). W ostatnich latach pojawiło się wiele publikacji dotyczących mass closure – a więc domknięcia masy pyłu, w których woda związana z PM traktowana jest jako brakujący element domknięcia masy (Perrino et al., 2016; Rogula-Kozłowska i in. 2019; Tsyro, 2005). Informacje dotyczące wody związanej z PM pojawiają się najczęściej w artykułach w kontekście składu jonowego i jonów rozpuszczalnych w wodzie (El-Sayed i in. 2018; Tsai i Kuo 2005) oraz rozpuszczalnych form węgla organicznego (Decesari i in. 2001; Duplissy i in. 2011). Rzadkie są prace, w których wodę związaną z PM oznacza się ilościowo metodami termodesorpcji materii aerozolowej (Wittmaack i Keck 2004;) z użyciem analizatorów termograwimetrycznych lub titracyjnych (Karl Fischer). Część prac jedynie w sposób pośredni odnosi się do kwestii obecności wody w PM – traktując wodę w kontekście artefaktów podczas pomiarów grawimetrycznych jego masy (Rasmussen i in. 2010). Próby jakościowego jak i ilościowego określenia form występowania wody w PM pojawiała się w literaturze niezwykle rzadko (Canepari i in. 2013; Canepari i in. 2017; Perrino i in. 2016). Szczegółową analizę bibliometryczną publikacji w temacie wody związanej z pyłem można przeprowadzić w sposób tradycyjny – poprzez przegląd literatury w interesującym temacie. Stworzenie takiego przeglądu, choć możliwe, jest zadaniem trudnym oraz niezwykle czasochłonnym. Prostsza metoda wymaga wykorzystania dostępnych narzędzi służących tzw. analizie bibliometrycznej.

Istnieją programy służące systematyzacji danych bibliometrycznych, które w oparciu o modele matematyczne oraz operacje komputerowe są w stanie mapować „stan wiedzy” w określonym temacie. Wspomniane programy stosunkowo szybko oraz w przystępny dla użytkownika sposób określają, które tematy skupione w danej gałęzi wiedzy rozwijają się w sposób szczególnie dynamiczny; są także w stanie udzielić odpowiedzi na pytanie, jakich trendów rozwoju danej domeny naukowej należy oczekiwać w określonym czasie? Do najbardziej popularnych programów służących analizie bibliometrycznej danych literaturowych należą HistCite, CiteSpace, Pajek, Sci2, BibExcel i Thomson Data Analyzer (TDA). Ze względu na prostotę działania oraz szybkość przeprowadzanych obliczeń jednym z najczęściej wykorzystywanych programów tego typu jest CiteSpace. CiteSpace został zaprojektowany, aby odpowiedzieć na pytania dotyczące struktury i dynamiki konkretnych dziedzin wiedzy oraz ich wizualizacji. Dzięki funkcjom jakie oferuje, jak np.: analizie współwystępowania i analizie cytowań dużej liczby zapisów bibliograficznych program ten jest w stanie zbadać trendy i wzorce charakterystyczne dla danej dziedziny (domeny) naukowej oraz wskazać kierunek rozwoju w konkretnych obszarze badań (Chen 2013; 2016).

2. Metodyka

Bazę danych literaturowych w temacie wody związanej z PM przygotowano korzystając platformy Web of Science. Wybór bazy Web of Science podyktowany był wysoką powtarzalnością wyszukiwani rekordów – oznacza to, że wyniki wyszukiwania są odtwarzalne i dodatkowo podlegają łatwemu raportowaniu. Wyszukiwanie prowadzono z użyciem funkcji TOPIC search stosując następujące słowa kluczowe: {"aerosol" AND "water" OR "chemical mass balance"} AND {"particulate matter" OR "PM-bound water" OR "hygroscopic"}, do bazy włączono jedynie oryginalne artykuły oraz przeglądy literaturowe w języku angielskim. Łączna liczba znalezionych rekordów wyniosła 1513 Uwzględniono tylko oryginalne artykuły i recenzje opublikowane w latach

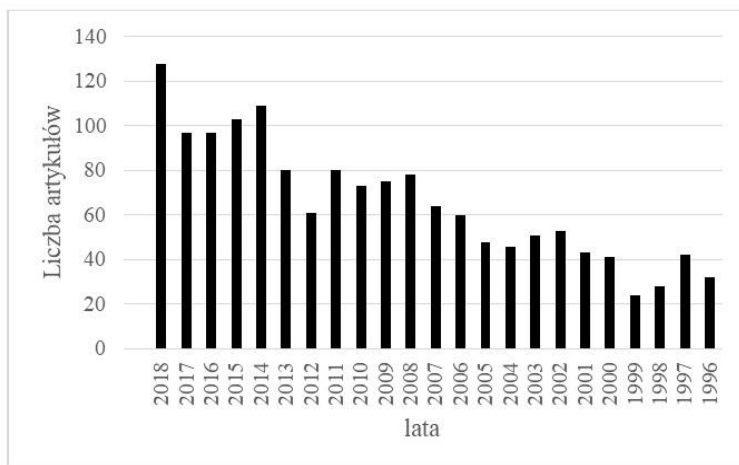
1996–2018. Ograniczenie zakresu czasowego opierało się na jasnym i mocnym uzasadnieniu. Najbardziej wpływowe prace dotyczące eksperymentalnych pomiarów higroskopijności cząstek stałych i procesów wpływających na higroskopijny wzrost cząstek, ale także prace badawcze dotyczące kondensacji, nukleacji i równań wzrostu higroskopijnego cząstek aerozolowych przeprowadzono pod koniec lat 90' (US EPA 2004). Wobec powyższego rok 1996 r. został wykorzystany, jako punkt startowy do dalszej analizy. Analiza pełnych tekstów wspomnianych prac wykazała, że kryterium kwalifikowalności spełniało tylko 101 prac; dla celów organizacji baza ta nazywana będzie „zestawem danych” lub „siecią”. Liczba artykułów, w których zawartość wody związanej z PM oszacowano na sposób ilościowo wynosiła jedynie 23.

Znalezione w Web of Science publikacje (autorzy, tytuły, nazwy czasopism itd.) wraz z towarzyszącymi im referencjami zostały pobrane do bazy danych EndNote i przekonwertowane na dokument tekstowy. Analizy prowadzono z użyciem wersji oprogramowania CiteSpace V. Parametry wyjściowe zdefiniowano następująco: (1) Time Slicing: 1996–2018; (2) Years Per Slice: “1”; (3) Term Source: Title, Abstract, Author Keywords, and Keyword Plus; (4) Node Type: select the corresponding one each time; (5) Selection Criteria: the top 50, (6) Pruning: Minimum Spanning Tree and Pruning Sliced Networks; and (7) Visualization: Cluster View-Static and Show Merged Network.

Z uwagi na obszerność materiału zebranego w trakcie analiz, niniejszy rozdział prezentuje zebrane wyniki w sposób wybiórczy. Pełny opis uzyskanych wyników jest opublikowany w pracy pt: „First systematic review on PM-bound water – exploring the existing knowledge domain using the CiteSpace Software” (Widziewicz i Tytla 2020).

3. Wyniki i dyskusja

Trend wzrostu publikacyjnego interesujących prac można określić jako stopniowy - z 32 publikacji w 1996 r. do 128 publikacji w 2018 r. z podziałem na dwa etapy: pierwszy miał miejsce w latach 1996-2005, odzwierciedlony stopą wzrostu równą 1,5 w porównaniu z rokiem startowym; druga faza wykazywała pewne przyspieszenie, które trwało od 2006 r. do 2018 r., ze stopą wzrostu, 3.0 co wskazuje na rosnące zainteresowanie tematyką wody związanej z PM (Rys. 1). Wzrost liczby publikacji w tym okresie czasu dość dobrze pokrywał się z fazą ekspansji liczby prac naukowych w temacie modeli chemicznego domknięcia masy stosowanych do określania niespójności między charakterystyką chemiczną a grawimetryczną masy PM (Tsyro 2005; Rees i in. 2004).



Rys. 1. Liczba prac naukowych w temacie wody związanej z pyłem w okresie 1996-2018 (Web of Science).

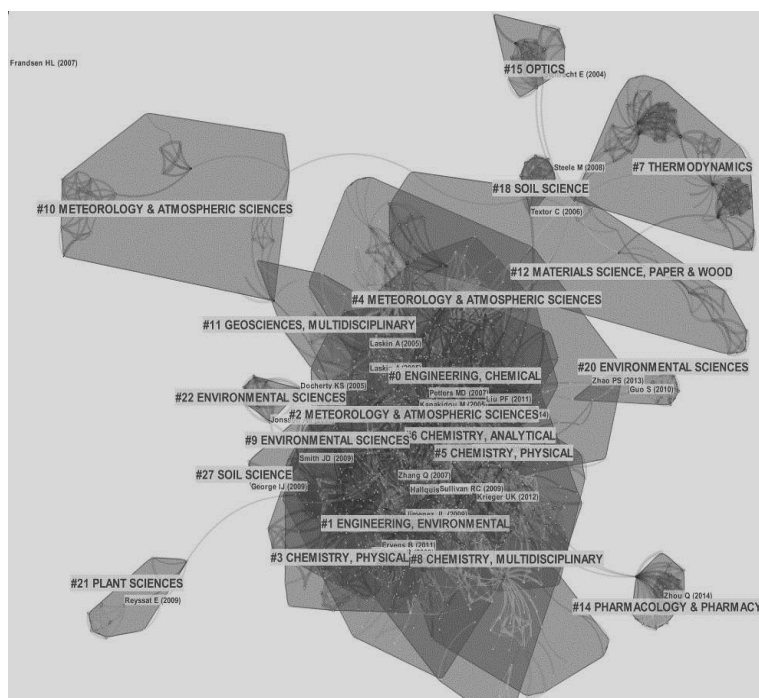
Tab. 1 przedstawia 15 czołowych instytucji naukowych i naukowo-badawczych publikujących najwięcej prac w temacie wody związanej z PM. Na czele listy znajduje się Narodowa Agencja Kosmiczna NASA z liczbą rekordów 59 (3,9% wszystkich artykułów

w zbiorze danych), a następnie University of California System (3,7 %) i Chińska Akademia Nauk (3,6%). Spośród 10 wyróżnionych instytucji, aż 6 znajduje się w Stanach Zjednoczonych, 3 spośród nich mieszczą się w Europie, a jeden w Chinach.

Tab. 1. Liczba prac dotyczących wody związanej z cząstkami aerozolu w podziale na instytucje badawcze.

Lp.	Instytucja	Liczba rekordów	Kraj
1	National Aeronautics Space Administration NASA	59	USA
2	University of California System	57	USA
3	Chinese Academy of Sciences	55	Chiny
4	Leibniz Institut fur Tropospharenforschung Tropos	55	Europa
5	Centre National de la Reherche Scientifique CNRS	46	Europa
6	United States Department of Energy DOE	42	USA
7	University System of Georgia	37	USA
8	Georgia Institute of Technology	34	USA
9	Max Planck Society	33	Europa
10	National Oceanic Atmospheric Admin NOAA USA	33	USA

Aby porównać wyniki otrzymane z bazy WOS (Web of Science) prezentowane w zakładce „metrics” stworzono mapę sieci współ-cytowań na poziomie kategorii (dyscypliny) (Rys 2.). Zaprezentowana na mapie sieć składa się z 76 węzłów (ang. „nodes” i 337 połączeń (ang. „links” (fioletowe połączenia wskazują na dłuższą współpracę między dyscyplinami). Współistniejące kategorie można ogólnie podzielić na 5 grup: meteorologia i nauki o atmosferze (po lewej); związaną z ochroną środowiska i ekologią (rośliny) (lewa strona, dół mapy); chemia fizyczna i fizyka atmosfery (centrum); chemia atmosfery (centrum mapy); farmakologia i farmacja (prawy dolny róg) oraz materiałoznawstwo (prawy górny róg).



Rys. 2. Wyniki tzw. co-occurring analysis - kategorie tematyczne współistniejące w bazie danych.

Ta kategoryzacja dobrze odpowiada miarom wygenerowanym przez WOS, przedstawionym w Tab.2. Największe węzły odpowiadają kategoriom zajmowanym przez większość cytowanych czasopism charakteryzujących się największą centralizacją - na przykład - innymi słowy, są najbardziej dynamicznie rozwijającymi się dyscyplinami w kontekście badań wody związanej z aerozolem.

Tab. 2. Dziesięć głównych kategorii naukowych, w których pojawiają się prace z tematyki wody związanej z pyłem.

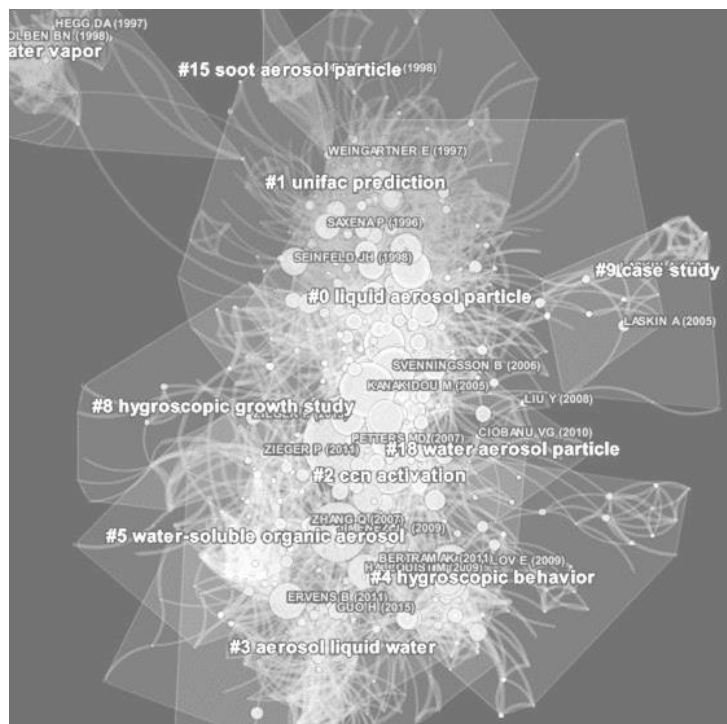
Lp.	Kategoria/dyscyplina	Liczba rekordów
1	Meteorology Atmospheric Sciences	61
2	Environmental Sciences	50
3	Engineering Chemical	9
4	Geosciences Multidisciplinary	9
5	Engineering Environmental	7
6	Chemistry Physical	6
7	Materials Science Multidisciplinary	6
8	Physics Applied	6
9	Engineering Civil	5
10	Engineering Mechanical	5

Najczęściej cytowanymi autorami pod względem liczby cytowań (rok wydania, liczba zliczeń) byli Tang i Munklewitz (1994, 223); Seinfeld i Pandis (1998, 207), Saxena i Hildemann (1997, 150), Petters i Kreidenweis (2008, 141), Gysel M. (2003, 140) (Rys. 3). Jak pokazano na Rys. 4. istnieje silna współpraca między najczęściej cytowanymi autorami; na przykład Saxena P. i Seinfeld J.H; Svenningsson i Kanakidou. Ta współpraca znajduje odzwierciedlenie w pomiarze współwystępowania par terminów w tytułach artykułów. Na przykład Svenningsson jest powiązany z Uniwersytetem w Lund (Szwecja) i wspólnie z naukowcami z Włoskiej Krajowej Rady ds. Badań Naukowych prowadzą liczne badania dotyczące higroskopijności cząstek, tworzenia się chmur i mgły w dolinie Po Valley (Włochy); podczas gdy Kanakidou pracuje na Wydziale Chemii Środowiska na University of Crete (Grecja), a jej zainteresowania badawcze koncentrują się głównie na chemicznych i fizycznych aspektach składu aerozoli. Pomimo odległości geograficznej, która dzieli Szwecję od Grecji, relacje między autorami dotyczące zainteresowania tematyką wody związanej z cząstkami aerozoli są dość silne. Prezentowana mapa jest także prostą miarą występowania autorów w tych samych artykułach (wzajemnych cytowań).

Ciemno-szare koła (tzw. „citation burst”) na Rys. 3. wskazują, że wszyscy autorzy stosują terminy o stosunkowo dużym wpływie i wysokim poziomie uwagi ze strony odbiorców w pewnym okresie procesu badawczego, na przykład w przypadku artykułów: Seinfeld i Pandis (1998) „Chemia i fizyka atmosfery od zanieczyszczenia powietrza do zmian klimatu” oraz Saxena i Hildemann (1996) „Rozpuszczalne w wodzie substancje organiczne w cząsteczkach atmosferycznych: krytyczny przegląd literatury i zastosowanie termodynamiki do identyfikacji związki kandydujące”. Kluczowymi terminami w tej sieci są “hygroscopic growth study”; “water aerosol particle”; “liquid aerosol particle”; “water soluble organic aerosol”; “hygroscopic behavior”; “aerosol liquid water” “soot aerosol particle” and “water vapor”, co wskazuje, że mają one silny wpływ na charakter sieci.

Jednym z najważniejszych parametrów odzwierciedlających ogólny sukces publikacyjny tzw. citation bursts. (Rys. 4). Autorem z największą wartością citation burst był Zhang (wartość citation burst = 11,47) (ryc. 6), liczba ta nie odpowiada jednak ogólnej liczbie cytowani a jest miarą tzw. wybuchu publikacyjnego w określonym czasie a więc pośrednio aktywności konkretnego obszaru badań. Wybuch publikacyjny może trwać rok a nawet wiele lat i dostarcza dowodów, że dana publikacja była związana z tzw. falą cytowań, innymi słowy, przyciągnęła niezwykle uwagę ze strony społeczności naukowej. Ponadto, jeśli dany klaster (wyodrębniony pod względem homogeniczności

fragment sieci) zawiera wiele węzłów o wysokim citation burst, wówczas klaster jako całość rejestruje aktywny obszar badań lub pojawiający się trend, jak pokazano na Rys. 3.



Rys. 3. Schemat węzłowy współwystępowania autorów oraz słów/fraz w tytułach publikacji (różne odcienie szarości na mapie wskazują rok początku współpracy między autorami, gdzie kolor ciemnoszary oznacza dłuższą współpracę a kolor jasno szary krótszą). Rozmiar węzła reprezentuje ogólną liczbę cytowań (według autora), a pierścienie pokazują cytowanie autora według przedziału czasu. Skupienia w sieci opisane etykietami oznaczają terminy (słowa kluczowe) zawarte najczęściej w tytułach publikacji z tematyki wody związanej z PM. Siła łącząca dwa węzły (grubość linii) odnosi się do częstotliwości współwystępowania terminów.

Cited Authors	Year	Strength	Begin	End	1996 - 2018
ZHANG XQ	1996	11.4736	1996	2005	
ANDREWS E	1996	8.7299	1997	2006	
HANSSON HC	1996	8.1692	1999	2008	
FERRON GA	1996	8.151	1996	2007	
MCMURRY PH	1996	7.9367	1998	2005	
PRUPPACHER HR	1996	7.276	1996	2001	
SVENNINGSSON IB	1996	7.2586	1997	2005	
COVERT DS	1996	7.0871	1996	2005	
FITZGERALD JW	1996	6.3143	1996	2005	
HEGG DA	1996	6.1673	1997	2000	
LI W	1996	5.5917	1996	2001	
HANEL G	1996	5.4081	1997	2009	
HINDS WC	1996	5.3834	1996	2004	
HOPPEL WA	1996	5.1075	1997	2001	
COHEN MD	1996	4.8574	1997	2008	
MATHER GK	1996	4.8135	1997	2004	
KING MD	1996	4.6505	1996	2003	
WEAST RC	1996	4.3751	1997	2004	
RAES F	1996	4.0499	1998	2003	
BEARD KV	1996	3.9158	1996	1997	
KIM YP	1996	3.8998	1997	2000	
SHULMAN ML	1996	3.8524	1997	1999	
BLANCHARD DC	1996	3.5429	1998	2003	
WINKLER P	1996	3.4826	1996	1999	
PITCHFORD ML	1996	3.446	1997	2007	

Rys. 4. Lista najczęściej cytowanych autorów pod względem wartości citation burst. Szare słupki prezentują czas trwania citation burst.

Analiza citation burst polega na wykrywaniu znaczących odchyłeń od trendów rozwojowych, określanych jako "wykrywanie wybuchów" (ang. *burst detection*). Algorytm *burst detection* opiera się na dorobku wcześniejszych badań innych naukowców, a jego podstawową zaletą jest umiejętność identyfikacji znaczących tendencji niezależnie od tego, jak często cytowane są publikacje dominujące w określonym nurcie badawczym (Chen, 2016), co jest korzystne w odniesieniu do nowatorskich tematów i podejść badawczych.

4. Wnioski

Prezentowana praca stanowi systematyczny przegląd bibliometryczny skierowany zwłaszcza do badaczy zajmujących się naukami aerozolowymi. Celem tego przeglądu był opis ewolucji domeny naukowej związanej z tematyką tzw. „PM-bound water” (wody wbudowanej w strukturę aerozolu), jaka nastąpiła na przełomie ostatnich 23 lat. W oparciu o wizualizację graficzną oraz zestawienia tabelaryczne praca ta miała na celu rozpoznanie potencjalnych trendów rozwoju wspomnianej tematyki, syntezę informacji dotyczących pochodzenia oraz obecności wody związanej z PM w powietrzu, reakcji chemicznych odpowiedzialnych za zarodkowanie ziaren PM, oraz identyfikację braków publikacyjnych we wspomnianych zagadnieniach. Jako narzędzia realizacji tego celu wykorzystano program CiteSpace. Określono którzy autorzy, kraje, instytucje naukowe, oraz dyscypliny naukowe w największym stopniu przyczynili się do rozwoju wiedzy w kontekście wody związanej z PM. Uzyskane wyniki pozwoliły określić, że prężny rozwój wspomnianej dyscypliny nastąpił w okolicy roku 2005. Pod względem całkowitej liczby publikacji w temacie PM-bound water USA wykazuje największą wydajność. Zhang XQ; Andrews E; Hansson HC; Ferron GA; McMurphy PH wnieśli stosunkowo duży wkład w dziedzinę badań nad wodą związaną z aerozolem, z silnym wpływem odzwierciedlonym przez dużą liczbę cytowań autora. Najbardziej wpływowy artykuł (odzwierciedlony największą ogólną liczbę cytowań) w okresie 1996-2018 należy do Świetlicki i in. (2008). Największym zaangażowaniem badawczym odzwierciedlonym liczbą prac naukowych dotyczących wody atmosferycznej cieszą się National Aeronautics Space Administration NASA (USA) wraz z University of California (USA) i Chinese Academy of Sciences (Chiny). Analiza najważniejszych słów kluczowych lub występowania najwyższych terminów wskazuje, że najwięcej publikacji skupia się na następujących zagadnieniach: “hygroscopic growth study”; “water aerosol particle”; “liquid aerosol particle”; “water soluble organic aerosol”; “hygroscopic behaviour”; “aerosol liquid water” “soot aerosol particle” and “water vapor”. Wciąż brakuje prac dotyczących relacji wody związanej z PM ze zdarzeniami smogowymi (Wang i in. 2019), jak i prac w tematyce PM-bound water source apportionment a więc próby określenia pochodzenia wody związanej z PM. Przyszłe trendy w dziedzinie wody związanej z PM prawdopodobnie rozwiną się w kilku kierunkach: odpowiednie ilościowe pomiary jej zawartości; warunki wilgotnościowe, jakich doświadczają cząstki w atmosferze, determinujące ich zachowanie, skład chemiczny cząstek aerozolu określający ich zdolność do pobierania wody, błędy analityczne wpływające na pomiar wody związanej z PM. Nieuchronnie spornym i wartym dyskusji zagadnieniem w podobnych pracach jest wybór źródła danych do tzw. systematic review, silnie zależnego od kryteriów wyszukiwania dobranej na sposób arbitralny. Należy jednak pamiętać, że maksymalnie duża liczba słów kluczowych (które nie mają charakteru synonimów) zwiększa precyzję poszukiwań.

Informacja o finansowaniu

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2016/23/D/ST10/02705 „Woda atmosferyczna jako marker pochodzenia pyłu zawieszonego” finansowanego ze środków” Narodowego Centrum Nauki.

5. Literatura

Canepari S, Simonetti G, Perrino C (2017) Mass Size distribution of Particle-Bound Water. Atmospheric Environment 165: 46-56.

- Casati M, Rovelli G, D'Angelo L i in. (2015) Experimental Measurements of Particulate Matter Deliquescence and Crystallization Relative Humidity: Application in Heritage Climatology. *Aerosol and Air Quality Research* 15: 399–409.
- Chen C. (2016) CiteSpace: A Practical Guide for Mapping Scientific Literature.
- Decesari S., Facchini MC, Matta E (2001) Chemical Features and Seasonal Variation of Fine Aerosol Water-Soluble Organic Compounds in the Po Valley, Italy. *Atmospheric Environment* 35: 3691-3699.
- Duplissy, J., DeCarlo PF, Dommen J i in. (2011) Relating Hygroscopicity and Composition of Organic Aerosol Particulate Matter. *Atmospheric Chemistry and Physics* 11: 1155-1165.
- El-Sayed MMH, Ortiz-Montalvo DL, Henningan CJ (2018) The Effects of Isoprene and NO_x on Secondary Organic Aerosols Formed Through Reversible and Irreversible Uptake to Aerosol Water. *Atmospheric Chemistry and Physics* 18: 1171-1184.
- Gholizadeh MH, Melesse AM., Reddi LA (2016) A Comprehensive Review on Water Quality Parameters Estimation Using Remote Sensing Techniques *Sensors* 16, 1298.
- Perrino C., Catrambone M, Farao C i in. (2016) Assessing the Contribution of Water to the Mass Closure of PM₁₀. *Atmospheric Environment* 140: 555-564.
- Rasmussen PE, Gardner HD, Niu J (2010) Buoyancy-Corrected Gravimetric Analysis of lightly loaded filters. *Air and Wastewater Management Association* 60: 1065-1077.
- Rogula-Kozłowska W, Widziewicz K, Majewski G. (2017) A Simple Method for Determination of Total Water in PM₁ Collected on Quartz Fiber Filters. *Microchemical Journal*, 132: 327-332.
- Rogula-Kozłowska W, Majewski G, Widziewicz K i in. (2019) Seasonal Variations of PM₁-Bound Water Concentration in Urban Areas in Poland. *Atmospheric Pollution Research* 10: 267-273.
- Świetlicki E., Hansson HC, Hameri K i in. (2008) Hygroscopic Properties of Submicrometer Atmospheric Aerosol Particles Measured with H-TDMA Instruments in Various Environments - A Review. *Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology* 60: 432-469.
- Tsai Y I, Kuo SC (2005) PM_{2.5} Aerosol Water Content and Chemical Composition in a Metropolitan and a Coastal Area in Southern Taiwan. *Atmospheric Environment* 39: 4827-4839.
- Wang Y, Chen Y (2019) Significant Climate Impact of Highly Hygroscopic Atmospheric Aerosols in Delhi, India. *Geophysical Research Letters* 46: 5535–5545.
- Wittmaack K, Keck L (2004) Thermodesorption of Aerosol Matter on Multiple Filters of Different Materials For a More Detailed Evaluation of Sampling Artifacts. *Atmospheric Environment* 38: 5205-5215.
- Seinfeld JH, Pandis SN (1998) *Atmospheric Chemistry and Physics from air pollution to climate change*. New York. John Wiley and Sons, Incorporated.
- US EPA (2004) *Air Quality Criteria for Particulate Matter Volume I of II*. EPA/600/p-99/002aF.
- Rees SL, Robnson A, Khlystov A i in. (2004) Mass Balance Closure and the Federal Reference Method for PM_{2.5} in Pittsburgh, Pennsylvania. *Atmospheric Environment* 38: 3305-3318.
- Seinfeld JH, Pandis SN (1998) *Atmospheric Chemistry and Physics from air pollution to climate change*. New York. John Wiley and Sons, Incorporated.
- Saxena P, Hildemann LM (1997) Water Absorption by Organics: Survey of Laboratory Evidence and Evaluation of UNIFAC for Estimating Water Activity. *Environmental Science & Technology* 31: 3318-3324.
- Widziewicz-Rzońca K, Tytła M (2020) First systematic review on PM-bound water: exploring the existing knowledge domain using the CiteSpace software. *Scientometrics* .
<https://doi.org/10.1007/s11192-020-03547-w>

18. Wpływ wody atmosferycznej na wyniki pomiarów grawimetrycznych masy filtrów stosowanych do pobierania pyłu zawieszonego

Atmospheric water as an artifact in gravimetric measurement of filters used for PM collection

Widziewicz-Rzońca Kamila, Tytła Malwina

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, Zabrze

Widziewicz-Rzońca Kamila: kamila.widziewicz@ipis.zabrze.pl;

<https://orcid.org/0000-0001-5332-0583>

Słowa kluczowe: masa PM, błędy ważenia, pomiary masy PM, zawartość wody, Karl Fischer

Streszczenie

W artykule opisano wyniki badań dotyczących wpływu różnych warunków temperaturowo-wilgotnościowych kondycjonowania filtrów stosowanych powszechnie i na szeroka skalę do pobierania pyłu zawieszonego (ang. particulate matter, PM) na wahania ich masy oraz określenia wpływu tych warunków na zawartość w nich wody, zarówno luźno jak i trwale związanej z ich strukturą materiałową. Do kwantyfikacji zawartości wody w nieekspozowanych (czystych) materiałach filtracyjnych w funkcji temperatury (18°C; 22°C) i wilgotności (20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90) %RH wykorzystano następujące typy filtrów: włókno kwarcowe (Q) i szklane (G), PTFE oraz nylon (N). Ponadto określono wpływ czasu kondycjonowania (24h, 48h) na dokładność pomiarów masy filtrów. Wszystkie analizy chemiczne zawartości wody przeprowadzono metodą miareczkowania kulometrycznego techniką Karla Fischera. Uzyskane wyniki wskazują, że filtry kwarcowe oraz nylonowe są najbardziej podatne na zmiany zawartości wody przy zmieniających się poziomach wilgotności, a zatem są mniej odpowiednie do określania masy cząstek (zwłaszcza ultra-drobnych). Z uwagi na znaczną hydrofobowość materiałową wpływ zmiennych warunków wilgotnościowych kondycjonowania filtrów z PTFE na wahania ich masy jest pomijalny a zawartość wody w tych filtrach jest zbliżona do poziomów w próbach ślepych. Przedstawione w pracy wyniki są ważnym wkładem w stan wiedzy w dziedzinie oceny przydatności różnych rodzajów materiałów filtracyjnych do konkretnych kampanii pomiarowych.

1. Wprowadzenie

Obawy społeczne związane z narażeniem na obecne w powietrzu atmosferycznym pyły zawieszone (PM) doprowadziły do znacznego polepszenia dokładności metod i technik analizy grawimetrycznej. W roku 1997 Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (US EPA) ustanowiła Federalną Metodę Referencyjną (US EPA 1997) dotyczącą kolekcjonowania pyłów drobnych (PM_{2,5}) na filtrach z politetrafluoroetylenem (PTFE). Zgodnie z tą metodą pomiar grawimetryczny masy PM polega na odjęciu masy pustego (nieekspozowanego) filtra od masy filtra zawierającego próbkę pyłu PM_{2,5} (filtr po ekspozycji). Aby maksymalnie zminimalizować błędy pomiarowe wynikające ze zmienności warunków środowiskowych ważenia filtrów US EPA (US EPA 1998) określiło wytyczne dotyczące zapewniania jakości zalecające 24-godzinne kondycjonowanie filtrów z PTFE (zarówno nieobciążonych jak i obciążonych PM) w zakresie temperatur 20–23±2°C i wilgotności względnej powietrza (RH) 30–40%±5% RH. Protokoły opracowane przez Europejski Komitet Normalizacyjny (CEN) do pomiaru masy gruboziarnistych cząstek stałych (PM₁₀) (EN 12341 1998) jak i cząstek drobnych PM_{2,5} (EN 14907, 2005) umożliwiają większą różnorodność w zakresie materiałów filtracyjnych stosowanych do pobierania PM i przewidują dłuższy czas kondycjonowania (48 godz.), a także bardziej restrykcyjne warunki temperaturowe (20±1°C) i szerszy zakres RH (50±5%) w porównaniu z wytycznymi EPA (US EPA 1998).

Wcześniejsze prace w zakresie udoskonalenia wyników analizy grawimetrycznej koncentrowały się przede wszystkim na charakterystyce metrologicznej metodologii ważenia oraz określenia czynników będących źródłem niepewności w pomiarach masy, w tym warunków wilgotności względnej, temperatury powietrza, ciśnienia powietrza, obecności przeciągów, wibracji,

wpływu ładunku elektrostatycznego, stabilności filtra, wyporu powietrza (Lawless i in. 1999; Koistinen i in. 1999; Hänninen i in. 2002; Carlton i in. 2002; Wunderli i in. 2003). Wahanias masy filtrów, jak i błędy w wynikach pomiarów grawimetrycznych PM wynikają jednak nie tylko z samych warunków prowadzenia ważenia ale także procesów mających wpływ na zmianę charakterystyki fizyko-chemicznej filtra: (1) adsorpcji i uwalniania - odparowywania związków organicznych zaadsorbowanych na filtrach; (2) adsorpcji i ulatniania się azotanu amonu (3); artefaktów związanych z założeniami modelowymi odnośnie szacowania masy poszczególnych składników pyłu, które nie są mierzone bezpośrednio a w oparciu o tzw. współczynniki przeliczeniowe (4) strat powstałych w wyniku transportowania filtrów (filtry kwarcowe i z włókna szklanego) (5) ulatniania się niektórych składników lotnych PM na skutek podwyższonej temperatury na wlocie głowicy pobornika (6), zakłóceń w działaniu aspiratorów do pobierania PM w różnych warunkach meteorologicznych i polowych (7), a także obecności pary wodnej (8).

Ilość wody zatrzymanej przez filtr do pobierania PM jest w rzeczywistości sumą wody związanej z PM oraz ilością wody sorbowanej przez materiał filtra. Ilościowe określenie zawartości wody związanej z filtrem nieobciążonym jest jednak kluczowe dla prawidłowej oceny rzeczywistej masy PM. Masa nieobciążonych filtrów, ulega wahaniam nawet pomiędzy filtrami pochodzącymi z tej samej serii w zależności od temperatury i wilgotności powietrza w trakcie procesu kondycjonowania. Podczas gdy wahania zawartości wody pomiędzy nieobciążonymi i obciążonymi filtrami PM w zależności od zmieniających się warunków wilgotności i temperatury zostały opublikowane w kilku pracach (Dick i in. 2000; Hu i in. 2011; Speer i in. 1997; 2003; Canepari i in. 2013; 2017) to wahania zawartości wody w czystych (nieobciążonych) filtrach testowane były stosunkowo rzadko. Wpływ wilgotności powietrza w przypadku nieobciążonych filtrów jest zwykle określany ilościowo na podstawie ograniczeń dotyczących zmiany masy podczas wielu sesji ważenia. Tylko nieliczne artykuły rozpoznają ilość pustej zawartości wody filtracyjnej za pomocą termogravimetrii (analiza TG) lub jeszcze rzadziej - metodą miareczkowania Karla Fischera. Zawartość wody w nieobciążonych filtrach zależy nie tylko od kondycjonowania, ale także od „historii” filtra, tj. Warunków otaczającego powietrza podczas pakowania lub transportu filtra. Należy pamiętać, że ilość wody sorbowanej lub odparowanej z powierzchni powlekanego (próbkowanego) filtra jest wypadkową zachowania zarówno filtra, jak i próbki (które fizycznie i chemicznie są całkowicie różne).

2. Metodyka

2.1 Warunki prowadzenia eksperymentu

Celem badań była ocena ilościowa wpływu różnych warunków temperaturowo-wilgotnościowych kondycjonowania filtrów do pobierania pyłu zawieszonego (ang. PM, particulate matter) na przyrost/ubytek ich masy pomiędzy 24h i 48h czasem kondycjonowania ΔM (mean $\pm$ SD) μg oraz wpływu tych warunków na zawartość w nich wody. Do kwantyfikacji zawartości wody w nieekspozowanych (czystych) materiałach filtracyjnych w funkcji temperatury i wilgotności wykorzystano metodę miareczkowania kulometrycznego techniką Karla Fischera. Testowano następujące typy filtrów: włókno kwarcowe (Quartz) i szklane (Glass), PTFE oraz nylon (N). Przeprowadzono 16 niezależnych eksperymentów w dwóch powtórzeniach (8 zakresów wilgotności x dwa zakresy temperatur x cztery typy filtrów) x 5 replikacji każdego filtra, co dało łączną liczbę testowanych filtrów wynoszącą 10 240 sztuk.

Filtry ważono z użyciem wagi Mettler Toledo (USA); zakres: 0,001 mg - 0,1 mg; rozdzielczość 2 μg po 24h i 48h od rozpoczęcia procesu kondycjonowania. Warunki kondycjonowania w pokoju wagowym utrzymywano w granicach 18-21,8°C oraz 38,1-45,5% RH. Następnie wykondycjonowane filtry poddawano działaniu różnych warunków temperaturowych i wilgotnościowych (18°C oraz 22°C; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90% RH) w komorze klimatycznej (Vitromat, Mytron Bio- und Solartechnik GmbH) podłączonej do stacji pogodowej Ventage Pro 2 (Davis Instruments, USA); wewnątrz komory zainstalowano dodatkowy (porównawczy) czujnik temperatury i wilgotności, co zapewnia dokładniejszy poziom detekcji panujących wewnątrz warunków. Czas ekspozycji ustawiono na 24 godziny. Warunki wilgotności i temperatury

w pomieszczeniu wagowym były również kontrolowane za pomocą bezprzewodowego systemu monitorowania temperatury i wilgotności. Po ekspozycji w komorze klimatycznej filtry natychmiast przenoszono do wysuszonych walek pomiarowych (250°C, 24 godziny; przechowywane w eksykatorze) i zamykano aluminiowymi kapslami z przegrodą membranową. Operacje kapslowania filtrów w wialkach przeprowadzono wewnątrz tzw. AtmosBag'ów (Sigma Aldrich) w celu wyeliminowania sorpcji dodatkowych porcji wody atmosferycznej. Do oznaczania zawartości wody w filtrach stosowano metodę miareczkowania kulometrycznego techniką Karla-Fischera (Kulometr 831 KF, Metrohm AG, Herisau, CH) wyposażony w piec (874 Oven Sample Processor; Metrohm). W tej metodzie miareczkowania punkt końcowy określa się za drodze elektrochemicznej. Innymi słowy, woda obecna w próbce filtra jest zużywana przez reakcję KF, do momentu zgromadzenia niewielkiego nadmiaru jodu; przez podwójną elektrodę Pt określającego koniec miareczkowania. Ze względu na ograniczenia temperaturowe związane z poszczególnymi punktami topnienia każdego rodzaju filtra, maksymalna temperatura uwalniania wody w procesie KF'a została dostosowana do określonego typu filtrów (filtry kwarcowe i szklane 220°C; filtry nylonowe 100°C, filtry teflonowe 60°C) przy czasie ekstrakcji wynoszącym 3000 s. Zawartość wody podawano w [µg] masy wody w przeliczeniu na masę filtra [µg]. Zastosowane temperatury ekstrakcji pozwoliły na odparowanie zawartej w filtrach wody całkowitej (zarówno wody zaadsorbowanej jak i trwale związanej ze strukturą filtra).

2.2 Analiza statystyczna wyników

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programów Excel (Office) i pakietu Statistica 13. Masy filtrów zostały obliczone jako średnia arytmetyczna z dwóch kolejnych ważeń filtra (po 24 i 48 godzinach). Błędy (różnice) w całkowitej masie filtra między ważeniami obliczono jako wartości odchylenia standardowego (SD) średniej masy filtrów. Z uwagi na brak normalności rozkładów zmiennej „masa filtra” w poszczególnych grupach (grupowanie wg zmiennej RH%) za pomocą testu Shapiro-Wilka ($p < 0,05$) do dalszych analiz zmienności wewnątrzgrupowej wykorzystano test nieparametryczny – ANNOVA dwuczynnikowa ($p < 0,05$).

2.3 Walidacja metodyki pomiarowej

Aby ocenić jakość opracowanej metody oznaczania wody w nieobciążonych filtrach, oznaczono wodę w dwóch certyfikowanych materiałach odniesienia: FF Oven Hydranal Water Standard 220°C – 230°C (HYD; Fluka Analytical) i 1% Apura Water Standard Oven (WSO; ACS Merck KGaA), zawierające odpowiednio $5,55 \pm 0,05\%$ i $1,0 \pm 0,03\%$ wody. Zgodnie z informacjami przygotowanymi przez Fluka (Hydranal Manual, hydranal-honeywell.com) i podanymi w certyfikacie analizy obu CRM'ów optymalna naważka tych materiałów niezbędna do analizy wynosiła 80 mg w przypadku WSO i 200 mg w przypadku HYD (3 powtórzenia).

Granice wykrywalności (LOD) i kwantyfikacji (LOQ) obliczono przez pomiar zawartości wody w próbce ślepej (zawartość wody w pustej wialce) plus trzy odchylenie standardowe (w przypadku LOD) i plus dziesięć odchyleń standardowych (w przypadku LOQ), zgodnie ze wzorem:

$$\text{LOD} = X_{b1} + 3S_{b1},$$

$$\text{LOQ} = X_{b1} + 10S_{b1},$$

gdzie X_{b1} jest średnią zawartością wody w próbce ślepej, a S_{b1} jest odchyleniem standardowym serii pomiarów próby ślepej (łącznie 10 powtórzeń).

W przypadku ślepych prób przygotowanych w warunkach laboratoryjnych (wysuszone, puste wialki kapslowane w warunkach analizy) typowa zmienność zawartości wody w ślepej próbce w ciągu dnia była na poziomie $\text{LOD} = 42,21 \pm 13,3 \mu\text{g}$; $\text{LOQ} = 42,21 \pm 44,35 \mu\text{g}$. Dla ślepych prób (przechowywanych w eksykatorze i kapslowanych w ATMOS Bagu) wartości LOD i LOQ były znacznie niższe i wynosiły odpowiednio: $\text{LOD} = 20,6 \pm 18,73 \mu\text{g}$; $\text{LOQ} = 20,6 \pm 62,4 \mu\text{g}$.

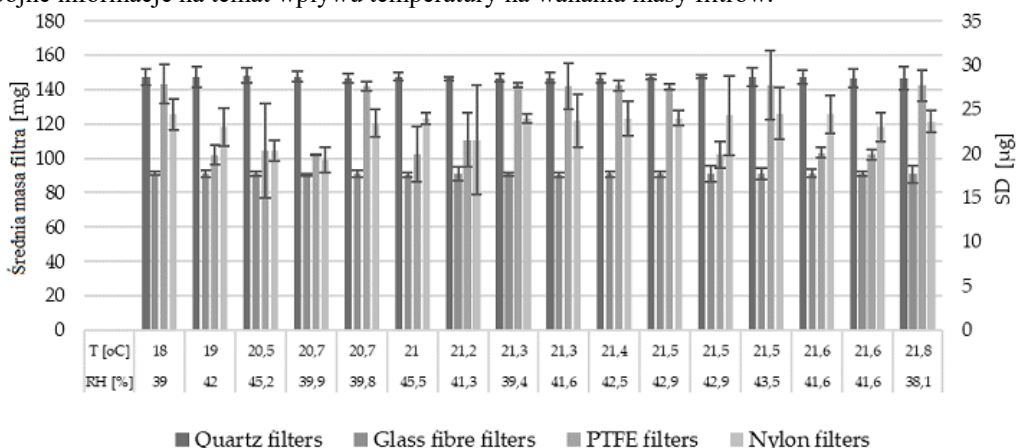
3. Wyniki i Dyskusja

Praca składała się z dwóch etapów – w pierwszym etapie oceniano wpływ warunków kondycjonowania filtrów w zakresach wilgotności i temperatury zbliżonych do warunków

rekomendowanych przez US EPA (1998); natomiast drugi etap badań obejmował pomiary zawartości wody w filtrach w zależności od zmiennych warunków temperatury i wilgotności.

Rys. 1 przedstawia średnią masę filtrów (obliczoną niezależnie dla każdego rodzaju filtra) jako masę uśrednioną z dwóch następujących po sobie ważen. Pierwsze ważenie wykonano po 24 godzinach (kondycjonowanie wstępne) a kolejne po 48 godzinach (kondycjonowanie właściwe) od momentu rozpoczęcia eksperymentu. Warunki kondycjonowania wahały się w zakresach 18°C-22°C oraz 39-45% RH. Różnicę mas filtrów pomiędzy pierwszym i drugim ważeniem obliczono jako odchylenie standardowe (SD) średniej masy filtrów (łącznie 5 filtrów każdego typu) z dwóch kolejnych ważen. Zakresy (min.-maks.) przeciętnych wartości SD [μg] traktowanych jako wariancja mas między ważeniami były następujące: Q(1,13-6,79 μg); G(0,57-5,09 μg); PTFE(0,35-27,58 μg) i N(2,47-32,08 μg); gdzie „zakres” jest różnicą między maksymalną i minimalną wartością SD zarejestrowaną w każdej partii 5 nieobciążonych filtrów. Oznacza to, że największe wahania mas filtrów pomiędzy pierwszym i drugim ważeniem zaobserwowano w przypadku filtrów teflonowych oraz nylonowych. Wynika to raczej z większej podatności tych klas filtrów na działanie ładunków elektrostatycznych w porównaniu do filtrów kwarcowych czy szklanych, niż z ich zdolności do sorbowania wody z powietrza. Większe wahania mas filtrów (wartości SD) stwierdzono w warunkach wilgotności względnej w zakresie (42-45)% w porównaniu do wilgotności w zakresie (39-41)%; przy niższej wilgotności względnej średnie różnice (SD) mas filtrów wynosiły: Q(3,75 μg); G(1,89 μg); PTFE(6,37 μg); N(8,17 μg); podczas gdy w wyższym zakresie wilgotności względnej, jak następuje: Q(3,28 μg); G(2,27 μg); PTFE(10,61 μg); N(12,70 μg). Obserwacje te są zgodne z danymi opublikowanymi przez Brown i in. (2006), który wykazał, że bardziej stabilne masy filtrów uzyskuje się przy wilgotności względnej powietrza wynoszącej 40% w porównaniu do wilgotności na poziomie bliskim 50%. W podobny sposób jak dla wpływu wilgotności testowano wpływ warunków temperatury na zmiany masy filtrów nieobciążonych. Zestaw danych podzielono dla dwie podgrupy - masy filtrów zmierzone w warunkach 18-21°C oraz masy zmierzone w zakresach 21-22°C. Wahania masy filtrów (wartości SD) w zakresach temp. 18-21°C były następujące: Q(3,84 μg); G(1,45 μg); PTFE(10,64 μg); N(7,50 μg); podczas gdy dla zakresu 21-22°C: Q(3,27 μg); G(2,62 μg); PTFE(7,78 μg); N(12,85 μg).

Jak wynika z Rys. 1 wpływ temp na wahania mas filtrów w kontekście pojedynczego filtra oraz konkretnej temperatury (a nie zakresu temperatur) jest dość niejednoznaczny. Testowanie wpływu temperatury na wahania mas filtrów powinno być prowadzone na pojedynczym filtrze poddanym kondycjonowaniu przez dłuższy (niż zaproponowany w tej pracy) okres czasu podzielony na większą liczbę interwałów czasowych, np: 24h, 48h, 72h... (4d; 5d; 6d)... itd., w warunkach stabilnej temperatury; i obejmować pomiar bezwzględnego przyrostu/ubytku masy filtra po każdym interwale (zaczynając od ważenia początkowego). Dłuższe obserwacje mogłyby przynieść bardziej spójne informacje na temat wpływu temperatury na wahania masy filtrów.



Rys. 1. Wahania masy bezwzględnej filtrów nieobciążonych w zmiennych warunkach temperatury [°C] i wilgotności powietrza (18-22°C oraz 39-45% RH).

Drugi etap badań dotyczył określenia zawartości wody, zarówno trwale jak i nietrwale związanej ze strukturą materiału filtracyjnego w zmiennych warunkach temperatury i wilgotności powietrza. Rozważając pełny zakres zmienności warunków RH% (20-90%) i temp. (18 oraz 22°C) okazuje się, że najbardziej podatne na sorbowanie wody z atmosfery są filtry kwarcowe, w następnej kolejności filtry nylonowe, szklane oraz filtry z PTFE.

Zawartości wody w filtrach w ujęciu bezwzględnym dla pełnego spektrum mierzonych warunków temperaturowo-wilgotnościowych wahały się w zakresach (1013,7-3401,6) µg dla filtrów kwarcowych; (111,7-556,2) µg dla szklanych; (20,8-188,2) µg dla PTFE i (509,1-2328,0) µg dla filtrów nylonowych. W przeliczeniu na masę filtra zawartości te wynosiły: (0.75-2.2%, Q); (0.1-0.6%, G); (0.02-0.14%, PTFE); (0.53-1.67%, N) (Rys. 2). Wynika z tego, że zarówno w ujęciu masy bezwzględnej, jak i w przeliczeniu na masę filtra największą hydrofilność wykazują filtry kwarcowe. Wyniki analizy statystycznej (ANNOVA dwuczynnikowa), wykazały, że różnice średnich zawartości wody pomiędzy różnymi typami filtrów ale także w zależności od warunków RH i temp. były istotne statystycznie ($p < 0.05$, Tabela 1). Otrzymane wyniki wskazują, że na poziomie istotności $p = 0.05$ można odrzucić hipotezę zerową o braku wpływu temp [°C]; RH [%] oraz łącznego oddziaływania tych czynników (temp [°C]*RH [%]) na zawartość wody.

Tab. 1. Wyniki jednowymiarowej, dwuczynnikowej analizy wariancji z analizą efektów eksperymentalnych dla określenia wpływu temp. [°C] i wilgotności względnej powietrza [°C] w trakcie kondycjonowania filtrów do pobierania PM na zawartość w nich wody atmosferycznej.

Efekt	Test	Wartość	F	df	Błąd df	p
Wyraz wolny	Wilks	0,000530	24055,03	4	51,0000	0,000000
RH [%]	Wilks	0,000182	65,51	28	185,3053	0,000000
T [°C]	Wilks	0,410022	18,35	4	51,0000	0,000000
RH [%]·T [°C]	Wilks	0,032384	10,52	28	185,3053	0,000000

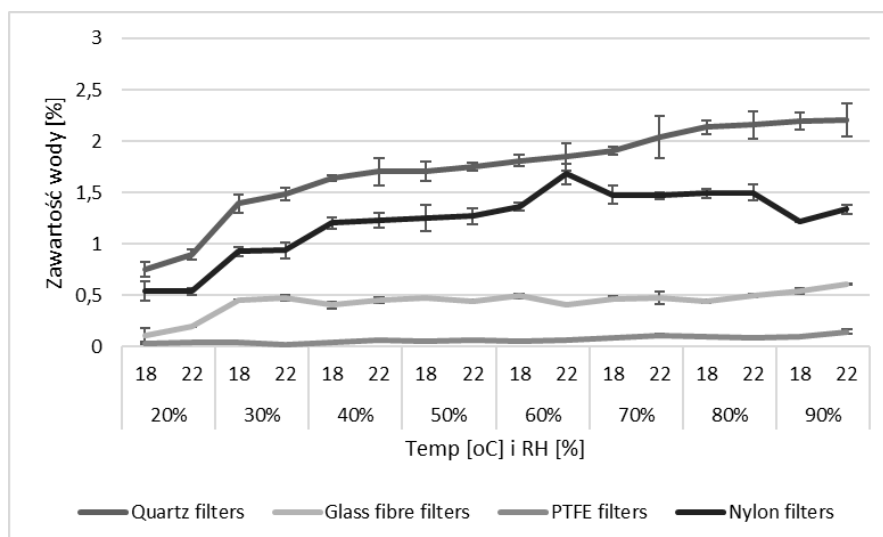
p-poziom prawdopodobieństwa przy p testowym wynoszącym $p < 0,05$, df – (liczba stopni swobody – 1), F – wartość statystyki F. Wyniki istotne statystycznie zaznaczono pogrubioną czcionką

Zarówno temperatura, jak i wilgotność tłumaczą znaczącą statystycznie wariancję zmiennej „zawartość wody”, jednak wilgotność w większym stopniu niż temperatura wpływa na wariancję tej zmiennej (Tab. 1., wartość F).

Z uwagi na swoją hydrofilność filtry kwarcowe oraz nylonowe w większym stopniu zawyżają zatem masy pyłu w porównaniu do filtrów teflonowych lub szklanych, a zatem są mniej odpowiednie do określania masy cząstek drobnych i ultra-drobnych. Wpływ zmiennych warunków wilgotnościowych kondycjonowania filtrów z PTFE (w zakresie określonym normą, $50 \pm 5\%$) na ilość sorbowanej wody jest pomijalny (Rys. 2.), a zawartość wody w tych filtrach (w warunkach wilgotności 50% ok. 0,056-0,067% masy filtra (w ujęciu bezwzględnym 32 – 52,9 µg) jest zbliżona do poziomów w próbach ślepych ($42,21 \pm 44,35$ µg). Porównując odchylenia mas filtrów pomiędzy pierwszym i drugim ważeniem dla całego rozpatrywanego zakresu zmienności RH% i temp Q(1,13-6,79 µg); G(0,57–5,09 µg); PTFE(0,35-27,58 µg) i N(2,47-32,08 µg); i zestawiając te wyniki z wahaniami zawartości wody w filtrach w ujęciu bezwzględnym: Q(360-3763,1 µg); G(111,3-556,2 µg); PTFE (1,3-185,6 µg) oraz N(411,5-2328 µg) można wysunąć dwa wnioski: (1) kondycjonowanie filtrów w warunkach określonych normą wpływa na wahania zawartości tzw. wody sorpcyjnej; której udział w masie filtrów jest stosunkowo niewielki; (2) przekroczenie tzw. punktów równowagi wilgotnościowej (równowaga pomiędzy wilgotnością filtra a wilgotnością powietrza atmosferycznego) powoduje uwalnianie tzw. wody związanej - trwale wbudowanej w strukturę porowatą filtrów.

Podobne rezultaty dla filtrów obciążonych uzyskali Canepari i in. (2013) testując uwalnianie różnych typów wody w profilu temperaturowym (od 50-250°C). Dla czasów ekstrakcji w przedziale 0-500 s i temperatury odparowania do ok. 120°C ilość wody nietrwale związanej ze strukturą próbek PM wahała się w zakresach 50-150 µg, a zatem stanowiła niewielki procent całkowitej masy PM.

Rezultaty otrzymane przez Canepari i in. (2013) wykazały także, że zawartość wody w filtrach teflonowych w warunkach 50% RH była praktycznie na poziomie próby ślepej; natomiast dla filtrów kwarcowych ilość wody wynosiła w tych warunkach ok 1400 μg .



Rys. 2. Udział masowy wody [%] w czystych filtrach (stosowanych powszechnie do pobierania pyłu zawieszonego) w zmiennych warunkach temperatury [°C] i wilgotności powietrza [%].

4. Wnioski

Uzyskane wyniki wskazują, że filtry kwarcowe oraz nylonowe są znacznie bardziej podatne na zmiany zawartości wody przy zmieniających się poziomach wilgotności powietrza RH%, a zatem są mniej odpowiednie do określania masy cząstek drobnych i ultra-drobnych. Średnie różnice masy filtrów nieobciążonych w zakresie temp. 18-21°C były znacznie niższe niż w temp. 21-22°C ($P < 0,05$), gdy wilgotność nie uległa zmianie. Podobną zależność zaobserwowano w przypadku wahań wilgotności powietrza – średnie różnice mas filtrów przy wilgotności 39-41% RH były niższe, niż w warunkach wilgotności 42-45% RH. Otrzymane wyniki potwierdzają obserwacje poczynione przez EPA (Quality Assurance Guidance Document 2.12: Monitoring PM_{2.5} in Ambient Air Using Designated Reference Class 1 Equivalent Methods; US EPA 1998), sugerujące, że warunki kondycjonowania filtrów zapewniające minimalne wahania masy powinny oscylować w granicach: 20-23°C; 30-40% RH $\pm$ 5%. Oznacza to, że warunki kondycjonowania filtrów (zwłaszcza w zakresie wilgotności powietrza) proponowane w normie (EN 12341) i wynoszące 20 $\pm$ 1°C; 50% $\pm$ 5% powinny być obniżone do poziomów rekomendowanych przez US EPA (1998). Zaprezentowane w pracy wyniki jak i przegląd literatury tematu wskazują, że o wyborze typu filtra do kolekcjonowania cząstek pyłu decyduje cała gama czynników; jednak dla celu określenia ilościowego zawartości wody w PM najlepsze własności wykazują filtry teflonowe. Niski próg topliwości tych filtrów powoduje jednak, że w analizach chemicznych zawartości wody metodą Karla Fischera lub metodą termogravimetryczną maksymalna temperatura odparowywania nie może przekraczać 60°C, co jednocześnie znacznie wydłuża czas analiz, np. w porównaniu do filtrów szklanych. Niniejsza praca stanowi ważny wkład w stan wiedzy w dziedzinie oceny przydatności różnych rodzajów materiałów filtracyjnych do określonych analiz chemicznych i kampanii pomiarowych.

Informacja o finansowaniu

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2016/23/D/ST10/02705, „Woda atmosferyczna jako marker pochodzenia pyłu zawieszonego” finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

5. Literatura

- Air Quality-Determination of the PM10 Fraction of Suspended Particulate Matter—Reference Method and Field Test Procedure to Demonstrate Reference Equivalence of Measurement Methods; Standard EN 12341:1998; European Committee for Standardization: Brussels, Belgium, 1998.
- Allen R, Box M, Liu LJ i in. (2001) A Cost-Effective Weighing Chamber for Particulate Matter Filter. *Journal of the Air & Waste Management Association* 51: 1650-1653.
- Ambient Air Quality-Standard Gravimetric Measurement Method for the Determination of the PM2.5 Mass Fraction of Suspended Particulate Matter; Standard EN 14907:2005; European Committee for Standardization: Brussels, Belgium, 2005.
- Canepari S, Farao C, Marconi E I in. (2013) Qualitative and quantitative determination of water in airborne particulate matter. *Atmospheric Chemistry and Physics* 13: 1193-1202.
- Canepari S, Simonetti G, Perrino C (2017). Mass size distribution of particle-bound water. *Atmospheric Environment* 165: 46-56.
- Carlton AG, Teitz A (2002) Design of a Cost-Effective Weighing Facility for PM2.5 Quality Assurance. *Journal of the Air & Waste Management Association* 52: 506-510.
- Dick WD, Saxena P, McMurry P H (2000) Estimation of water uptake by organic compounds in submicron aerosols measured during the Southeastern aerosol and visibility study. *Journal of Geophysical Research* 105: 1471–1479.
- Hänninen OO; Koistinen KJ, Kousa A i in. (2002) Quantitative Analysis of Environmental Factors in Differential Weighing of Blank Teflon Filters; *Journal of the Air & Waste Management Association* 52: 134-139.
- Hu D, Chen J, Ye X (2011) Hygroscopicity and evaporation of ammonium chloride and ammonium nitrate: Relative humidity and size effects on the growth factor, *Atmospheric Environment* 45: 2349–2355.
- Hydranal Manual, <http://alphachrom.hr/novi-web/wp-content/uploads/2018/03/Honeywell-HYDRANAL-Manual-EN-1.pdf>
- Koistinen KJ, Kousa A, Tenhola V i in. (1999) Fine Particle (PM2.5) Measurement Methodology: Quality Assurance Procedures and Pilot Results of the EXPOLIS Study. *Journal of the Air & Waste Management Association* 49: 1212-1220.
- Lawless PA, Rodes CE (1999). Maximizing Data Quality in the Gravimetric Analysis of Personal Exposure Sample Filters. *Journal of the Air & Waste Management Association* 49: 1039-1049.
- Wunderli S, Fortunato G, Reichmuth i in. (2003) Uncertainty Evaluation of Mass Values Determined by Electronic Balances in Analytical Chemistry: A New Method to Correct for Air Buoyancy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376: 384-391.
- Speer RE, Barnes HM, Brown R (1997). An instrument for measuring the liquid content of aerosols. *Aerosol Science and Technology* 27: 50–61.
- Speer RE, Edney EO, Kleindienst TE (2003). Impact of organic compounds on the concentration of liquid water in ambient PM2.5. *Journal of Aerosol Science* 34: 63–77.
- US EPA (1997). Reference Method for the Determination of Fine Particulate Matter as PM2.5 in the Atmosphere. CFR, Appendix L, Part 50, Title 40.
- US EPA (1998). Quality Assurance Guidance Document 2.12: Monitoring PM2.5 in Ambient Air Using Designated Reference or Class 1 Equivalent Methods; U.S. Environmental Protection Agency; Human Exposure and Atmospheric Sciences Division: Research Triangle Park, NC.

19. Wpływ zmian klimatu na zdrowie współczesnego człowieka

The impact of climate change on the health of modern man

Marta Wiejak^(1,2), Agnieszka Prusek^(1,2), Jolanta Pudelko^(2,3), Grażyna Janikowska⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

⁽²⁾ Młoda Farmacja Sosnowiec,

⁽³⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biochemii, Wydział Nauk Farmaceutycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

⁽⁴⁾ Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Marta Wiejak: mwiejak3@gmail.com

Słowa kluczowe: zanieczyszczenia powietrza, anomalie pogodowe, promieniowanie

Streszczenie

Praca jest przeglądem literatury na temat zmian klimatycznych i ich wpływu na stan zdrowia ludzi na świecie. Zmiany te związane są nie tylko z nagłymi sezonowymi anomaliami temperatur, ale również ze wzrostem poziomu zanieczyszczeń środowiskowych, a także powiązaniem z tym nadmiernym promieniowaniem UV dochodzącym do ziemi ze słońca. Wszystkie te czynniki wpływają w znaczący sposób na procesy fizjologiczne zachodzące w organizmach ludzkich doprowadzając do trwałych zmian skutkujących inicjowaniem procesów patologicznych.

Badania współzależności pomiędzy różnymi czynnikami atmosferycznymi a zdrowiem człowieka potwierdzają ich występowanie. Zaobserwowano na przykład, że w miesiącach letnich przy dużych temperaturach zewnętrznych następuje wzrost umieralności ludzi skorelowany ze zmieniającą się temperaturą. Przeważająca ilość tych badań zwraca uwagę na duży wzrost liczby zgonów i zachorowania podczas nagłych zmian pogodowych, zwłaszcza fal gorąca z wysokim natężeniem promieniowania słonecznego i towarzyszącej im dużej wilgotności powietrza. Zaobserwowano także, iż w miesiącach zimowych nasila się ryzyko zgonów spowodowanych trudnymi warunkami klimatycznymi i niską temperaturą (wraz z jej obniżaniem się wzrasta również ilość zgonów). W szerokościach geograficznych umiarkowanych i wysokich, zgony i zachorowania związane są przede wszystkim z niskimi temperaturami powietrza, z falami mrozów, podczas których u ludzi z problemami układu krążenia obserwowane są różne komplikacje zdrowotne.

1. Wstęp

Współcześnie człowiek żyje w czasach szybkiego rozwoju medycyny oraz postępu cywilizacyjnego, które dają szansę na spokojne i długie życie. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego opublikowanych w 2019 roku przeciętny Polak żyje 73,8 lat natomiast przeciętna Polka 81,7. Życie w Polsce przedłużyło się od roku 1990 wg tych samych danych średnio o 7,6 oraz 6,5 lat. Istnieją jednak zjawiska z którymi współczesny mieszkaniec Polski oraz każdego innego kraju na świecie musi się zmierzyć, a mianowicie ze zmianami klimatycznymi. Już od początku pojawienia się atmosfery dochodziło w niej do zmian. Jednak od momentu pojawienia się w niej człowieka te ewolucje pogłębiały się. Wraz z rozwojem rolnictwa człowiek działał na środowisko np. poprzez zmiany w szacie roślinnej. Do dużo poważniejszych konsekwencji globalnych zaczęło dochodzić głównie w drugiej połowie XX wieku (Haman 2008). Zmiany zachodzące w klimacie to naturalne zjawisko jednak niepokojący jest fakt, że współczesne zmiany klimatu zachodzą w zaskakująco szybkim tempie. W raporcie sporządzonym w 2013 roku przez IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change – Międzynarodowy Zespół ds. Zmian Klimatu) możemy przeczytać, że "Ocieplenie systemu klimatycznego jest bezdyskusyjne. Wiele zmian, obserwowanych w systemie od lat pięćdziesiątych XX wieku nie ma precedensu w skali wielu dziesięcioleci, a nawet tysiącleci. Atmosfera i ocean ogrzały się, zmalały masy śniegu i lodu, poziom oceanów podniósł się, a stężenie gazów cieplarnianych w atmosferze wzrosło."

2. Opis zagadnienia

Konsekwencjami zmian klimatu są zjawiska atmosferyczne, takie jak: wzrost temperatury, zmiany amplitudy opadów, zjawiska ekstremalne oraz wzrost poziomu mórz. Zmiany takie oddziałują na wiele dziedzin i sfer, które umożliwiają nam dostatnie życie, czyli rolnictwo, przemysł, wodę czy żywność. Oddziaływania te bezpośrednio odbijają się na zdrowiu całej populacji. Pod wpływem produkowanych zanieczyszczeń dochodzi do zmian w układzie krążenia i oddechowym, a także w wyniku różnic społecznych do niedożywienia lub chorób infekcyjnych (Błażejczyk i in. 2015). Z pojęciem "zmian klimatu" związane są także ekstremalne zjawiska pogodowe, które współcześnie dotyczą ludzkości coraz częściej i niewątpliwie oddziałują także na ich zdrowie.

Celem pracy jest przedstawienie przykładów destrukcyjnego wpływu czynników oddziaływania zmian klimatu na zdrowie człowieka. W pracy wykorzystano najnowsze publikacje opisujące temat. Przegląd publikacji został wykonany w oparciu o dostępne elektroniczne bazy medyczne. Wybrane przykłady występujących chorób klimatozależnych przyporządkowane zostały do zmian klimatu, które je nasilają.

3. Przegląd literatury

3.1 Zanieczyszczenia powietrza

Stan otaczającego nas powietrza zarówno tego atmosferycznego jak i tego w pomieszczeniach pogarsza się wraz z rozwojem cywilizacyjnym na ziemi (Gładysz J i in. 2010). Zanieczyszczone powietrze to jeden z elementów wpływających nie tylko na zdrowie, ale również na długość życia człowieka. Zanieczyszczone powietrze, czyli jakość powietrza w jakim przebywamy na co dzień to taki stan, w którym w atmosferze pojawiają się substancje ciekłe, gazowe i stałe w takim stężeniu że wywierają szkodliwy wpływ na człowieka, otaczającą go faunę i florę oraz środowisko, w którym żyją (Treder 2017).

W Polsce w 2010 zmarło 48 544 osób z powodu chorób związanych z zanieczyszczeniem powietrza tj. układu oddechowego, sercowo-naczyniowego oraz nowotworami (przede wszystkim płuc i pęcherza moczowego) (Czajkowski i Grabowski 2019). Wśród głównych zanieczyszczeń atmosferycznych możemy wyróżnić: pyły, ozon, siarczany, dwutlenek siarki, tlenki azotu i tlenek węgla (Gładysz i in. 2010). Warto zwrócić uwagę na fakt, że jednym z ogniw dokonujących tej emisji są indywidualne systemy grzewcze, co jest szczególnie niebezpieczne, ponieważ z takich domowych palenisk wydobywa się dym a ponieważ często nie ma zainstalowanych tam instalacji chroniących atmosferę to powoduje, że wszystkie zanieczyszczenia są wpuszczane do otoczenia (Cholewiński i in. 2016).

Powietrze w zamkniętych pomieszczeniach może ulegać zanieczyszczeniu przez toksyczne substancje lub mikroorganizmy, takie jak: zanieczyszczenia wydobywające się z klimatyzacji, dym tytoniowy, detergenty, odświeżacze powietrza, azbest, ołów, formaldehyd lub pleśń. To wszystko zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju raka płuc oraz chorób układu sercowo - naczyniowego. Fakt że coraz więcej czasu spędzamy w zamkniętych pomieszczeniach gdzie występują zanieczyszczenia spowodowane czynnikami chemicznymi i biologicznymi zwiększa się częstość występowania infekcji górnych dróg oddechowych, wysypek skórnych oraz zwiększa się ilość zakażeń z powodu spadku odporności. W sezonie jesienno-zimowym pojawia się kolejne zagrożenie ponieważ ze względu na przesuszenie powietrza w pomieszczeniach mogą pojawić się dolegliwości związane z pękaniem śluzówek szczególnie wśród dzieci, a to sprzyja występowaniu przewlekłych infekcji (Gładysz i in. 2010).

Zjawiskiem, które powstaje w wyniku przekroczenia norm zanieczyszczeń w powietrzu jest smog. Powstaje w takich warunkach które sprzyjają kumulacji zanieczyszczeń oraz powstawania pyłu wtórnego. Dzieci i osoby starsze to grupy, które są najbardziej narażone na działanie smogu (Czajkowski i in. 2019). Zmiany ilości pyłów będących składnikiem zanieczyszczeń wpływają na nasilenie lub obniżenie objawów alergicznych (Ścibor i in. 2012). Epizody smogowe powodują nasilenie się objawów u pacjentów z chorobami kardiologicznymi. Z badań przeprowadzonych na terenie województwa śląskiego (które należy do jednych z najbardziej zanieczyszczonych województw w Polsce) przez Śląskie Centrum Chorób Serca wynika, że w krótkim czasie po

zwiększeniu się zanieczyszczeń w powietrzu do tego stopnia, że przekroczone zostają normy, częstość występowania udaru mózgu zwiększa się o około 9% (Treder 2017). Narząd wzroku również jest narażony na niekorzystne działanie smogu. Częsteczki występujące w smogu zawierają substancje, które mogą powodować zespół suchego oka czy zapalenie spojówek. Szkodliwe pyły mogą także zaburzyć produkcję łez oraz wysuszenie aparatu ochronnego oka (Czajkowski i Grabowski 2019).

3.2 Anomalie cieplne

Globalny wzrost temperatury powietrza jest jednym ze skutków globalnego ocieplenia klimatu. Jest to spowodowane czynnikami naturalnymi jak np. wzrostową tendencją aktywności słońca szczególnie w ostatnich dwóch wiekach oraz przez czynniki antropogeniczne (Michalska 2011). Anomalie cieplne mają tendencje do częstszego występowania, dlatego coraz większa liczba ludności jest na nie narażona. Grupą szczególnie odczuwającą te zmiany są osoby starsze, dla których fale upałów stanowią niebezpieczeństwo. Jako falę upałów możemy określić okres, w którym wzrost temperatury przez 2-3 kolejne dni utrzymuje się na poziomie powyżej 30°C, a w nocy temperatura powietrza przyjmuje wartości powyżej 20°C (Krzeszowiak i Pawlas 2015). We współczesnym społeczeństwie Europy wzrasta liczba osób powyżej 65 roku życia – to oznacza, że społeczeństwo starzeje się. Oba problemy (starzejące się społeczeństwo oraz ocieplenie klimatu) oddziałują na siebie wzajemnie (Graczyk i in. 2017). Wśród chorób wieku starczego możemy wyróżnić choroby układu krążenia takie jak: nadciśnienie, niewydolność krążeniową, miażdżycę czy zaburzenia rytmu serca. Przyjmowane na te dolegliwości leki np. leki moczopędne, obniżające ciśnienie tętnicze mogą powodować odwodnienie, na które osoby starsze i tak są narażone z powodu zaburzonego odczuwania pragnienia, co jest szczególnie niebezpieczne w okresach upału.

Reakcją obronną organizmu w przypadku narażenia na wysokie temperatury jest zwiększenie średnicy naczyń krwionośnych, dlatego przepływ krwi przez naczynia zlokalizowane w skórze jest większy, umożliwia to ochładzanie organizmu, ponieważ ciepło zostaje "oddane" w wyniku takich procesów jak parowanie, przewodzenie czy konwekcja. Z powodu parowania z powierzchni ciała kropli potu mimo pozytywnego skutku jakim jest regulacja termiczna wiąże się także skutek negatywny jakim jest utrata elektrolitów, które są konieczne do utrzymania homeostazy całego organizmu.

Stan rozszerzonych naczyń krwionośnych oddziałuje na ciśnienie tętnicze zmniejszając je, jednak oddziaływanie na serce jest obciążające, gdyż skurcze są częstsze. Praca serca w takich warunkach nie jest tak efektywna jak w normalnych warunkach. Ponadto, u osób, u których w tętnicach znajdują się złogi miażdżycowe zwiększa się ryzyko niedotlenienia serca, a jeśli miażdżycy znajduje się w tętnicach które zaopatrują ośrodkowy układ nerwowy może dojść do udaru niedokrwiennego mózgu. Innym przykładem dolegliwości będącym skutkiem niedostatecznej ilości elektrolitów w organizmie są kurcze ciepłe, które mogą pojawiać się u osób zdrowych, które wykonują znaczną pracę fizyczną – robotnicy czy sportowcy. Wysokie temperatury powietrza mogą bezpośrednio oddziaływać na organizm człowieka powodując u niego udar cieplny – czyli przegrzanie ciała, pojawienie się temperatury wewnątrz organizmu powyżej 40 °C. Skutkami udaru cieplnego mogą być apatia, omamy słuchowe i wzrokowe, wzrost ciśnienia śródczaszkowego, ale również śmierć (Krzeszowiak i Pawlas 2015). Upały powodują także zmniejszenie efektywności pracy układu oddechowego, ponieważ zmniejsza się ilość hemoglobiny, która jest odpowiedzialna za transport tlenu. Tendencji wzrostowej ulega także częstości oddechów. To oznacza, że u osób cierpiących na choroby układu oddechowego pogłębiają się dolegliwości chorobowe. (Błażejczyk i in. 2014; Klonowicz i Kozłowski 1970; Jankowiak 1976).

Pojawiające się okresowo fale ciepła powodują wzrost śmiertelności czego przykładem mogą być statystyki z 2003 roku, gdzie we Francji podczas ekstremalnych upałów zmarło 14800 osób (Krzeszowiak i Pawlas 2015).

Narażenie na ekstremalne ciepło podczas ciąży powoduje także zwiększenie ryzyka przedwczesnego porodu (Wang i in. 2020).

Kolejnym zagrożeniem, które jest skutkiem wzrostu temperatury to zdolność dostosowania drobnoustrojów chorobotwórczych do tych wzrostów. Dlatego istnieje obawa, że tak dostosowane

drobnoustroje o wyższej tolerancji na ciepło, mogą pokonać naszą obronę endotermiczną i przynieść nową chorobę zakaźną. Może to powodować nowe zagrożenia mikrobiologiczne w zmieniającym się klimacie (Casadevall 2020). Warunki atmosferyczne stanowią jeden z czynników warunkujący namnażanie się i rozwój drobnoustrojów, dlatego można zauważyć, że najczęściej do zakażeń bakteryjnych dochodzi w ciepłych miesiącach. Przyczyną tego jest pojawianie się zatruc pokarmowych na podłożu bakteryjnym w tych miesiącach. Przykładem bakterii, której rozwijanie się jest związane z warunkami termicznymi jest *Salmonella thyphimurium* powodująca największy odsetek ciężkich zachorowań w miesiącach od maja do września (Błażejczyk i in. 2015).

3.3 Nasilone promieniowanie

Naturalnym i głównym źródłem promieniowania ultrafioletowego docierającego do ziemi jest słońce. Umownie wyróżniamy trzy pasma tego promieniowania: UVA, UVB, UVC. Część promieniowania, które przedostaje się warstwy atmosfery ulega rozproszeniu a pozostałe, które przedostaje się na ziemię jest różnej intensywności. W zależności od tej intensywności możemy wyodrębnić działanie pozytywne oraz negatywne. Wśród zagrożeń powodowanych zwiększoną intensywnością promieniowania możemy wyróżnić schorzenia takie jak: katarakta, nowotwory skóry, oparzenia słoneczne, fotouczulenia (Zarębska 2000). O tym jak niebezpieczne jest intensywne promieniowanie słoneczne można zauważyć w warunkach wysokogórskich, gdzie atmosfera jest rozrzedzona i dlatego promieniowanie UV dociera ze zwiększoną intensywnością – na każde 300m ta intensywność wzrasta o około 4%. W takich warunkach nawet krótka ekspozycja na promieniowanie słoneczne może powodować oparzenia słoneczne pierwszego oraz drugiego stopnia (Korzeniewski 2008).

Jednym z czynników powodującym, że do Ziemi dociera promieniowanie o większej intensywności jest ubytek w warstwie ozonowej. W prawidłowych warunkach cząsteczki ozonu i tlenu znajdujące się w atmosferze pochłaniają przechodzące przez nią promieniowanie w taki sposób, że UVC pochłaniane jest w całości, UVB w większej części tzn. 90% a UVA w niewielkim stopniu – 4-5%. Z tego wynika, że do Ziemi dociera głównie promieniowanie UVA oraz w niewielkim stopniu UVB. Australia i Antarktyka to przykłady obszarów z dziurą ozonową, co sprawia, że zanotowano tam większy niż na innych obszarach procent docierającego promieniowania UVB (Kolek 2006). Mniejsza warstwa ozonu w stratosferze jest powiązana z wzrastającą liczbą zachorowań na czerniaka (Błażejczyk i in. 2015). Promieniowanie typu UVB nie wnika w głębokie warstwy skóry, ale zatrzymuje się w warstwie podstawnej naskórka. Pierwszym objawem pojawiającym się po ekspozycji na tego typu promieniowanie jest rumień fotochemiczny który jest skutkiem rozszerzających się naczyń krwionośnych występujących w skórze. Jego nasilenie jest zależne od takich czynników jak czas działania promieniowania na skórę, intensywność promieniowania, ale także czynników bardziej osobniczych jak np. grubość naskórka czy jego wrażliwość. Skutkiem długotrwałego oraz intensywnego nasłonecznienia skóry jest fotostarzenie - czyli zmiana w wyglądzie, strukturze oraz funkcjach skóry. Innym poważnym skutkiem długotrwałego nasłonecznienia jest występowanie nowotworów. Zmiany nowotworowe powstają na skutek destrukcyjnego działania promieniowania UVA i UVB na nici DNA oraz nieprawidłowościach w jej naprawie (Kolek 2006). Mechanizm nowotworzenia tych dwóch typów promieniowań jest odmienny. UVB działa w sposób destrukcyjny na wiązania między pirymidynami co powoduje, że powstają dimery cyklobutanu, mające działanie mutagenne i zaburzające proces elongacji. Promieniowanie UVA ułatwia tworzenie reaktywnych form tlenu a te z kolei uruchamiają kaskadę reakcji w wyniku czego powstają utlenione substraty które wykazują działanie karcenogenne na naskórek (Ebisz i Brokowska 2015). Uszkodzenia, które powstają przez działające promieniowanie UV zostało uznane przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem za główny czynnik wywołujący raka skóry u współczesnego człowieka. Wśród najczęstszych nowotworów skóry występujących jako efekt nadmiernego działania promieniowania UV wyróżnia się raka podstawnokomórkowego (występującego najczęściej), raka kolczystokomórkowego oraz czerniaka skóry, który jest najgroźniejszy (Ebisz i Brokowska 2015). Liczba zachorowań oraz zgonów z nim powiązanych w przeciągu ostatnich 50 lat ma tendencję wzrostową. Promieniowanie UV zostało uznane za czynnik szkodliwy w miejscu pracy szczególnie dla zawodów wykonywanych na wolnym

powietrzu – zaliczamy tu leśników, ratowników wodnych, rolników, pracowników budowlanych (Pacholczyk i in. 2016). Innym narządem wrażliwym na działanie promieniowania słonecznego jest narząd wzroku, gdzie głównie uszkodzeniu ulegają siatkówka, rogówka, spojówka oraz soczewka, której narażenie na długotrwałe i intensywne promieniowanie UV może powodować zaćmę (Kolek 2006). Dlatego, aby uniknąć poważnych konsekwencji spowodowanych silnym działaniem promieniowania UV należy nosić okulary słoneczne z odpowiednim filtrem ponieważ każde inne stanowią większe zagrożenie dla zdrowia naszych oczu niż w sytuacji gdybyśmy nie stosowali żadnej ochrony (Krakowiak i in. 2013).

3.4 Ekstremalne zjawiska pogodowe

Nieuniknionym skutkiem zmieniającego się klimatu są ekstremalne zjawiska pogodowe, które coraz częściej stanowią zagrożenie dla całej populacji (Pałczyński i in. 2018). Do takich zjawisk zaliczamy powodzie spowodowane intensywnymi opadami atmosferycznymi, silne wiatry, mgły, burze itp. Wszystkie wymienione powyżej zjawiska mogą stanowić bezpośrednie niebezpieczeństwo dla zdrowia lub życia człowieka (Tab. 1).

Warto zwrócić uwagę na fakt, że pojawiania się zjawisk pogodowych które wcześniej nie występowały na danej szerokości geograficznej np. na terenie Polski pojawiają się trąby powietrzne. Poza bezpośrednim niebezpieczeństwem ekstremalne zjawiska pogodowe mogą wywoływać pośrednie zagrożenia zdrowia i życia. Ekstremalne zjawiska pogodowe często wpływają na osoby z chorobami alergicznymi lub astmą. Stan tych ostatnich może ulec pogorszeniu z powodu pożarów, które stanowią większe zagrożenie dla zdrowia i życia. Ekstremalne zjawiska pogodowe często wpływają na osoby z chorobami alergicznymi lub astmą. Stan tych ostatnich może ulec pogorszeniu z powodu pożarów, które stanowią większe zagrożenie dla zdrowia i życia. Ekstremalne zjawiska pogodowe często wpływają na osoby z chorobami alergicznymi lub astmą. Stan tych ostatnich może ulec pogorszeniu z powodu pożarów, które stanowią większe zagrożenie dla zdrowia i życia.

Tab. 1. Wpływ ekstremalnych zjawisk pogodowych na występowanie określonych niebezpieczeństw (Błażejczyk i in. 2015).

Zjawisko pogodowe	Niebezpieczeństwo
Intensywne opady	Powódzie
Silne wiatry	Urazy
Mgły	Wypadki drogowe
Burze	Porażenia piorunem
Susze atmosferyczne	Pożary

W Polsce niestety częstym zjawiskiem są zanieczyszczenia lasów odpadami komunalnymi dlatego w trakcie pożaru takiego lasu do atmosfery uwalniane są nie tylko związki powstałe przez spalanie biomasy, ale wiele niebezpiecznych związków powstałych ze spalania tworzyw sztucznych które stanowią główną część zanieczyszczeń lasów. Możemy tutaj wyróżnić tlenki węgla i azotu oraz różne substancje o działaniu drażniącym i rakotwórczym na przykład wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne.

Tak powstałe dymy działają drażniaco na śluzówki co przejawia się bólem gardła, kaszlem, zapaleniem spojówek. Podrażniona błona śluzowa wykazuje zwiększoną reaktywność a to z kolei zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia ataków astmy. Nadmierna reaktywność śluzówki pojawia się także podczas burz. Podmuchy wiatru o dużej intensywności powodują, że pyły i gazy gromadzą się w nadmiarze. Wśród astmatyków zwiększa się ilość zaostrzeń ataków w czasie intensywnych burz z częstymi uderzeniami piorunów – takie zjawisko nazywamy astmą burzową. Zjawisko to jest związane z osmotyczną lizą pyłków i zarodników grzybów w atmosferze, a to prowadzi do uwalniania w powietrzu alergenów. W powietrzu znajdują się w dużej ilości materiały alergizujące (pyłki) i mieszają się tam w, po czym ulegają pęcznieniu, pękaniu i uwalniają mniejsze fragmenty obciążone alergenami (Pałczyński i in. 2018).

Opady atmosferyczne w zwiększonej ilości powodują powstawanie powodzi, które w sposób bezpośredni zagrażają życiu i zdrowiu człowieka. Można je również zaliczyć do czynników wywołujących pośrednie niebezpieczeństwo dla człowieka – powodujących skłonność do chorób w zimniejszej części roku oraz czynników zwiększających występowanie chorób wektorowych,

ponieważ komary i kleszcze w swoim rozwoju potrzebują warunków wodnych (Błażejczyk i in. 2015).

4. Wnioski

Oddziaływanie jakie wywołuje na ludzi otaczające środowisko wpływa na ich samopoczucie i zdrowie. Niekorzystne zmiany klimatu wpływają na zdrowie ludzkie w sposób destrukcyjny. Grupą która w największej mierze cierpi z powodu tych zmian są osoby starsze, które ze względu na posiadane choroby współtowarzyszące źle znoszą wysokie temperatury, a ze względu na mniej intensywny metabolizm - zanieczyszczenia powietrza. Osoby posiadające choroby przewlekłe w czasie, kiedy zjawiska pogodowe ulegają zmianie również zauważają zaostrzenie objawów swojej choroby – jak np. astmatycy. Zmiany klimatu stanowią nowy problem globalny z którym mierzy się współczesna medycyna, ponieważ mimo że seniorzy i osoby przewlekłe chore odczuwają najmocniej działanie tych zmian to dotyczą one każdego bez względu na wiek. Częstsze występowanie nowotworów skóry spowodowanych intensywnym promieniowaniem UV stanowi problem dla wszystkich. Zanieczyszczenia, w których obecnie przebywają dzieci może powodować wśród nich zmniejszoną odporność i pojawienie się chorób we wcześniejszym wieku lub występowanie nowych jednostek chorobowych. Wpływ zmian klimatu na zdrowie człowieka stanowi ważny temat jakiemu powinni przyglądać się współcześni lekarze i naukowcy, aby zminimalizować jej niebezpieczne działanie na zdrowie i życie człowieka.

5. Literatura

- Błażejczyk K, Baranowski J, Błażejczyk A; (2015) Wpływ klimatu na stan zdrowia w Polsce: stan aktualny oraz prognoza do 2100 roku. 10; 37-44;53-58;93-98;123-126;131-134;
- Casadevall A (2020) Climate change brings the specter of new infectious diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 130(2): 553–555.
- Cholewiński M, Kamiński M, Pospolita W (2016) Zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka wynikające ze stosowania wybranych paliw w indywidualnych instalacjach grzewczych. *Kosmos, Problemy nauk biologicznych* 65, 4 (313): 477–486
- Czajkowski J, Grabowski R (2019) Ochrona przed niekorzystnym działaniem smogu na oczy. *Ophthalmotherapy* 6, 1 (21): 5-8.
- Ebisz M, Brokowska M (2015) Szkodliwe oddziaływanie promieniowania ultrafioletowego na skórę człowieka. *Hygeia Public Health* 50(3): 467-473.
- Gładysz J, Grzesiak A, Nieradko-Iwanicka B, i in. (2010) Wpływ zanieczyszczenia powietrza na stan zdrowia i spodziewaną długość życia ludzi. *Problemy Higieny i Epidemiologii* 91(2): 178-180;
- Główny Urząd Statystyczny, Departament Badań Demograficznych. *Statistics Poland, Demographic Surveys Department pod kierunkiem Dorota Szałtysi* (2019) Trwanie życia w 2018 r.: 8-9.
- Haman K (2008) Naturalne i antropogeniczne przyczyny zmian klimatu *Nauka* 1: 119-127.
- Kolek Z (2006) Oddziaływanie promieniowania optycznego na człowieka: korzystny wpływ i zagrożenia. *Prace Instytutu Elektrotechniki* 228: 269-281.
- Korzeniewski K (2008) Problemy zdrowotne w warunkach wysokogórskich. *Polski Merkurusz Lekarski* XXV, 146: 161-165.
- Krakowiak J, Rzeźnicki A, Świerczyńska E, i in. (2013) Profilaktyka chorób narządu wzroku wśród mieszkańców Warszawy. *Przedsiębiorczość i Zarządzanie* XIV, 10, III: 9–21;
- Pacholczyk M, Czernicki J, Ferenc T (2016) Wpływ słonecznego promieniowania ultrafioletowego (UV) na powstawanie raków skóry. *Medycyna Pracy* 67(2): 255–266.
- Pałczyński C i in. (2018) Stanowisko Polskiego Towarzystwa Alergologicznego w sprawie zmian klimatu, klęsk żywiołowych oraz alergii i astmy. *Postępy dermatologii i alergologii* 35 (6): 552–562.
- Ścibor M, Balcerzak B, Malinowska-Cieślik M (2012) Czy środowisko może mieć wpływ na jakość życia pacjentów z astmą oskrzelową? *Zdrowie Publiczne i Zarządzanie* 10 (1): 25–30.

- Stocker TF Qin D, Plattner G-K i in. (2013) Zmiana Klimatu 2013. Fizyczne podstawy naukowe. IPCC. www.ipcc-wg1.unibe.ch <https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/03/ar5-wg1-spm-3polish.pdf>
- Treder M (2017) Smog zagrożeniem bezpieczeństwa zdrowotnego w Polsce. Rocznik Bezpieczeństwa Międzynarodowego 11 (1):190-204.
- Zarębska Z (2000) Promieniowanie słoneczne- dobroczynne działanie i zagrożenia. Kosmos Problemy nauk biologicznych 49, 1-2 (246-247): 27-39.

20. Wpływ zanieczyszczeń powietrza na zdrowie człowieka – wybrane węglowodory

Effect of air pollutants on human health – selected hydrocarbons

Marta Wiejak^(1,2), Agnieszka Prusek^(1,2), Marcin Janikowski⁽¹⁾, Jolanta Pudelko^(2,3), Paulina Gębala^(2,4), Wioletta Parys⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Biologii Molekularnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

⁽²⁾ Młoda Farmacja Sosnowiec,

⁽³⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Biochemii, Wydział Nauk Farmaceutycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

⁽⁴⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach,

⁽⁵⁾ Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Marta Wiejak: mwiejak3@gmail.com

Słowa kluczowe: metan, benzen, benzo(a)piren, kancerogenność

Streszczenie

Zanieczyszczenie powietrza toksycznymi węglowodorami pochodzi głównie z emisji spalin pojazdów silnikowych, dymów przemysłowych, tytoniowych i wszelkiej działalności antropogenicznej. Głównymi węglowodorami będącymi składnikami smogu są metan, benzen i benzo(a)piren. Wszystkie trzy są toksyczne dla ludzi i wpływają nie tylko na zdrowie, ale również na długość życia człowieka. Toksyczność każdego z nich zależy od stężenia i długości czasu ekspozycji. Najmniej w zanieczyszczonym powietrzu znajduje się metan, a najwięcej benzenu i benzo(a)pirenu. Objawy toksyczne wszystkich wymienionych są związane z dysfunkcją układu oddechowego (duszność), krążenia (niedotlenienie i przyspieszona akcja serca) i nerwowego (ból głowy, nudności, wymioty). Przewlekłe narażenie na benzen i benzo(a)piren związane jest z wywoływaniem procesu nowotworzenia. Benzen jest bezpośrednim kancerogenem, w przeciwieństwie do benzo(a)pirenu, który jest prokancerogenem. W przypadku obydwu, metabolity lub ich mieszaniny są silnie kancerogenne. Benzen wywołuje białaczkę, natomiast benzo(a)piren nowotwory skóry, płuc, pęcherza moczowego i inne. Zanieczyszczenia powietrza przyczyniają się lub są bezpośrednim winowajcą zgonów z powodu chorób układu oddechowego, sercowo-naczyniowego oraz nowotworowych, a także wpływają negatywnie nie tylko na zdrowie, ale również na długość życia człowieka.

1. Wprowadzenie

Postęp cywilizacyjny i gospodarczy od połowy XIX wieku związany z intensywną działalnością człowieka wpłynął na wzrost emisji gazów cieplarnianych, takich jak dwutlenek węgla, metan i podtlenek azotu w atmosferze ziemskiej. Zanieczyszczenie powietrza jest niepożądaną zmianą fizycznych i/lub chemicznych jego właściwości, która może mieć szkodliwy wpływ na życie lub stanowić potencjalne zagrożenie dla zdrowia każdego żywego organizmu a w szczególności dla człowieka. Zanieczyszczenia te wynikają głównie z emisji gazowych przemysłowych elektrowni ciepłych, samochodów, domowych palenisk, dymu z pożarów, i z wielu różnych innych źródeł. Oprócz wymienionych głównych zanieczyszczeń, w powietrzu znajdują się substancje chemiczne takie jak związki węgla, siarki, tlenu, azotu, fluorki, metale, produkty fotochemiczne oraz cząstki stałe nieorganiczne i organiczne oraz biologiczne, które mogą mieć szkodliwe skutki dla ekosystemu i zdrowia człowieka. Związki węgla są uwalniane przez całkowite spalanie paliw kopalnych, oraz spalin samochodowych. Związki siarki są głównie uwalniane przez elektrownie oparte na paliwach kopalnych, elektrociepłownie i rafinerie. Tlenki azotu są uwalniane przez samochody, elektrownie

i przemysł. Z powodu takiej działalności człowieka może wzrosnąć w astrosferze poziom ozonu. Fluorki pochodzą głównie z odpadów przemysłowych i sprayów owadobójczych. A metale takie jak: ołów, arsen, nikiel, beryl, cyna, wanad, tytan, kadm itp. są wytwarzane głównie w procesach metalurgicznych, samochodach, aerozolu morskim itp. i tworzą pyły zawieszone lub kropelki cieczy lub gazów. Węglowodory takie jak metan, benzen i benzopiren itp., są uwalniane również przez samochody i przemysł. Produkty fotochemiczne tych zanieczyszczeń tworzą smog (mgły, dymy i węglowodory) lub smog fotochemiczny (azotan nadtlenu acetylu, aldehydy i ozon). Większość składników smogu pochodzi ze spalin samochodowych. Ponadto, w powietrzu są zawieszone cząstki stałe: popioły lotne, pył, grys i inne cząstki uwalniane z elektrowni i zakładów przemysłowych (kruszarń kamienia) itp., oraz biologiczne cząstki stałe: komórki bakteryjne, wirusy, zarodniki grzybów, pyłki. Atmosfera jest osłoną izolacyjną wokół Ziemi, nie tylko przed szkodliwym dla ekosystemu promieniowaniem UV, ale także zawierając niezbędne do życia gazy w ścisłych ramach objętościowych, utrzymuje w określonym zakresie różnicę temperatur w ciągu dnia i nocy oraz stanowi medium dla komunikacji przestrzennej na duże odległości. Bez dobrej atmosfery nie może być odpowiedniego światła i niezbędnych żywiołów: wiatru, chmur, deszczy, śniegu, ognia i wody. Zanieczyszczenia te wywołują degradację gleby, spadek wydajności gruntów rolnych, pustynnienie, utratę różnorodności biologicznej, degradację ekosystemów, zmniejszenie zasobów słodkiej wody, zakwaszenie oceanów oraz zakłócenie i zubożenie ozonu stratosferycznego. Wszystkie te elementy wpływają nie tylko na zdrowie, ale również na długość życia człowieka. W Polsce tylko w 2010 zmarło 48 544 osób z powodu chorób związanych z zanieczyszczeniami powietrza (Czajkowski i Grabowski 2019). Udowodniono, że zanieczyszczenia powietrza przyczyniają się lub są bezpośrednim winowajcą zgonów z powodu chorób układu oddechowego, sercowo-naczyniowego oraz nowotworowych (przede wszystkim płuc i pęcherza moczowego) (IARC, 2012). Każde wymienione zanieczyszczenia naszej atmosfery, ziemi i wody zasługują na opisanie, jednakże celem naszej pracy jest przegląd literatury dotyczący wpływu zanieczyszczeń powietrza węglowodorami, takimi jak metan, benzen i benzo(a)piren na zdrowie ludzkie.

2. Zanieczyszczenie powietrza węglowodorami

Spośród wszystkich węglowodorów głównymi zanieczyszczeniami powietrza są metan, benzen i benzo(a)piren. Głównym źródłem ich występowaniu w powietrzu są pojazdy spalinowe, emitowane przez odparowanie benzyny przez gaźniki lub skrzynię korbową oraz wydalone w postaci spalin z rur wydechowych. Działają toksycznie i rakotwórczo na ludzi.

2.1 Metan jako zanieczyszczenie powietrza

Metan jest bezwonny i bezbarwny gazem o wysokim potencjale cieplarnianym. W naturze powstaje podczas rozkładu śmieci, roślinności wodnej itp. W powietrzu jest on gazowym zanieczyszczeniem występującym w niewielkiej ilości. Do zwiększenia ilości metanu w atmosferze prowadzi wzrost globalnej antropogenicznej emisji i zwiększonej działalności gospodarczej (spalania gazu ziemnego i z przemysłu). W spalinach samochodowych nowych samochodów z katalizatorami jego ilość jest nieoznaczalna (Szczęsny i Orlicz-Szczęsna, 2016). Wyższe stężenie (w powietrzu od 5% do 15%) może powodować wybuchy. Przy wysokich poziomach przy braku tlenu metan może działać narkotycznie na człowieka. Metan zwykle jest nieszkodliwy, jednak przy wysokich stężeniach po jego wdychaniu powoduje niedobór tlenu i trudności w oddychaniu, powodując ból głowy, dzwonienie w uszach, zawroty głowy, senność, utratę przytomności, nudności, wymioty i depresję mózgową, jest silnie trujący. U ludzi przebywanie w wysokich stężeniach metanu może prowadzić do utraty przytomności lub śmierci (Kumar i in. 2011).

2.2 Benzen jako zanieczyszczenie powietrza

Benzen jako składnik powietrza

Benzen jest składnikiem zanieczyszczonego powietrza. Zanieczyszczenie to pochodzi z wielu źródeł takich jak produkcja niektórych rodzajów smarów, gum, barwników, detergentów, leków i pestycydów (Weisel 2010). Powietrze na zewnątrz zawiera niskie poziomy benzen z dymu tytoniowego, stacji benzynowych, spalin samochodowych i emisji przemysłowych. Powietrze

w pomieszczeniu ogólnie zawiera wyższy poziom benzenu niż w powietrzu na zewnątrz. Stwierdzono, że palenie papierosów znacząco przyczynia się do ilości wdychanego benzenu i jego zawartości w powietrzu pomieszczeń (Weisel 2010).

Spośród 193 państw członkowskich Narodów Zjednoczonych tylko 53 kraje, w tym państwa członkowskie Unii Europejskiej, mają normy jakości powietrza dla benzenu, co w wielu przypadkach nie ma wpływu na ich przekraczanie. Badania dowiodły, że stężenia benzenu nie różniły się statystycznie na różnych kontynentach (Rich i Orimoloye 2016).

Biotransformacja benzenu

Biotransformacja benzenu zachodzi głównie w wątrobie i szpiku kostnym. Duże powinowactwo lotnego i lipofilowego benzenu do tkanki tłuszczowej powoduje jego magazynowanie w elementach komórek i tkankach bogatych w tłuszcz. Biotransformacja benzenu prowadzi w pierwszym etapie do utlenienia go przy udziale izoformy cytochromu P450 CYP2E1 do tlenku benzenu i oksepiny benzenowej (w równych ilościach) (Wiwanitkit 2014). Tlenek benzenu może być dalej metabolizowany trzema ścieżkami (1) poprzez szereg reakcji zrywania pierścienia z wytworzeniem t,t-mukonaldehydu, który jest następnie utleniany do kwasu, (2) poprzez szereg reakcji, tworząc koniugat z glutationem, który jest ostatecznie wydalany z moczem w postaci kwasu fenylomerkapturowego, (3) poprzez drogę nieenzymatyczną, tworząc fenol ((Snyder i Hedli 1996)). Fenol może być wydalany bezpośrednio z moczem lub może być dalej utleniany przez CYP2E1 do katecholu lub hydrochinonu. Katechol może być utleniany do trihydroksybenzenu, a hydrochinon do bardzo reaktywnego benzochinonu. Wszystkie związki fenolowe mogą tworzyć koniugaty (glukuronidy lub siarczany), które mogą być wydalone z moczem (Wiwanitkit 2014). Enzym mieloperoksydaza, obecny w szpiku kostnym, może także utleniać pochodne fenolowe do chinonów (Snyder i Hedli 1996).

Benzen – działanie na zdrowie ludzi

Benzen jest toksyczny dla ludzi i powoduje przewlekłe i ostre zatrucia poprzez skórę, drogi oddechowe i pokarmowe (Goldstein 1988). Częściej występujące zatrucia przewlekłe objawiają się przede wszystkim bólami głowy, zmęczeniem i utratą apetytu oraz spadkiem odporności. Po dłuższym czasie ekspozycji obserwowane są u osób narażonych obniżenie liczby białych komórek krwi i płytek krwi. Benzen jest sprawdzonym czynnikiem rakotwórczym zakwalifikowanym przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem jako czynnik rakotwórczy grupy 1 (IARC, 2012). Przewlekłe narażenie na benzen zostało skorelowane ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia białaczki szpikowej, ostrej białaczki limfoblastycznej i przewlekłej białaczki szpikowej, niedokrwiistości aplastycznej i zespołem mielodysplastycznym (Smith 2010).

Hematotoksyczność benzenu zależy od ilości i czasu trwania ekspozycji. Wpływa on na układ krwiotwórczy przy niskim poziomie narażenia zawodowego i nie ma dowodów na istnienie progu (Smith 2010). Większość badań oceny ryzyka narażenia na benzen opartych jest na pracownikach przemysłu gumowego, którzy są narażeni na wysokie stężenia tego węglowodoru. Natomiast w przemyśle naftowym stężenie benzenu jest dość niskie i trudno o jednoznaczne dowody toksyczności (Baak i in. 1999). Nie brakuje ich w ostrych zatruciach, które mogą prowadzić do natychmiastowego zgonu. A w łagodniejszych przypadkach po ekspozycji na skórę obserwuje się podrażnienia, rumień i odczucie palenia skóry. Po ekspozycji drogami oddechowymi obserwuje się bóle i zawroty głowy oraz senność, a także niewydolność układu oddechowego, krążenia i nerwowego (Smith 1996).

Przewlekła ekspozycja na benzen może prowadzić do wielu zmian, które przyczyniają się stopniowo do procesu białaczkowego, wskazując na multimodalny mechanizm jego działania nie tylko u dorosłych, ale również u dzieci. Obserwowane działanie benzenu może być również spowodowane metabolitem, tlenkiem benzenu. Addukty tlenku benzenu wykryto we krwi pracowników narażonych na benzen. Metabolity benzenu mogą aktywować utlenione rodniki, co może prowadzić do zmian DNA i tworzenia hydroksylowanych zasad, takich jak 8-hidroksy-2-deoksyguanozyna. Toksyczność benzenu może również wynikać z kombinacji metabolitów. Wiadomo, że wszystkie niesprężone metabolity benzenu, z wyjątkiem fenolu i 1,2,4-benzenotriolu, powodują zmniejszenie erytropoezy. Stwierdzono, że mieszaniny fenol-hydrochinon lub fenol-katechol są bardziej toksyczne dla układu

krwiotwórczego niż same metabolity. Katechol stymuluje aktywację hydrochinonu poprzez peroksydazę i wywołuje działanie genotoksyczne na limfocyty, które jest wzmacniane w porównaniu z samym hydrochinonem. Badania wykazały szereg polimorfizmów w genach kandydujących, które nadają podatność na hematotoksyczność benzenu (Smith 2010).

2.3 Benzo(a)piren – składnik smogu

Jednym z głównych składników smogu jest benzo(a)piren należący do wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA). Wysokie stężenie benzo(a)pirenu w powietrzu wynika ze spalania węgla, śmieci oraz zanieczyszczeń z sektora transportu drogowego poprzez spalanie ropy naftowej i jej produktów (Shigeyuki i in. 2019). Człowiek narażony jest na benzo(a)piren paląc papierosy, a także poprzez spożywanie wędzonych potraw, gdyż dym używany do wędzenia mięsa również może zawierać ten związek (Bourgart i in. 2019).

Biotransformacja benzopirenu

W metabolizmie benzo[a]pirenu istotną rolę odgrywają enzymy z rodziny cytochromu P-450. Enzymy te katalizują wiele reakcji utlenienia i redukcji, a jedną z istotniejszych funkcji pod względem farmakologicznym jest ich udział w metabolizmie ksenobiotyków (Bourgart i in. 2019). W znacznej części produkty metabolizmu są mniej toksycznymi związkami niż substraty reakcji, lecz istnieje grupa związków takich jak tetrachlorek węgla (CCl_4) lub benzo(a)piren, z których powstają toksyczne metabolity. Wchłanianie benzo[a]pirenu zachodzi z dużą szybkością, głównie przez struktury zawierające dużą ilość tkanki tłuszczowej. Spowodowane to jest zdolnościami do kumulacji tej substancji w tkance tłuszczowej (Bourgart i in. 2019). Benzo(a)piren aktywuje arylowy receptor węglowodorowy (AHR) i indukuje cytochromy P-450 co przyspiesza ekspresję genów z grupy CYP1 tj. CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 biorących udział między innymi w metabolizmie ksenobiotyków. (Shigeyuki i in. 2019) Biotransformacja benzo(a)pirenu składa się z dwóch faz- pierwsza z nich polega na reakcjach przekształcenia lipofilowych ksenobiotyków w hydrofilowe związki z udziałem monoooksygenaz współdziałających z układem cytochromowym P-450 (głównie CYP1A1) (Almazroo i in. 2017). Pod ich wpływem powstają tlenki arenowe, które w reakcji katalizowanej przez hydrolazę epoksydową ulegają hydrolizie do alkoholi zawierających dwie grupy hydroksylowe. Następnie fenole ulegają utlenieniu do chinonów lub podlegają dalszej epoksydacji i hydrolizie do fenolodihydrodioli. Dihydrodiole powstałe w wyniku tej reakcji to 9,10-dihydrodiol benzo(a)pirenu i 7,8-dihydrodiol benzo(a)pirenu, które są następnie utleniane przez oksydazę cytochromu P-450 do benzo(a)pireno-7,8-dihydrodiol-9,10-epoksydu, który wiąże się z DNA (Šulc i in. 2016). W drugiej fazie biotransformacji następuje sprzęganie metabolitów - powstałych w I fazie biotransformacji – z kwasem siarkowym lub glukuronowym, które poprzez lepszą rozpuszczalność w wodzie łatwiej wydalają się z organizmu. Enzymy biorące udział w II fazie biotransformacji należą do klasy transferaz. W drugiej fazie biotransformacji bierze udział 7,8-dihydrodiol benzo(a)pirenu, który w porównaniu do benzopirenu jest bardziej toksyczny i rakotwórczy (Almazroo i in 2017).

Działanie metabolitów benzo(a)pirenu

Za działanie kancerogenne benzo(a)pirenu odpowiedzialne są bezpośrednio produkty metabolizmu, na drodze tworzenia adduktów z DNA oraz generowania reaktywnych form tlenu podczas zachodzących przemian z udziałem cytochromu P-450. Różnice osobnicze aktywności katalitycznej enzymów P-450 jak i ich ekspresji wynikające z polimorfizmu genetycznego oraz modulacji aktywności enzymatycznej przez endogenne i egzogenne związki skutkują różną ilością powstałych pochodnych epoksydihydrodiolowych ksenobiotyków, w tym benzo(a)pirenu, i reaktywnych form tlenu między osobnikami (Šulc i in. 2016). Różnice te determinują podatność ludzi na rakotwórcze działanie ksenobiotyków. Produktem przemian I fazy biotransformacji benzo(a)pirenu z udziałem cytochromu P-450 jest benzo(a)pireno-7,8-dihydrodiol-9,10-epoksyd, który bezpośrednio oddziałuje z DNA (Shigeyuki i in. 2019; Šulc i in. 2016). Dochodzi do tworzenia wiązań kowalencyjnych aktywowanego węglowodoru - epoksydu benzo(a)pireno-dioli z egzocyklicznymi grupami aminowymi zasad purynowych (deoksyguanozyny i deoksyadenozyny) oraz adduktu z deoksycytydyną (Straub i in. 1997). Pierścień benzo(a)pirenu ułożony jest w mniejszym rowku helisy DNA i zwrócony jest w stronę końca 5' i jedna ze stron pierścienia

ułożona jest na szkieletcie cukrowo-fosforanowym nici DNA. W miejscu adduktu powstaje poszerzenie mniejszego rowka DNA, co powoduje unieczynnienie genu supresorowego białka p53, które odpowiada za kontrolę przebiegu cyklu komórkowego i stanowi element punktu kontrolnego G1/S cyklu. W obrębie tego genu powstające addukty skutkują transwersjami G→T, A→T i tranzycjami A→G. W wyniku uszkodzenia tego genu nie dochodzi do eliminacji komórek z mutacjami, które w konsekwencji przekazywane są kolejnemu pokoleniu komórek. Stwierdzono również indukowanie mutacji w obrębie protoonkogenów H-ras i K-ras. Zmiany te skutkują rozwojem procesu nowotworowego w tkance płucnej, skórze, pęcherzu moczowym, gruczole mlekowym, powstawaniem chłoniaków, nowotworów wątroby, brodawczaków i innych (Khalili i in. 2000).

3. Podsumowanie

Będąc składnikiem smogu węglowodory, takie jak metan, benzen i benzo(a)piren są różne nie tylko pod względem budowy chemicznej, ale również pod względem właściwości. Dwa pierwsze lotne, trzeci stały, wszystkie mają powinowactwo do tkanki tłuszczowej i są bardzo toksyczne. Ich toksyczność uzależniona jest od dawki i czasu ekspozycji. Zatrucie ostre dwoma pierwszymi prowadzi do zgonu. Benzen jest hematotoksycznym i uznanym kancerogenem wywołującym białaczkę. Badania sugerują ostrą toksyczność i kancerogenność jego utlenionych, bardzo reaktywnych metabolitów. Benzo(a)piren jest prokancerogenem, ma wiele kancerogennych metabolitów wywołujących nowotwory lite: skóry, wątroby, płuc, krtani, pęcherza moczowego i wiele innych. Obydwa, benzen i benzo(a)piren są na listach substancji silnie kancerogennych.

4. Literatura

- Almazroo O A, Abdulhameed O, Kowser M M, i in. (2017) Drug Metabolism in the Liver” Clinics in Liver Disease 21 (1): 1–20.
- Baak YM, Ahn BY, Chang HS, i in. (1999) Aplastic anemia in a petrochemical factory worker Environmental Health Perspectives 107(10):851-853.
- Bourgart E, Barbeau D, Marques M, et al. (2019) A realistic human skin model to study benzo[a]pyrene cutaneous absorption in order to determine the most relevant biomarker for carcinogenic exposure. Archives of Toxicology 93(1): 81-93.
- Czajkowski J, Grabowski R (2019) Ochrona przed niekorzystnym działaniem smogu na oczy Ophththerapy 6, 1 (21): 5-8.
- Goldstein BD (1988) Benzene Toxicity. Occupational Medicine 3(3): 541-554.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Benzene. Lyon: International Agency for Research on Cancer Research; 2012. Vol 100F-Evaluation.
- Khalili H, Zhang FJ, Harvey RG, i in. (2000) Mutagenicity of benzo[a]pyrene-deoxyadenosine adducts in a sequence context derived from the p53 gene". Mutation Research. 465, 39–44
- Kumar S, Nayek M, Kumar A, i in. (2011) Aldehyde, Ketone and Methane Emissions from Motor Vehicle Exhaust: A Critical Review. American Chemical Science Journal 1(1): 1-27.
- Rich A L, Orimoloye H T (2016) Elevated Atmospheric Levels of Benzene and Benzene-Related Compounds from Unconventional Shale Extraction and Processing: Human Health Concern for Residential Communities. Environmental Health Insights 10(1): 75-82.
- Shigeyuki U, Sakai M, Fujinari Y, i in. (2019) Diallyl Trisulfide Enhances Benzo[a]Pyrene-Induced CYP1A1 Expression and Metabolic Activation in Hepatic HepG2 Cells. Anticancer Research 39(5): 2369-2375.
- Smith MT (1996) Overview of benzene-induced aplastic anaemia. European Journal of Haematology Suppl. 60: 107-110.
- Smith M T (2010) Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. Annual Review of Public Health 31: 133-148.
- Snyder R, Hedli CC (1996) An overview of benzene metabolism. Environmental Health Perspectives 104 (6):1165-1171.

- Straub KM, Meehan T, Burlingame A. L, i in. (1997) Identification of the major adducts formed by reaction of benzo(a)pyrene diol epoxide with DNA in vitro. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(12): 5285-5289.
- Szczęsny P, Orlicz-Szczęsna G (2016) Wpływ szkodliwych składników spalin na zdrowie człowieka. *Autobusy* 6: 425-428.
- Šulc, M, Indra R, Moserová M, i in. (2016) The Impact of Individual Cytochrome P450 Enzymes on Oxidative Metabolism of Benzo [a] Pyrene in Human Livers: Activation and Detoxification of Benzo[a]Pyrene by Human Cytochrome P450s. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 57(3):229–235.
- Weisel CP (2010) Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. *Chemical Biological Interaction* 184(0): 58–66.
- Wiwanitkit V (2014) Benzene, cytochrome, carcinogenesis: A topic in preventive toxicology. *Indian Journal of Occupational Environmental Medicine* 18(2): 97-99.
- Xiaoli D, Shen G, Yang H, i in. (2016) Measurement of Human CYP1A2 Induction by Inhalation Exposure to Benzo(a)Pyrene Based on in Vivo Isotope Breath Method. *Environmental Pollution* 208: 506–511.
- Yuan-Wan S, Kosinska W, . Guttenplan J. B. (2019) E-Cigarette Aerosol Condensate Enhances Metabolism of Benzo(a)Pyrene to Genotoxic Products, and Induces CYP1A1 and CYP1B1, Likely by Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16 (14): 2468.