

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze – flora i fauna



www.mlodzinaukowcy.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 978-83-66392-51-9)

ISBN (wydanie online 978-83-66392-84-7)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66392-83-0)

Ilość znaków w książce: 436 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 10.9

Data wydania: czerwiec 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. Wpływ cząsteczek nanosrebra na wzrost petunii ogrodowej (<i>Petunia × atkinsiana</i> D. don) w kulturach <i>in vitro</i>	7
<i>Bil Weronika, Krupa-Mańkiewicz Marcelina, Monika Figiel-Kroczyńska, Justyna Pelc</i>	
2. Efekt działania kwasu askorbinowego w łagodzeniu skutków stresu wywołanego przez ołów u żyta (<i>Secale cereale</i>) linii 541 <i>in vitro</i>	14
<i>Bil Weronika, Bienias Anna, Czarnecka Sylwia, Krupa-Mańkiewicz Marcelina</i>	
3. Zastosowanie kwasu askorbinowego do łagodzenia skutków stresu wywołanego przez ołów u estragonu (<i>Artemisa dracunculus</i>) w kulturach <i>in vitro</i>	20
<i>Bernaciak Mateusz, Bil Weronika, Dyguś Szymon, Pelc Justyna, Krupa-Mańkiewicz Marcelina</i>	
4. Plonowanie i jakość owoców dwóch polskich odmian maliny (<i>Rubus idaeus</i> L.) po dolistnym zastosowaniu biostymulatorów	26
<i>Bernaciak M., Bil W., Dyguś Sz., Figiel-Kroczyńska M., Krupa-Mańkiewicz M., Ochmian I.</i>	
5. Produkcja biomasy roślinnej półnaturalnych pastwisk górskich	35
<i>Borkowski Filip, Greficz Dawid, Kasprzak Hubert, Kolańska Anna, Nocoń Zofia</i>	
6. Rośliny stosowane w preparatach przeciwbólowych dostępnych w sprzedaży	45
<i>Katarzyna Możdżeń, Natalia Cebula, Beata Barabasz-Krasny</i>	
7. Ashwagandha – charakterystyka i właściwości zdrowotne	54
<i>Nowosad Karolina, Sujka Monika</i>	
8. Problematyka ochrony środowiska przyrodniczego i kulturowego w gminie wiejskiej Puchaczów	59
<i>Sylwia Szeffler</i>	
9. Biocenotyczna rola zadrzewień śródpolnych w krajobrazie wiejskim	66
<i>Sylwia Szeffler</i>	
10. Broń chemiczna jako jeden z rodzajów broni masowego rażenia	72
<i>Edyta Janik, Michał Ceremuga, Maksymilian Stela, Michał Bijak</i>	
11. Niekonwencjonalne wykorzystanie olejów jadalnych jako środków smarnych	78
<i>Szczyńska Monika</i>	
12. Metody genomowe w identyfikacji mikroorganizmów	84
<i>Włodarczyk Karolina</i>	
13. Motyle dzienne (Lepidoptera: Papilionoidea i Hesperioidea) rezerwatu „Las Wagramski” i okolic	91
<i>Artur Baranowski</i>	
14. Fauna motyli (Lepidoptera) rezerwatu „Las Piwnicki”, dynamika zmian oraz obserwacje nowych gatunków	99
<i>Artur Baranowski</i>	
15. Świnia domowa jako zwierzę modelowe w badaniach biomedycznych	107
<i>Kuriga Anna</i>	
16. Kanibalizm świń- przyczyny i zapobieganie	113
<i>Kuriga Anna</i>	

- 17. Testy behawioralne wykorzystywane w badaniu zaburzeń kognitywnych u zwierząt laboratoryjnych** **119**
Małgorzata Łopatyńska-Mazurek, Karolina Kiełbik, Joanna Stec, Aleksandra Dymek, Gabriela Bielecka-Papież
- 18. Test wymuszonego pływania w badaniu stanów depresyjnych u zwierząt laboratoryjnych** **126**
Małgorzata Łopatyńska-Mazurek, Karolina Kiełbik, Joanna Stec, Aleksandra Dymek, Gabriela Bielecka-Papież

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika pięć monografii, o których w sposób ogólny można powiedzieć, że dotyczą nauk przyrodniczych. Dwie z nich poświęcone są żywieniu, żywności i medycynie, kolejne dotyczą flory i fauny oraz hodowli zwierząt.

W pierwszej z prezentowanych monografiach kilka rozdziałów porusza zagadnienia związane z wpływem żywienia na zdrowie, czyli generalnie prezentowany jest pogląd że dobra dieta to bardzo ważny element naszego życia. Niestety nasze nawyki żywieniowe są bardzo dalekie od ideału, zarówno co do składu, jak i kaloryczności pożywienia. W jednym z rozdziałów poruszono problemy rosnącej liczby osób ze zbyt dużą masą ciała, co w długiej perspektywie może się odbijać na zdrowiu, a na co dzień zmniejsza komfort życia. Podstawową metodą radzenia sobie z otyłością i nadwagą jest odpowiednia dieta o ujemnym bilansie kalorycznym oraz dodatkowo zwiększenie aktywności fizycznej.

W następnej z monografii nadal analizowano wpływ diety na zdrowie i kondycję fizyczną. Dwa rozdziały poświęcono diecie osób uprawiających sporty siłowe. Jej właściwy dobór jest niezwykle istotne dla sportowców, szczególnie tych uprawiających sport wyczynowy, gdzie uzyskiwanie wysokich wyników sportowych ma kluczowe znaczenie. Cieszy że takimi zagadnieniami zajmują się też doktoranci. Dwa rozdziały poświęcono też herbacie, która w Polsce jest jednym z podstawowych napojów, a posiada też właściwości lecznicze i antyoksydacyjne. Oczywiście mowa tu o różnych rodzajach herbat.

Trzecia z monografii dotyczy flory i fauny, pierwsze rozdziały traktują o kulturach in vitro różnych roślin. Analizowane są w nich wpływy nanocząsteczek srebra i kwasu askorbinowego na wzrost roślin i łagodzenie stresu wywołanego związkami ołowiu. Jeden z rozdziałów dotyczy dość szczególnego wykorzystania oleju roślinnego, jako środka smarnego. Olej roślinny niezależnie od rośliny z jakiej pochodzi należy do surowców biodegradowalnych i szczególnie może być przydatny w sytuacji gdy nie jest możliwe jego zebranie i utylizacja, a pozostaje on w środowisku. Taka sytuacja zachodzi podczas smarowania pilarek łańcuchowych, nie da się wówczas uniknąć pozostawiania jego cząsteczek w środowisku.

W czwartej monografii mamy rozdziały dotyczące badań procesów zachodzących w środowisku, procesów biologicznych i chemicznych. Rozważane są tu m.in zjawiska agregacji minerałów w obecności wybranych jonów, możliwości usuwania barwników z wody, modelowanie procesów dostarczania leków i wiele innych.

Ostatnia monografia w tej serii dotyczy w większości hodowli zwierząt, w szczególności drobiu. Jest to w tej chwili bardzo duża gałąź produkcji rolniczej w Polsce i to zarówno w zakresie produkcji jaj konsumpcyjnych, jak i mięsa. W kolejnych rozdziałach rozważane są zagadnienia związane z przechowywaniem jaj, ich znaczenia w diecie ludzi, żywienia drobiu oraz jego chorób. Jak można wnioskować duże znaczenie ekonomiczne hodowli drobiu przekłada się na szerokie zainteresowanie naukowców problemami jakie pojawiają się w trakcie tej produkcji. Kilka kolejnych rozdziałów dotyczy zdrowia i żywienia zwierząt domowych: psów i kotów. Zwierzęta te towarzyszą nam od dawna ale jeszcze kilkanaście lat temu były traktowane raczej przedmiotowo, obecnie awansowały na członków rodziny co przekłada się na rozwój gabinetów weterynaryjnych, kosmetycznych oraz produkcję specjalnej żywności. Jednocześnie też jak widać po publikowanych pracach skutkuje zainteresowaniem naukowców.

Polecam zestaw pięciu interesujących monografii i życzę wielu refleksji związanych z tematyką zaprezentowanych prac badawczych.

dr hab. Jacek Leśny
prof. UPWR

1. Wpływ cząsteczek nanosrebra na wzrost petunii ogrodowej (*Petunia × atkinsiana* D. don) w kulturach *in vitro*

Effect of nanosilver particles on the growth of petunia (*Petunia × atkinsiana* D. don) in *in vitro* cultures

Bil Weronika⁽¹⁾, Krupa-Małkiewicz Marcelina⁽¹⁾, Monika Figiel-Kroczyńska⁽²⁾, Justyna Pelc⁽³⁾

⁽¹⁾Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁽²⁾Katedra Ogrodnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁽³⁾Katedra Bioinżynierii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: dr inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz

Bil Weronika: weronika.bil@wp.pl

Słowa kluczowe: nanosrebro, *Petunia×atkinsina*, mikrorozmnażanie

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu różnych stężeń nanosrebra na wzrost petunii ogrodowej (*Petunia × atkinsiana* D. don) w kulturach *in vitro*. Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe petunii ogrodowej otrzymane z ustabilizowanej kultury *in vitro*. W doświadczeniu zastosowano 4 kombinacje pożywek według składu makro- i mikroelementów MS (Murashige i Skoog 1962), różniących się stężeniem dodanego roztworu nanosrebra (0, 2, 4, 8%). Kontrolę w doświadczeniu stanowiła pożywka MS bez dodatku roztworu nanosrebra. Eksplantaty petunii o długości 2cm wykładano po 4 sztuki do słoików o pojemności 300ml, uzupełnionych 30ml odpowiedniej kombinacji pożywki. Kultury inkubowano przez 4 tygodnie w fitotronie. Następnie dokonano pomiarów cech morfologicznych tj. wysokości roślin (cm), liczby pędów, długości pędów (cm) i liczby korzeni oraz świeżą masę (g). Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, iż stężenie zastosowanego roztworu nanosrebra miało wpływ na wyżej wymienione cechy morfologiczne petunii ogrodowej. Ponadto, zaobserwowano różnice w kolorze pędów badanych roślin. Petunie z pożywek kontrolnych charakteryzowały się brakiem wykształconego systemu korzeniowego. Rośliny z pożywki MS z dodatkiem 2% roztworu nanosrebra wykazywały najwyższy przyrost masy, długości pędów oraz korzeni.

Abstract

The purpose of this work was to determine the effect of various nanosilver concentrations on the growth of petunia (*Petunia × atkinsiana* D. don) in *in vitro* culture. The research material consisted of petunia shoot explants obtained from a stable *in vitro* culture. In the experiment, 4 combinations of media were used according to the composition of MS macro- and microelements (Murashige and Skoog 1962), differing in the concentration of the added nanosilver solution (0, 2, 4, 8%). MS medium without the addition of nanosilver solution was use as a control. Petunia explants 2 cm long were put in 4 pieces into 300ml jars, supplemented with 30ml of appropriate medium combination. Cultures were incubated for 4 weeks in the phytotron. Then morphological features were measured, i.e. plant height (cm), number of shoots, length of shoots (cm) and number of roots, dry mass (g). Based on the results obtained, it was found that the concentration of the nanosilver solution used in this study, had an impact on the above-mentioned morphological features of petunia plants. In addition, differences in the color of shoots of the plants tested were observed. Petunias from control media were characterized by the lack of a developed root system. Plants from MS medium with the addition of a 2% solution of nanosilver showed the highest increase in mass, length of shoots and roots.

1. Wstęp

Petunia należy do rodziny psiankowatych (*Solanaceae*). Jest rośliną występującą w środowisku naturalnym, a także uprawiana jest przez człowieka. Petunia ogrodowa (*Petunia ×*

atkinsiana D. don) jest rośliną powszechnie uprawianą i wykorzystywaną do dekoracji balkonów, pergoli czy werand. Odmiana ta posiada okazałe, w szerokiej skali kolorystycznej kwiaty, które można podziwiać od wiosny do jesieni. Petunie w naszym klimacie są uprawiane jako rośliny jednoroczne. Roślina ta jest łatwa w hodowli w kulturach *in vitro*, dlatego też nadaje się do prowadzenia na niej doświadczeń pozwalających na sprawdzenia wielu czynników.

W ostatnim dziesięcioleciu zauważono, znaczne zainteresowanie i wykorzystywanie nanomateriałów w doświadczeniach naukowych. Nanotechnologia jest nauką wykorzystującą cząsteczki w zakresie od 1 do 100 nm. Nanocząstki są obecnie stosowane do dezynfekcji oraz są wykorzystywane w szerokiej gamie materiałów, ze względu na ich udowodnioną aktywność bakteriostatyczną i fungistyczną. Wykorzystanie nanomateriałów obejmuje wiele gałęzi przemysłu, medycynę, kosmetologię, farmację, rolnictwo, elektronikę czy elektrotechnikę. Ich zastosowanie obejmuje prawie wszystkie obszary nauk bio.

Według danych z 2012 roku roczna produkcja nanocząstek na świecie przekracza 200 000 ton. Do roku 2020 przewidywany jest wzrost tej produkcji do poziomu 580 000 ton (Orzechowska, 2016)

Powszechne stosowanie cząsteczek nanosrebra spowodowało uwalnianie ich do środowiska, a następnie przedostawania się do łańcucha pokarmowego ludzi. Jednakże brak jest dokładnej wiedzy na temat potencjalnych zagrożeń jakie mogą wywołać w środowisku (Yasur 2013). Rośliny stanowią znaczny obszar w środowisku, istnieje więc szansa że mogą one napotkać uwolnione nanomateriały. Nie jest jednak jasne jaki wpływ będą one miały na życie roślin.

W doniesieniu Komisji Europejskiej (European Commission 2011) wskazuje się na dwie istotne przyczyny potencjalnie bardziej szkodliwego oddziaływania nanomateriałów na środowisko naturalne w porównaniu z materiałami konwencjonalnymi. Po pierwsze, materiały w skali nano charakteryzują się często odmiennym zachowaniem od tych samych materiałów w skali makro. Przykładem może być większa powierzchnia czynna nanomateriałów, która powoduje, że są one bardziej reaktywne i wykazują większą łatwość w oddziaływaniu z innymi substancjami w swoim otoczeniu. Po drugie, nanomateriały mogą zachowywać się jak nośniki dla innych zanieczyszczeń, wpływając w ten sposób na większe rozprzestrzenianie się tych zanieczyszczeń w środowisku (European Commission 2011).

Ekotoksyczność nanocząstek srebra na rośliny opisano w kilku wcześniejszych badaniach (Sarmat i in. 2011). Prowadzone są ciągle badania nad sprawdzeniem zmian jakie może spowodować nanosrebro w hodowlach roślinnych (Nowack 2010). Okazuje się, że wprowadzanie nadmiernej ilości nanosrebra do ekosystemów może być niebezpieczne dla środowiska. Nanostruktury srebra wykazują się dużą aktywnością biobójczą. Przenikając do środowiska naturalnego, stanowią poważny problem w prawidłowym funkcjonowaniu ekosystemów, w szczególności mikroorganizmów występujących w glebie. Wcześniej zgłaszano, że AgNP poniżej 5 nm są bardziej toksyczne dla bakterii nitryfikacyjnych, niż większe cząsteczki AgNP lub rozpuszczone jony Ag⁺, co oznacza toksyczność rozpuszczonego srebra (Choi i Hu 2008). Ponadto, nanocząsteczki są szeroko stosowane w rekultywacji środowiska.

2. Nanosrebro

Nanosrebro ma zakres objętości od 1 do 100 nm i składa się z około 20-15000 atomów Ag. W porównaniu z cząsteczkowym Ag nanosrebro posiada szereg właściwości fizyko-chemicznych takich, jak wysokie przewodnictwo elektryczne i cieplne, stabilność chemiczna, aktywność katalityczna i nieliniowe zachowanie optyczne. Wszystkie te właściwości czynią nanosrebro wyjątkowym. Ponadto, mają duży stosunek powierzchni do objętości, wykazują lepszy kontakt z mikroorganizmami i są znane z szerokiego spektrum przeciwbakteryjnego o działaniu na różne gatunki zarówno bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Mogą one tworzyć nanokryształy, takie, jak nanocyndry, nanopręgi, nanodrut, nanopłytki, nanobelki. Jak wynika z doniesień naukowych, kilka patogennych bakterii rozwinęło oporność na różne antybiotyki, w tym nanosrebro dlatego też nie można mówić o 100% skuteczności zwalczania drobnoustrojów (Abdi i in. 2008; Sarmat i in. 2011). Zastosowanie nanocząsteczek m.in. w opatrunkach medycznych, czy urządzeniach

medycznych pokrytych nanożelami, eliminuje 99% bakterii, co znaczy że materiał zabija około 650 rodzajów szkodliwych zarazków i wirusów (Zewie i Ambaye 2016)

Nanosrebro charakteryzuje się wysoką skutecznością w eliminacji zakażeń bakteryjnych. Zastosowanie roztworu AgNO_3 jako źródła srebra do dezynfekcji materiału roślinnego w kulturach *in vitro* jest dość powszechne (Krupa-Małkiewicz i in. 2018). Natomiast, niewiele jest doniesień dotyczących wpływu nAg na efektywność namnażania roślin w kulturach *in vitro*.

Stąd też celem badania była próba określenia wpływu różnych stężeń roztworu nanosrebra na namnażanie roślin petunii ogrodowej (*Petunia × atkinsiana* D. don) w kulturach *in vitro*.

3. Materiał i metody

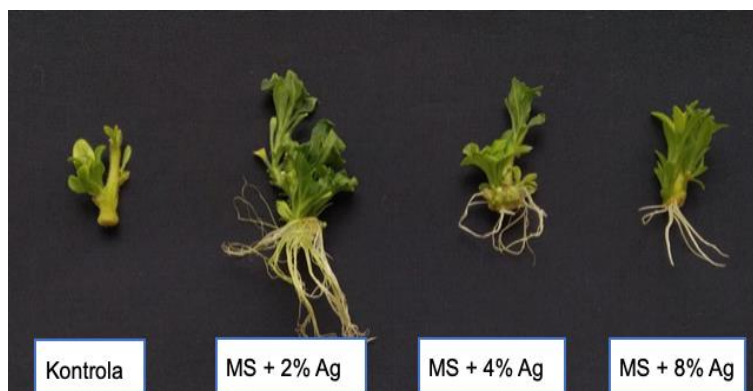
Doświadczenie zostało przeprowadzone w laboratorium kultur *in vitro* Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiałem badawczym były eksplantaty pędowe petunii ogrodowej (*Petunia × atkinsiana* D. don) otrzymane z ustabilizowanej kultury *in vitro*. Pierwszym etapem było sporządzenie pożywek niezbędnych do złożenia doświadczenia. W tym celu przygotowano 4 kombinacje pożywek MS z dodatkiem roztworu nanosrebra: MS+2%, MS+4%, MS+8% Pożywka MS bez dodatku cząsteczek nanosrebra stanowiła próbę kontrolną. W doświadczeniu wykorzystano nanosrebro w postaci zawiesiny roztworu koloidalnego (Krupa-Małkiewicz i in. 2017).

Przygotowane pożywki poddano wcześniej procesowi autoklawowania przez 19 min w 121° C i ciśnieniu 0.1MPa. Eksplantaty petunii o długości 2cm wykładano po 4 sztuki do słoików o pojemności 300ml, uzupełnionych 30ml odpowiedniej kombinacji pożywki. Doświadczenie założono w 5 powtórzeniach po 4 rośliny w każdym słoiku. Szczepienie eksplantatów przeprowadzano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza, w celu zapewnienia sterylnych warunków pracy. Tak przygotowane kultury inkubowano w fitotronie o temperaturze 21 °C, 16 godzinnym oświetleniu ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) przez 4 tygodnie.

Otrzymane wyniki badań opracowano statystycznie. Wykorzystano analizę wariancji dwuczynnikowej oraz test Tukey'a dla średnich. Różnice pomiędzy badanymi cechami szacowano na poziomie istotności $\alpha_{0,01}$ dla różnic wysoce istotnych i $\alpha_{0,05}$ dla różnic istotnych.

4. Wyniki

Na podstawie uzyskanych wyników badań zaobserwowano, że dodatek cząsteczek nanosrebra niezależnie od jego stężenia w porównaniu z próbą kontrolną, miał pozytywny wpływ na takie cechy morfologiczne jak: wysokość rośliny, liczba nowych pędów na roślinie, długość i liczbę korzeni (Rys. 1).



Rys.1 Kultury pędowe petunii ogrodowej (*Petunia × atkinsiana* D. don) po 4 tygodniach na pożywkach z dodatkiem 2%, 4% i 8% nanosrebra oraz próba kontrolna.

Przeprowadzona analiza wariancji wyników wykazała, że rośliny petunii na pożywkach MS z dodatkiem 2% i 8% roztworu nanosrebra charakteryzowały się najdłuższymi pędami, odpowiednio 2.72 cm i 2.81cm, w porównaniu do kontroli (Tab. 1). Natomiast długość pędów petunii na pożywce z dodatkiem 4% nanosrebra nie różniła się statystycznie istotnie i była na poziomie kontroli, która wynosiła 2.39cm.

Tab. 1. Średnie wartości badanych cech morfologicznych roślin petunii ogrodowej (*Petunia × atkinsiana* D. don) namnażanych w kulturach *in vitro* na pożywce MS z dodatkiem nanosrebra w różnych stężeniach

Rodzaj pożywki	Wysokość rośliny (cm)	Liczba pędów	Długość korzeni (cm)	Masa (g)	Liczba liści	Liczba pąków
Kontrola	2.39b*	1.85b	0.33c	0.403a	9.05b	0a
Pożywka MS + 2% nanosrebra	2.72a	3a	1.54a	0.61a	18a	0a
Pożywka MS + 4% nanosrebra	2.55b	2.3b	1.90a	0.53a	17.25a	0.1a
Pożywka MS + 8% nanosrebra	2.81a	2.7a	1.07b	0.65a	19.1a	0.15a

* grupy jednorodne

Podobne różnice statystyczne obserwowano w przypadku liczby pędów na roślinie. Największą ich liczbę (3) zaobserwowano wśród roślin petunii namnażanych na pożywce MS z dodatkiem 2% roztworu nanosrebra. Wraz z eksplantatami petunii z pożywki MS+8% roztworu nanosrebra, stanowiły one jedną grupę jednorodną – a (Tab. 1). Zastosowany roztwór nanosrebra wykazał stymulujący wpływ na rozwój systemu korzeniowego. Średnio najdłuższe korzenie obserwowano u roślin petunii namnażanej na pożywce MS z dodatkiem 4% i 2% nanosrebra, odpowiednio 1.90cm i 1.54cm. Rośliny z tych pożywek znalazły się w jednej grupie jednorodnej – a. Najkrótszymi korzeniami cechowały się rośliny kontrole, ich długość wynosiła 0.33cm.

Dodatek roztworu nanosrebra nie miał statystycznie istotnego wpływu na masę roślin oraz liczbę pąków. Natomiast zaobserwowano istotnie statystyczny wpływ nanosrebra na liczbę wykształconych liści. Petunie z pożywek MS, bez względu na zastosowane stężenie nanosrebra, charakteryzowały się średnio dwukrotnie większą liczbą liści w porównaniu do roślin z pożywki kontrolnej (Tab.1).

5. Dyskusja

Nanosrebro jest materiałem powszechnie stosowanym w różnych dziedzinach zwłaszcza w sektorze rolnym. Wykorzystywane jest jako stymulatory wzrostu roślin, fungicydy zapobiegające chorobom grzybicznym lub środki przyspieszające dojrzewanie owoców. Srebro jest drugim najbardziej toksycznym dla organizmów wodnych metalem po rtęci. Dlatego też, uwolnienie dla ekosystemu budzi poważne obawy dotyczące bezpieczeństwa i toksyczności dla środowiska. Rośliny są istotną częścią ekosystemu. Stąd też, zrozumienie wpływu nanosrebra na rośliny ma ogromne znaczenie dla oceny ich toksyczności (Abdi i in. 2008).

Zaniepokojenie potencjalnym szkodliwym działaniem nanocząstek, spowodowało pojawienie się nanotoksykologii jako wyjątkowej i znaczącej dyscypliny badawczej (Brumfield 2003). Nanotoksykologia to nauka zajmująca się badaniem toksyczności nanomateriałów. Ze względu na efekty wielkości i duże pole powierzchni, nanomateriały mają unikalne właściwości w porównaniu z większymi odpowiednikami. Ciężko jednak przewidzieć pozytywny lub negatywny

efekt oraz sposób ich działania na środowisko. Powszechnie wiadomo, że metale ciężkie są toksyczne. Powodują one hamowanie kiełkowania nasion, wzrostu czy też zakłócanie procesów biochemicznych (Sędzik i in. 2019).

Według badań przeprowadzonych przez Zeliadt (2010) nanocząstki mogą wpływać negatywnie na wzrost roślin, po przeniknięciu do środowiska. W doświadczeniu wykorzystano preparat Bio Solid, który zawierał jony srebra. Z przeprowadzonych badań wynikało, że nanocząstki zmniejszyły wzrost jednego z testowanych gatunków roślin o 22% w porównaniu do kombinacji z Bio Solidem bez dodatku jonów srebra. Dane dotyczące potencjalnej toksyczności dla gatunków lądowych są nadal ograniczone. Badania nanotoksykologiczne koncentrowały się na cytotoxyczności u ssaków lub wpływie za zwierzęta.

Pierwsze doniesienia o negatywnym wpływie nanocząstek opublikowali Yang i Watts (2005). W doświadczeniu zbadano fitotoksyczności nanocząstek tlenku glinu na 5 gatunków roślin: *Zea mays* (kukurydza), *Cucumis sativus* (ogórek), *Glycine max* (soja), *Brassica oleracea* (kapusta) i *Daucus carota* (marchew zwyczajna).

Wpływ nanosrebra i azotanu srebra na plon nasion (*Ocimum basilicum* L.) prowadziła Nejatzaadeh-Barandozi (2014). Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że nie było znaczącej różnicy we wzroście pędów między zastosowaniem azotanu srebra w stężeniu 100 ppm, a stężeniem nanosrebra 60 ppm. Jednak zwiększenie stężenia azotanu srebra ze 100 do 300 ppm spowodowało spadek wydajności nasion. Przy czym, po zastosowaniu roztworu nanosrebra w niższych stężeniach od 20 do 60 ppm doprowadził do poprawy wydajności nasion. Na podstawie uzyskanych wyników, można wnioskować, że odpowiednie stężenie nanosrebra może wpłynąć nie tylko tak, jak w badaniu własnym na wzrost roślin, lecz także na zdolność kiełkowania nasion.

Podobne do badań własnych doświadczenie prowadzili Dimkpa (2011). Wykazano w nich, że nanocząstki srebra zakłócają wzrost pszenicy (*Triticum aestivum* L.) w podłożu z piasku. Częsteczki AgNP hamowały wzrost długości pędów i korzeni pszenicy w sposób zależny od dawki. Wyniki są zgodne z wynikami uzyskanymi we własnym badaniu. Po zastosowaniu nanosrebra w stężeniu 2.5 mg kg⁻¹ zwiększało rozgałęzienie korzeni pszenicy, wpływając w ten sposób na biomasa roślin. Podobne wyniki w swoim badaniu uzyskał Lee i in. (2012) u *A. thaliana*. Zastosowano w nich zawiesinę Agap, która wpływała hamująco na wydłużenie korzeni i wykazywała liniową zależność dawka-odpowiedź w badanym zakresie stężeń (Lee i in. 2012)

Salama (2012) w swoim badaniu określił wpływ nanocząstek srebra na cechy morfologiczne fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) i kukurydza (*Zea mays* L.), takie jak długość pędów i korzeni, powierzchnia liści, zawartość chlorofilu, węglowodanów i białek. Uzyskane wyniki wykazały, że małe stężenia nanocząstki srebra miały stymulujący wpływ na wzrost sadzonek, podczas gdy ich zwiększone stężenia wywoływał efekt hamujący. Jednak wzrost stężenia nanocząstek srebra z 20 do 60 ppm doprowadziło do wzrostu długości pędów i korzeni, powierzchni liści, chlorofilu, węglowodanów i zawartość białka w dwóch badanych roślinach uprawnych. Zaobserwowano, że stężenie 20, 40 i 60 ppm wpływało stymulująco na wydłużenia pędów i korzeni badanych roślin fasoli i kukurydzy. Natomiast stężenie 80 i 100 ppm nanocząstek srebra istotnie hamowało wydłużenie pędów i korzeni.

Zrozumienie negatywnych skutków działania nanosrebra na rośliny nie jest jeszcze dokładnie poznane. Zrozumienie tego mechanizmu w swoich badaniach sprawdził Woo-MiLee (2012). Badał toksyczność nanosrebra na roślinach uprawnych *Phaseolus radiatus* i *Sorghum bicolor*. Dodatkowo, sprawdził pobieranie nanocząstek przez rośliny. Uzyskane wyniki wykazały, że wzrost stężenia nanocząsteczek ma działanie hamujące.

Według Seif Sahandi (2013) w badaniu przeprowadzonym na ogóreczniku zwyczajnym (*Borago officinalis* L.), wykazano, iż zastosowanie 20, 40 i 60 ppm stężenia nanosrebra doprowadziło do poprawy parametrów takich jak: sucha masa rośliny, sucha masa kwiatostanu, wielkość liści, plon nasion, masa nasion. Ponadto, zaobserwowano, że stosowanie nanosrebra jest bardziej korzystne, niż stosowanie azotanu srebra. Dzieje się tak za sprawą małych rozmiarów nanocząsteczki, które powodują lepszą przepuszczalność nanosrebra do tkanki roślinnej. (Seif Sahandi, 2013)

Analizując wyniki przeprowadzonych badań własnych, dotyczących wzrostu biomasy rośliny, stwierdzono, że nanosrebro może wpływać stymulująco na jej przyrost.

Uzyskane wyniki były podobne do uzyskanych w badaniu Sadak (Sadak 2019) na kozieradce pospolitej (*Trigonella foenum-graecum*). Spośród różnych stężeń zastosowanych w badaniu 40 mg l^{-1} AgNPs było najskuteczniejszym stężeniem wpływającym na poprawę wzrostu oraz badanych parametrów biochemicznych i wydajności kozieradki.

Nanosrebro może mieć także wpływ na niwelowanie stresu solnego u roślin. W doświadczeniu Seyed Saeid Hojjat w celu stworzenia stresu zasolenia użyto chlorku sodu (NaCl) na poziomie 0 (jako kontrola), 5, 10, 15 i 20 dS m^{-1} oraz pięć stężeń nanocząstek srebra (0, 10, 20, 30 i $40 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) na nasionach kozieradki (*Trigonella foenum-graecum*) (Hojjat S S i in. 2017). Celem badań było określenie wpływu nanosrebra i stresu solnego na zdolność kiełkowania, długość pędów i korzeni, świeżą i suchą masę. Wyniki wykazały istotny wpływ nanocząstek srebra na łagodzenie skutków stresu zasolenia u roślin kozieradki. Zaobserwowano istotne zmniejszenie procentu kiełkowania i wzrostu sadzonek wynikające z działania stresu zasolenia, a także ich znaczny wzrost po zastosowaniu nanocząstek srebra. Zastosowanie AgNPs było korzystne w poprawie tolerancji na zasolenie u sadzonki kozieradki pospolitej. Cząsteczki AgNP mogą zatem stymulować różnice mechanizmów obronnych roślin przed toksycznością soli (Seyed Saeid Hojjat i Maryam Kamyab 2017)

W literaturze przedmiotu istnieje wiele doniesień potwierdzających korzystny wpływ zastosowania nanocząsteczek na odkażanie materiałów wykorzystywanych w kulturach *in vitro*. Są to dodatkowe zalety, stosowanie nanosrebra w mikronamnażaniu roślin w kulturach *in vitro*. W badaniu Sarmast (2011) określono wpływ nanosrebra pod kątem skutecznej eliminacji zakażeń bakteryjnych na *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* (sosna z Norfolk-Island). Wyniki wykazały, że sterylizacja powierzchniowa, a następnie obróbka 200 mg l^{-1} roztworem nanosrebra, a także zastosowaniu czasu namaczania 180 min, zmniejszyły zanieczyszczenie bakteryjne z 61.5% do 11.3%. Natomiast dodanie 400 mg l^{-1} nanosrebra do pożywki zmniejszyło zanieczyszczenie bakteryjne z 81.25% do 18.75%. (Sarmast 2011).

6. Wnioski

Zastosowanie nanosrebra miało wpływ na wpływ na cechy morfologiczne, takie, jak: długość pędu i korzeni oraz liczbę pąków kwiatowych, u petunii ogrodowej namnażanej w kulturach *in vitro*.

Zastosowanie 2% stężenia nanosrebra działało na petunię ogrodową najbardziej stymulująco.

Działanie nanosrebra jest zależne od dawki.

7. Literatura

- Abdi G, Salehi H, Khosh-Khui M (2008) Nano silver: a novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum* 30(5): 709-714.
- Choi O, Hu, Z (2008) Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental science & technology*. 42(12): 4583-4588.
- Dimkpa C O, McLean J E, Martineau N I in. (2013). Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. *Environmental science & technology*. 47: 1082-1090.
- European Commission (2011) Proactive policy needed to manage nanowaste, News Alert Issue. 27.01.2011.
- Geisler-Lee J, Wang Q, Yao Y, i in. (2012) Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology*. 7(3): 323-337.
- Hojjat, S S, Kamyab M (2017) The effect of silver nanoparticle on Fenugreek seed germination under salinity levels. *Russian agricultural sciences*. 43(1): 61-65.

- Krupa-Małkiewicz M, Ochmian I, Mijowska K, i in. (2017) The effects nano-silver on contamination of spring barley 'Eunova' in vitro. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis seria Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica*. 338: 69-76.
- Krupa-Małkiewicz M, Oszmiański J, Lachowicz S i in. (2019) Effect of nanosilver (nAg) on disinfection, growth and chemical composition of young barley leaves under in vitro. *Journal of Integrative Agriculture* 17(1):60345-7.
- Lee W M, Kwak J I, An Y J (2012) Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*. 86(5): 491-499.
- Miao A J, Schwehr K A, Xu Ci in. (2009) The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environmental pollution*. 157(11): 3034-3041.
- Sadak M S (2019) Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenum-graecum*). *Bulletin of the National Research Centre*. 43(1): 38.
- Sahandi S M, Sorooshzadeh A, Rezazadeh H S, I in. (2011). Effect of nanosilver and silver nitrate on seed yield of borage. *J. Med. Plant. Res.* 5: 706-710.
- Salama H M (2012) Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). *International Research Journal of Biotechnology* 3: 190-197.
- Sarmast M K, Salehi H, Khosh-Khui M (2011) Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* explants. *Acta Biol Hung.* 62(4):477-84.
- Yang L, Watts D J (2005) Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology letters*. 158(2): 122-132.
- Yasur J, Rani P U (2013) Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environmental Science and Pollution Research*. 20(12): 8636-8648.
- Zewde B, Ambaye A, Stubbs III I in. (2016) A review of stabilized silver nanoparticles—Synthesis, biological properties, characterization, and potential areas of applications. *JSM Nanotechnol. Nanomed*, 4(1043): 1-14.

2. Efekt działania kwasu askorbinowego w łagodzeniu skutków stresu wywołanego przez ołów u żyta (*Secale cereale*) linii 541 *in vitro*

The effect of ascorbic acid in alleviating lead stress in rye (*Secale cereale*) line 541 *in vitro*

Bil Weronika, Bienias Anna, Czarnecka Sylwia, Krupa-Małkiewicz Marcelina

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Opiekun naukowy: dr inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz

Bil Weronika: weronika.bil@wp.pl

Słowa kluczowe: metale ciężkie, mikrorozmnazanie, stres abiotyczny, witamina C

Key words: abiotic stress, heavy metal, micropropagation, vitamin C

Streszczenie

Ołów jest jednym z najczęściej występujących metali ciężkich w środowisku. Obiektem badań było określenie wpływu działania egzogenego 1 mM kwasu askorbinowego na cechy morfologiczne żyta (*Secale cereale*) linii 541 w warunkach stresu wywołanego 1 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ w kulturach *in vitro*. Eksplantaty stanowiły zarodki żyta wyłuskane za pomocą igły preparacyjnej z ziarniaków. Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdzono, że ołów miał negatywny wpływ na cechy morfologiczne, takie jak, długość pędu i korzeni oraz świeżą masę siewek. Obecność w pożywce MS 1 mM kwasu askorbinowego łagodziło skutki działania soli ołowiu na wzrost i rozwój siewek żyta. Obecność kwasu askorbinowego w podłożu w warunkach stresu wywołanego przez $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ miało pozytywny wpływ na świeżą masę roślin, a nie wpływało znacząco na liczbę korzeni.

Abstract

Lead (Pb) is the most common heavy metal pollutant in the environment. The objective of the presented study was to investigate the ameliorative effect of exogenous 1 mM ASA on morphological parameters in rye (*Secale cereale*) line 541 seedlings under heavy metal ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) stress *in vitro*. Embryos were excised with a needle from grain and used as an explants. The results showed that lead accumulation in rye seedlings had negative influence on morphological parameters of plant growth, such as shoot and root length. Addition to MS medium 1 mM ASA greatly alleviated Pb-induced growth inhibition. Presence of ASA in the MS medium under heavy metal stress increased plant fresh mass with no significant effect on numbers of root per plant.

1. Wstęp

Wzrastające stężenie jonów metali ciężkich w środowisku stanowi poważne zagrożenie dla produkcji rolniczej, a także dla zdrowia człowieka. Rozwój przemysłu i motoryzacji przyczynił się w znacznym stopniu do zwiększenia zawartości metali ciężkich w biosferze. Do grupy pierwiastków będących potencjalnymi czynnikami toksycznymi dla roślin należą metale ciężkie (o gęstości powyżej 5 g cm⁻³) takie, jak: chrom (Cr), kobalt (Co), nikiel (Ni), miedź (Cu), cynk (Zn), molibden (Mo), kadm (cd), rtęć (Hg) i ołów (Pb) (Ozygit i in. 2016). Metale ciężkie pobierane są przez rośliny w postaci jonowej. Szkodliwość działania jonów metali wynika z ich interakcji z funkcyjnymi grupami cząsteczek wchodzących w skład komórek, a w szczególności białek (grupy SH) i polinukleotydów (Borovik 1990). Efektem tych zjawisk może być słabszy wzrost i rozwój rośliny, a nawet jej obumarcie.

Jednym z powszechnie występujących metali ciężkich jest ołów (Pb). Głównymi źródłami ołowiu mogą być: wybuchy, erozja skał, pożary lasów. Ponad 70% ołowiu znajdującego się w roślinach ma pochodzenie atmosferyczne. Ołów inaktywuje podstawowe dla metabolizmu enzymy, narusza równowagę elektrolityczną, zaburza transport elektronów w mitochondriach i podczas fotosyntezy. Jest sprawcą stresu oksydacyjnego i powstawania wolnych rodników. Wolne

rodniki jako reaktywne formy tlenu prowadzą do zakłóceń wzrostu i rozwoju roślin. Ich duże stężenie powoduje uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne komórek. Jednym z następstw stresu oksydacyjnego jest peroksydacja lipidów, a także zaburzenia w syntezie barwników fotosyntetycznych takich, jak chlorofil a i b oraz barwników niefotosyntetycznych - karotenoidów (Sędzik i in. 2015).

Niektóre z roślin mają zdolność do akumulowania wysokich stężeń ołowiu w komórkach i tkankach. Wśród nich, szczególną grupę stanowią tzw. hyperakumulatory. Znanych jest obecnie ponad 400 gatunków hyperakumulatorów. Najwięcej z przebadanych roślin hyperkumuluje nikiel, zaś najmniej - najbardziej toksyczne pierwiastki balastowe takie, jak kadm i ołów (Siedlecka i in. 2001). Do hyperakumulatorów zaliczono między innymi kukurydzę, która może być wykorzystywana do fitoremediacji terenów skażonych (Nosalewicz i in. 2008).

Rośliny różnią się znacznie poziomem tolerancji na działanie metali ciężkich. Różnice te mają charakter nie tylko międzyrodzajowy, ale także i międzypopulacyjny. Stąd też, indukowanie tolerancji na tego rodzaju stres u roślin ma bardzo duże znaczenie z punktu widzenia ekonomicznego. Można to osiągnąć poprzez stosowanie różnego rodzaju zabiegów agrofizycznych lub środków chemicznych takich, jak regulatory wzrostu, związki o działaniu antyoksydacyjnym, czy też nawozy mineralne.

Jedną z metod, która pozwala na sprawdzenie jak roślina poradzi sobie w warunkach stresu metali ciężkich są kultury *in vitro*. Pozwalają one w szybki sposób, bez względu na warunki pogodowe i porę roku, określić zdolność namnażania roślin w niekorzystnych warunkach środowiskowych (Krupa-Małkiewicz i in. 2018). Technologię roślinnych kultur tkankowych i komórkowych wykorzystuje się na szeroką skalę. Jest to najbardziej wydajny, jak i zarazem w pełni kontrolowany proces namnażania roślin. Eksplantatami mogą być fragmenty roślin lub pojedyncze komórki z nieuszkodzonym materiałem genetycznym. Poprzez możliwość dodania do podłoża różnych związków (stresujących, czy też substancji biologicznie czynnych), można prowadzić badania na poziomie fizjologicznym, genetycznym, czy biochemicznym, na każdym etapie rozwoju rośliny (Krupa-Małkiewicz i in. 2019).

Jedną z substancji biologicznie czynnych stosowanych jako dodatek do podłoża w kulturach *in vitro* jest kwas askorbinowy. Kwas askorbinowy (witamina C, ASA) jest związkiem naturalnie występującym w komórkach roślinnych. Najwięcej kumuluje się go w liściach i kwiatach (Smimoff i in. 2001; Ebrahim 2005). ASA ma pozytywny wpływ na wzrost i rozwój roślin. Jest niezbędnym kofaktorem na szlaku przemian wielu reakcji enzymatycznych. Reguluje proces fotosyntezy, transport elektronów przez błony komórkowe, wzrost systemu korzeniowego, a także podziały komórkowe. Wykazuje wysokie właściwości antyoksydacyjne i jest szczególnie aktywny podczas działania czynników stresowych na roślinę (Guo i in. 2005; Athar i in. 2008; Sędzik i in. 2015; Moghadam 2016). Ponadto, kwas askorbinowy nie wykazuje toksycznego działania na rośliny i jest rozpuszczalny w wodzie (Krupa-Małkiewicz i in. 2015; Sędzik i in. 2019). Stąd też, w literaturze przedmiotu wiele jest doniesień na temat zastosowania kwasu askorbinowego jako środka pomagającego łagodzić skutki działania stresu środowiskowego na roślinę (Athar i in. 2008; Al-Hakimi i Hamada 2011; Venkatesh i Park 2014; Krupa-Małkiewicz i in. 2018).

Żyto (*Secale cereale*) jest jednym z podstawowych zbóż uprawianych w Europie. Wysoki potencjał plonowania powoduje, że obszar uprawy żyta ciągle się zwiększa. Żyto należy do rodziny *Triticaceae*, jest dzikim gatunkiem wywodzącym się głównie ze środkowej i wschodniej Turcji, a także sąsiadujących z nią rejonów. Jest stosowana jako roślina okrywowa w celu poprawy żyzności i jakości gleby, a także w celu ochrony pól uprawnych przed rozprzestrzenianiem się chwastów (Ozyigit i in. 2016; Krupa-Małkiewicz i in. 2019).

Celem badań było określenie skutków działania 1 mM azotanu ołowiu – $Pb(NO_3)_2$ na parametry morfologiczne siewek żyta linii 541 oraz określenie wpływu 1 mM kwasu askorbinowego w łagodzeniu stresu wywołanego działaniem ołowiu w kulturach *in vitro*.

2. Materiał i metody badań

Doświadczenie przeprowadzono w Laboratorium Kultur Tkankowych Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego

w Szczecinie. Materiał badawczy stanowiły ziarniaki żyta (*Secale cereale*) linii wsobnych 541. Nasiona poddane były ocenie wrażliwości na obecność 1 mM Pb(NO₃)₂ oraz stopniu niwelowania toksyczności tego pierwiastka poprzez zastosowanie substancji biologicznie czynnej 1 mM kwasu askorbinowego (ASA).

Nasiona żyta poddano dezynfekcji wstępnej poprzez moczenie w 70% roztworze alkoholu etylowego przez 30 sekund. Po tym czasie nasiona wypłukano sterylną dejonizowaną wodą i poddano dezynfekcji właściwej. W tym celu zastosowano 10% roztwór podchlorynu sodu (NaOCl), w którym moczone materiały przez 15 minut. Następnie nasiona ponownie przepłukano trzykrotnie dejonizowaną sterylną wodą i pozostawiono w wodzie na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie z ziarniaków przy pomocy igły preparacyjnej, wyłuskivano zarodki, które ponownie poddano dezynfekcji. Zarodki moczone w 5% roztworze podchlorynu sodu przez 10 minut. Po tym czasie, płukano je trzykrotnie sterylną dejonizowaną wodą i wykładano na wcześniej przygotowane podłoże.

W doświadczeniu zastosowano podłoże o składzie makro- i mikroelementów MS (Murashige i Skoog 1962) w następujących kombinacjach: MS+1 mM Pb(NO₃)₂; MS+1 mM ASA; MS+1 mM Pb(NO₃)₂ + 1 mM ASA. Kontrolę w doświadczeniu stanowiła pożywka MS bez żadnych dodatków. Tak przygotowane podłoże poddano autoklawowaniu w temperaturze 121°C, ciśnieniu 0.1 MPa w czasie 19 minut.

Do słoików o pojemności 300 ml, wypełnionych 30 ml pożywki MS w różnych kombinacjach, wykładano po 4 zarodki żyta. Prace prowadzono w pokoju szczyptień pod komorą z laminarnym przepływem powietrza. Następnie kultury inkubowano w fitotronie, przy stałych warunkach fizycznych takich, jak: temperatura ±24°C, natężenie światła 40 μm⁻¹ s⁻² i 16-godzinnym oświetleniu. Po 4 tygodniach dokonano pomiarów cech morfologicznych, określając: długość siewek i korzeni, liczbę korzeni oraz świeżą masę siewek.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, wykorzystując analizę wariancji jednoczynnikowej oraz test Tukey'a dla średnich. Różnice pomiędzy badanymi cechami oszacowano na poziomie istotności α_{0,01} dla wysoce istotnych różnic oraz α_{0,05} dla różnic istotnych.

3. Wyniki i dyskusja

Zboża pełnią bardzo istotną funkcję w diecie człowieka i zwierząt (Paznocht i in. 2018). Jednym z powszechnie uprawianych zbóż jest żyto (*Secale cereale*), ze względu na dużą dostępność, niewielkie koszty uprawy i wysokie możliwości wykorzystania w wielu gałęziach przemysłu.

Tab.1. Średnie wartości badanych cech morfologicznych żyta (*Secale cereale*) linii wsobnej 541 namnażanych w kulturach *in vitro* na pożywce MS z dodatkiem kwasu askorbinowego oraz soli Pb(NO₃)₂.

Podłoże	Długość siewek [cm]	Długość korzeni [cm]	Długość korzeni [cm]	masa [mg]
MS – kontrola	7.98a	0.5b	1.9a	58.65a
MS+1mM ASA	1.53c	2.18a	1.0a	30.98b
MS+1mM Pb(NO ₃) ₂	1.08c	2.6a	1.33a	20.12b
MS+1mM ASA+1mM Pb(NO ₃) ₂	4.32b	2.8a	2.0a	43.78a

Toksyczne działanie metali ciężkich zależy od ich stężenia oraz zdolności tworzenia kompleksów soli w podłożu, a także gatunku roślin. Toksyczny poziom Pb u roślin powoduje poważne uszkodzenia na poziomie komórkowych, zaburzenia w przebiegu procesu fotosyntezy a także przebiegu podstawowych reakcji metabolicznych u roślin (Ozyigit i in. 2016).

W niniejszych badaniach obserwowano negatywny wpływ soli Pb(NO₃)₂ na rośliny żyta (Tab. 1).

Przeprowadzona analiza wariancji testem Tukey'a wykazała istotne różnice w długości siewek i korzeni oraz masie siewek żyta. Nie obserwowano natomiast istotnie statystycznych różnic

w liczbie korzeni. Dodatek do podłoża roztworu $Pb(NO_3)_2$ zahamował wzrost siewek żyta, które w porównaniu do kontroli były niższe o 86.5% (Ryc.1). Przy czym, dodatek do pożywki MS z ołowiem kwasu askorbinowego złagodził efekt działania stresu. Siewki z tej kombinacji pożywek były czterokrotnie dłuższe w porównaniu do siewek z pożywki MS z dodatkiem ołowiu. W przypadku długości korzeni, dodatek do podłoża kwasu askorbinowego i/lub ołowiu wpłynął stymulująco na wydłużanie korzeni, które były dłuższe od kontroli trzykrotnie (Tabela 1).

Natomiast, na podstawie otrzymanych wyników nie stwierdzono wpływu zarówno kwasu askorbinowego, jak i ołowiu na liczbę korzeni siewek żyta. Zaobserwowano jednakże, że obecność ołowiu w podłożu MS ponad dwukrotnie obniżyła masę badanych siewek żyta. Dodatek do pożywki MS+1mM $Pb(NO_3)_2$ 1mM roztworu kwasu askorbinowego wpłynęło stymulująco na masę siewek, która wzrosła o ponad 100% w porównaniu do masy siewek na pożywce MS z dodatkiem 1mM $Pb(NO_3)_2$.



Rys.1. Siewki żyta (*Secale cereale*) linii wsobnej 541 po 4 tygodniach na pożywkach z dodatkiem kwasu askorbinowego, soli $Pb(NO_3)_2$, kwasu askorbinowego i soli $Pb(NO_3)_2$.

Podobne do badań własnych wyniki uzyskali Krupa-Mańkiewicz i in. (2018) u goji, w których obserwowali hamujący wpływ dodatku 1 mM roztworu $Pb(NO_3)_2$ na długość pędów i korzeni oraz liczbę korzeni u badanych eksplantatów. Natomiast zastosowanie 1 mM ASA do pożywki z ołowiem miało wpływ stymulujący na badane cechy morfologiczne. Podobnie, hamujący wpływ ołowiu na wzrost roślin pszenicy zaobserwował Lamhamdi i in. (2011) po zastosowaniu 3 mM roztworu soli $Pb(NO_3)_2$. Boroumand Jazi i in. (2001) opisał, że wraz ze wzrostem stężenie roztworu $Pb(NO_3)_2$ z 0 do 2 mM w pożywce, malała także długość pędów i korzeni *Brassica napus* var. Okapi. Natomiast Ozyigit i in. (2016) zastosowali roztwór soli $Pb(NO_3)_2$ w stężeniach 0, 100, 200 i 400 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ u żyta. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono negatywny wpływ ołowiu na barwniki fotosyntetyczne takie, jak chlorofil a i b oraz karotenoidy w siewkach żyta. Ponadto, obecność ołowiu w podłożu wywołała także zmiany na poziomie genotypowym. Dodatek kwasu nikotynowego w stężeniach 25 – 100 μM w łagodzeniu skutków stresywołanego obecnością ołowiu w podłożu MS stosowali Sędzik i in. (2019) u jęczmienia odmiany Eunova. Uzyskane wyniki również potwierdziły negatywny wpływ soli $Pb(NO_3)_2$ na wzrost siewek jęczmienia w kulturach *in vitro*. Dodatek 2 mM $Pb(NO_3)_2$ do pożywki MS spowodował redukcję wzrostu siewek o 78% i korzeni o 65% w porównaniu do kontroli.

Według Nagajyoti i in. (2010) na hamowanie tempa wzrostu roślin ma w dużym stopniu wpływ zastosowane stężenie ołowiu, a także pH podłoża. Jony ołowiu hamują proces wydłużania i namnażania komórek, a także hamują procesy metaboliczne zachodzące w roślinach, co w znacznym stopniu przyczynia się do hamowania wzrostu pędów i korzeni (Nagajyoti i in. 2010; Boroumand Jazi i in. 2011).

4. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia można stwierdzić, że nawet niskie stężenie (1 mM) soli $Pb(NO_3)_2$ w podłożu zaburza prawidłowy wzrost roślin. Szczególnie wrażliwe na działanie jonów metali ciężkich (ołowiu) są pędy i korzenie siewek żyta linii 541. Ponadto, zaobserwowano znaczny spadek świeżej masy badanych roślin. Natomiast dodatek do pożywki MS ołowiu nie wpływał statystycznie istotnie na liczbę korzeni żyta. Obecność w pożywce MS 1 mM kwasu askorbinowego może łagodzić skutki stresu wywołanego przez ołów u siewek żyta w kulturach *in vitro*.

5. Literatura

- Al-Hakimi ABM, Hamada AM (2011) Ascorbic acid, thiamine or salicylic acid induced changes in some physiological parameters in wheat grown under copper stress. *Plant Protection Science* 47:92-108
- Athar H, Khan A, Ashraf M (2008) Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt induced oxidative stress in wheat. *Environmental and Experimental Botany* 63:224-231
- Borovik AS (1990) Characterisation of metal ions in biological systems. [W:] Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. Press Inc. Boca Raton, Florida: 3
- Boroumand Jazi Sh, Lari Yazdi H, Ranjbar M (2011) Effects of salicylic acid on some plant growth parameters under lead stress in *Brassica napus* var. Okapi. *Iranian Journal of Plant Physiology* 1(3): 177–185
- Ebrahim MK (2005) Amelioration of sucrose- metabolism and yield changes, in storage roots of NaCl-stressed sugarbeet, by ascorbic acid. *Agrochimica* 49(3-4): 93-103
- Guo Z, Tan H, Zhu Z, Lu S, Zhou B (2005) Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate biosynthesis of rice and in relation to its stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(10): 955-962
- Krupa-Mańkiewicz M, Smolik B, Ostojski D I in. (2015) Effect of ascorbic acid on morphological and biochemical parameters in tomato seedling exposure to salt stress. *Environmental Protection and Natural Resource* 25(2): 1-5
- Krupa-Mańkiewicz M, Kruczek A, Pelc J I in. (2018) Alleviating effects of ascorbic acid on lead toxicity in goji (*Lycium barbarum*) *in vitro*. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis, Agricultura, Alimentaria, Piscaria, Zootechnica* 340(45)1: 55–64
- Krupa-Mańkiewicz M, Oszmiański J, Lachowicz S, i in. (2019) Effect of nanosilver (nAg) on disinfection, growth and chemical composition of young barley leaves under *in vitro*. *Journal of Integrative Agriculture* 18(8): 1871-1881
- Lamhamdi M, Bakrim A, Aarab A. i in. (2011) Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *Comptes Rendus Biologies* 334: 118–126
- Moghadam H.R.T. (2016) Application of super absorbent polymer and ascorbic acid to mitigate deleterious effects of cadmium in wheat. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 46(1): 9-18
- Muraschige T, Skoog F (1962) A revised medium, for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-479
- Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8: 199–216
- Nosalewicz A, Kosynets O, Nosalewicz M (2008) Effect of various concentrations of lead and cadmium on early growth of maize. *Acta Agrophysica* 11(3): 715-723

- Ozyigit II, Dogan I, Igdelioglu S i in. (2016) Screening of damage induced by lead (Pb) in rye (*Secale cereale* L.) – a genetic and physiological approach. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 30(3): 489-496
- Paznocht L, Kotiková Z, Šulc M I in. (2018) Free and esterified carotenoids in pigmented wheat, tritordeum and barley grains. *Food Chemistry* 240: 670-678
- Sędzik M, Smolik B, Krupa-Mańkiewicz M (2015) Effect of lead on germination and some morphological and physiological parameters of 10-day-old seedlings of various plant species. *Environmental Protection and Natural Resource* 26(3): 22-27
- Sędzik M, Smolik B, Krupa-Mańkiewicz M (2019) Effect of nicotinamide in alleviating stress caused by lead in spring barley seedling. *Journal of Elementology* 24(1): 281-291
- Smimoff N, Conklin P, Loewus FA (2001) Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:437-440
- Venkatesh J, Park S (2014) Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies* 55:38.

3. Zastosowanie kwasu askorbinowego do łagodzenia skutków stresu wywołanego przez ołów u estragonu (*Artemisa dracunculus*) w kulturach *in vitro*

Use of ascorbic acid in alleviating the effects of stress caused by lead in estragon (*Artemisa dracunculus*) in *in vitro* culture

Bernaciak Mateusz⁽¹⁾, Bil Weronika⁽¹⁾, Dyguś Szymon⁽¹⁾, Pelc Justyna⁽²⁾, Krupa-Małkiewicz Marcelina⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁽²⁾Katedra Bioinżynierii, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: dr inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz

Bil Weronika: weronika.bil@wp.pl

Słowa kluczowe: estragon, mikrorozmnażanie, metale ciężkie, witamina C

Key words: estragon, heavy metal, micropropagation, vitamin C

Streszczenie

Prowadzenie badań przy użyciu metody kultur *in vitro* odgrywa kluczową rolę w naukach przyrodniczych m. in. ze względu na niski koszt wykonywania takich badań. Dzięki takim metodom jesteśmy w stanie, w kontrolowanych warunkach, sprawdzić działanie różnych czynników środowiskowych na daną roślinę, bądź jej fragment w postaci tkanek, komórek lub organów. Stąd też, celem badań było określenie wpływu kwasu askorbinowego na stres wywołany obecnością ołowiu w pożywce na wzrost kultur pędowych estragonu. Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe estragonu (*Artemisia dracunculus*) otrzymane z ustabilizowanej kultury *in vitro*. W doświadczeniu zastosowano cztery różne kombinacje pożywek MS (Murashige i Skoog 1962). Próbę kontrolną stanowiła pożywka MS bez żadnych dodatkowych składników. W doświadczeniu zastosowano kombinacje pożywek MS, które zawierały dodatek kwasu askorbinowego w stężeniu 1mM, pożywki MS z dodatkiem ołowiu w stężeniu 1mM oraz pożywki MS z dodatkiem 1mM kwasu askorbinowego + 1mM ołowiu. Ekplantaty estragonu o długości ok. 2cm wykładano po cztery do słoików o pojemności 300ml, uzupełnianych po 30 ml pożywki, a następnie próby inkubowano w fitotronie przez okres 4 tygodni.

Na podstawie otrzymanych wyników badań, stwierdzono, że zastosowanie kwasu askorbinowego miało pozytywny wpływ na łagodzenie stresu wywołanego przez ołów. Zastosowany czynnik stresowy spowodował wydłużenie pędów i korzeni w porównaniu do pożywki kontrolnej.

Abstract

Conducting research using the *in vitro* culture method plays a key role in natural sciences, among others due to the low cost of performing such tests. Using such methods, we are able to check, under controlled conditions, the effects of various environmental factors on a plant growth, its fragment in the form of tissues, cells or organs. For this reason, the purpose of our research was to try to determine the effect of ascorbic acid on the stress caused by the presence of lead in the medium used for *in vitro* culture. The research material were estragon shoot explants (*Artemisia dracunculus*) obtained from a stable *in vitro* culture. In the experiment, we used four different combinations of MS medium (Murashige and Skoog 1962). The control was MS medium without any additional ingredients, the second type combination was MS medium contained 1mM ascorbic acid, 1mM of lead was added to the third combination of medium, and the fourth - had 1mM ascorbic acid + 1mM lead. Tarragon explant about 2 cm long was put into four 300 ml jars, supplemented with 30 ml of medium suitable for the given group, and then the samples were incubated in a phytotron for about 6 weeks. After analyzing the obtained test results, it was found that the use of a combination of ascorbic acid and lead had a positive effect on the length of the shoot and roots, as well as the number of roots.

1. Wstęp

Rodzina *Anthemideae* zawiera ponad 1400 gatunków. Jednym z nich jest estragon (bylica draganek) jest bardzo znaną i powszechnie używaną rośliną, należąca do rodziny roślin astrowatych. Dziko występujące w Azji, Europie i Ameryce Północnej (Shultz i Leila 2006). Kwiaty są najczęściej barwy białej lub żółtej. Kwitnie od lipca do października. Estragon jest wieloletnią byliną o stosunkowo twardej i wysokiej na 150 cm łodydze. Jego kłęczce w miarę wzrostu drewnieje. Posiada lekko zwisające z delikatnie zaostrozonymi końcami liście, niepodzielne o długości 1-4 cm. Określenie „estragon” wywodzi się od łacińskiego „draco”, oznaczającego „węża”. Ziele zawdzięcza swoją oryginalną nazwę charakterystycznemu układowi korzeni, który przypomina kształtem groźnego gada. Estragon ma właściwości przeciwutleniające, które mogą pomóc zneutralizować działanie wolnych rodników. Olej estragonowy pomaga zatrzymać lub zmniejszyć szkody, jakie mogą powodować te rodniki. W medycynie ludowej estragon był szeroko stosowany jako pomoc w bólach zębów. Starożytni Grecy żuli go ze względu na jego zdolność do odrętwienia ust. Ten efekt uśmierzający ból wynika z wysokiego poziomu eugenolu w roślinie. Jest to ten sam związek łagodzący ból zawarty w olejku goździkowym. Udowodniono również, że estragon może również pomóc zmniejszyć ból dziąseł, które często występują wraz z bólami zęba (Charles 2012). Ziele jest używany jako przyprawa do gotowania lub spożywany na surowo, może pomóc ludziom, którzy mają słaby apetyt z powodu wieku lub choroby. Estragon od dawna stosowany jest jako tonik trawienny, ponieważ pomaga w produkcji żółci przez wątrobę.

Stosowano go również w tradycyjnych środkach ludowych do pozbycia się wewnętrzności robaków jelitowych. Estragon może być stosowany jako łagodny środek uspokajający, aby złagodzić lęk i stres. Jest również korzystny w promowaniu dobrego snu (Aglarova 2008)

Roślina ta jest bogata w potas i beta-karoten będący prekursoem witaminy A. Ostatnie badania wykazały, że estragon, głównie rosyjska odmiana, pomaga zwiększyć wchłanianie kreatyny w mięśniach (Jaeger 2011). Jest to podobne do wchłaniania kreatyny w mięśniach, które występuje po spożyciu dużych ilości węglowodanów. Estragon daje ten sam efekt, spożywanie dużych ilości węglowodanów nie jest już konieczne do zwiększenia masy mięśniowej.

W uprawie konwencjonalnej wiele gatunków roślin medycznych trudno się namnaża. Stąd też, w celu zapewnienia stałości genetycznej populacji wykorzystuje się roślinne kultury *in vitro* (Krupa-Małkiewicz i Zieliński 2013). Kultury *in vitro* pozwalają uzyskać dużą liczbę wyrównanego genotypowo i fenotypowo materiału. Ponadto, metodą tą wykorzystuje się także do otrzymywania metabolitów wtórnych bez konieczności regeneracji całej rośliny.

Dużym problemem jest uprawa roślin na terenach o wysokim stężeniu metali ciężkich w glebie. Szczególnie powszechnie występującym pierwiastkiem jest ołów (Pb). Obecność tego pierwiastka w glebie dla wielu gatunków roślin stanowi poważny problem w wegetacji i plonowaniu (Krupa-Małkiewicz i in. 2018). Ołów jest pobierany przez rośliny z podłoża przez system, korzeniowy i częściowo przez liście (Boroumand Jazi i in. 2011). Według Ruley i in. (2004) i Boroumand Jazi i in. (2011) stężenie ołowiu w glebie powyżej 30 ppm wykazuje działanie toksyczne dla wielu gatunków roślin uprawnych. Ponadto, może znacznie obniżyć zdolność kiełkowania, wzrost siewek, a także znacznie obniża index tolerancji, suchą masę korzeni i pędów. Jego obecność w podłożu ma także negatywne oddziaływanie na procesy metaboliczne zachodzące w roślinie, przede wszystkim znacznie ograniczając zdolność asymilacji CO₂ (Yang i in. 2011). Wzrost stężenia ołowiu w tkankach roślinnych powoduje nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ROS), zmiany w strukturze budowy membran lipidowych (Najeeb i in. 2017).

Jedną z możliwych strategii pozwalających złagodzić skutki negatywnego działania soli Pb(NO₃)₂ w podłożu jest zastosowanie substancji biologicznie czynnych. Jedną z nich są witaminy, które wykazują wysokie właściwości antyoksydacyjne (Krupa-Małkiewicz i in. 2018). Witaminy są także niezbędnymi składnikami potrzebnymi do prawidłowego wzrostu i rozwoju organizmów. Ponadto, są kofaktorami wielu reakcji enzymatycznych zachodzących w roślinach (Azooz i in. 2013). Kwas askorbinowy należy do grupy związków organicznych o wysokiej aktywności antyoksydacyjnej. Zastosowanie kwasu askorbinowego w łagodzeniu skutków stresu

środowiskowego wykazano u wielu gatunków roślin uprawnych, między innymi u *Vicia faba* (Younis i in. 2010), słonecznika (Bybordi 2012) oraz u pomidora i goji (Krupa-Małkiewicz i in. 2015; 2018).

Stąd też, celem niniejszej pracy było określenie wpływu kwasu askorbinowego na łagodzenie skutków stresu wywołanego ołowiem u estragonu w kulturach *in vitro*.

2. Materiał i metody

Doświadczenie zostało przeprowadzone w laboratorium kultur *in vitro* Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiałem badawczym były eksplantaty estragonu otrzymane z ustabilizowanej kultury *in vitro*. Pierwszym etapem było otrzymanie odpowiedniej liczby eksplantatów.

W doświadczeniu zastosowano pożywki według składu makro- i mikroelementów Murashige i Skoog (1962). W tym celu przygotowano 4 kombinacje pożywek MS. Próbę kontrolną stanowiła pożywka MS bez żadnych dodatkowych ingredientów. Pożywki selekcyjne zawierały dodatek 1 mM kwasu askorbinowego, 1mM roztworu $Pb(NO_3)_2$, a także 1mM kwas askorbinowy + 1mM roztworu $Pb(NO_3)_2$. pH wszystkich pożywek ustabilizowano na poziomie 5.7. Przygotowane pożywki poddano procesowi autoklawowania przez 19 min w 121° C i ciśnieniu 0.1MPa. Eksplantaty estragonu o długości 2cm wykładano po 4 sztuki do słoików o pojemności 300ml, uzupełnionych 30ml odpowiedniej kombinacji pożywki. Doświadczenie założono w 5 powtórzeniach po 4 rośliny w każdym słoiku. Szczepienie eksplantatów przeprowadzano pod komorą z laminarnym przepływem powietrza, w celu zapewnienia sterylnych warunków pracy. Tak przygotowane kultury inkubowano w fitotronie o temperaturze 21°C, 16 godzinnym oświetleniu ($40\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) przez 6 tygodnie.

Po 6 tygodniach dokonano pomiarów cech morfologicznych takich, jak: wysokość roślin (cm), liczba nowych pędów na roślinie, długość (cm) i liczba korzeni, świeża masa (g) oraz dokonano dokumentacji fotograficznej. Otrzymane wyniki badań opracowano statystycznie. Wykorzystano analizę wariancji jednoczynnikowej oraz test Tukey'a dla średnich. Różnice pomiędzy badanymi cechami szacowano na poziomie istotności $\alpha_{0,01}$ dla różnic wysoce istotnych i $\alpha_{0,05}$ dla różnic istotnych.

3. Wyniki i dyskusja

Zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego ołowiem jest rozpatrywane w skali globalnej. Rośliny absorbują ołów z roztworu w glebie przez korzenie, a następnie największą część Pb^{2+} gromadzi się w korzeniach w postaci nierozpuszczalnej. Akumulacja ołowiu w roślinach wzrasta wraz ze wzrostem egzogenne poziomu ołowiu. Ołów może powodować szeroki zakres zaburzeń fizjologicznych i biochemicznych. W przedstawionej pracy zbadano możliwość wykorzystania substancji biologicznie czynnej – kwasu askorbinowego, w łagodzeniu skutków wywoływanych przez działanie metali ciężkich. Kwas askorbinowy jest kumulowany w różnych częściach roślin jednak jego najwyższą koncentracją charakteryzują się liście. Oprócz właściwości antyoksydacyjnych witamina C indukuje także syntezę białek odpornościowych i inne komponenty obrony chemicznej u roślin. Związek ten jest szeroko stosowany do przeciwdziałania negatywnym wpływom zasolenia u roślin (Sajid and Aftab 2009; Bybordi 2012; SaeidiSaret al. 2013; Agami 2014).

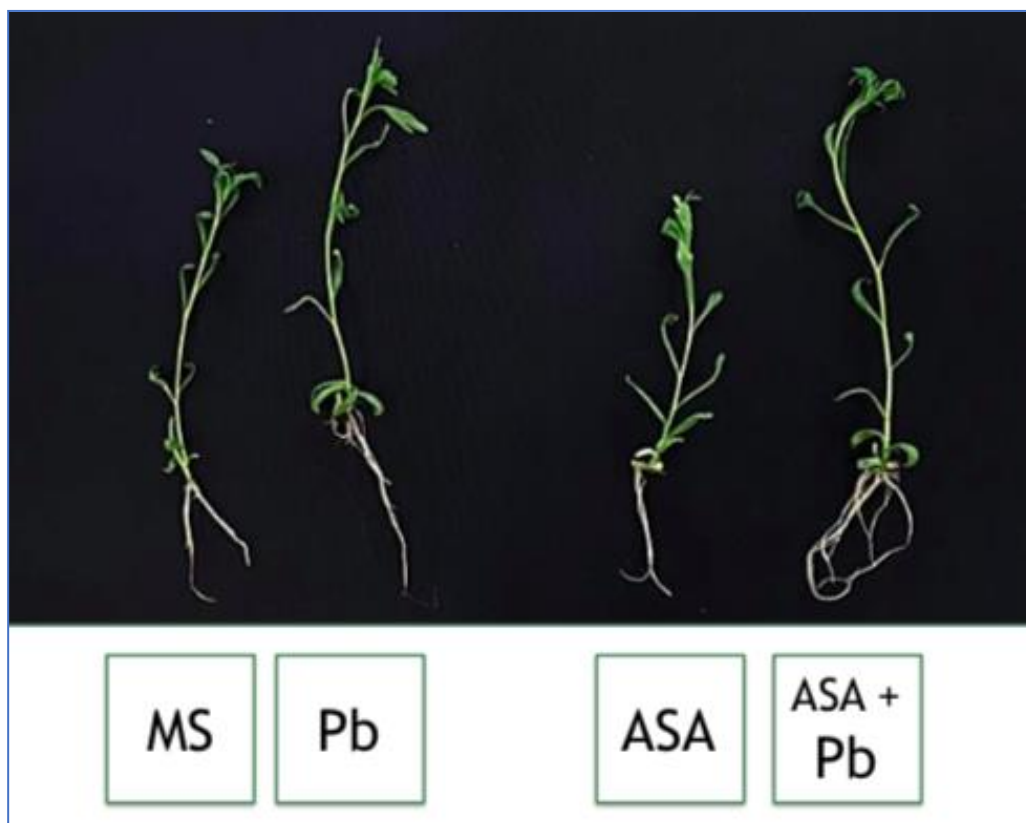
Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji jednoczynnikowej wykazano istotny wpływ zastosowanych kombinacji pożywek na takie cechy, jak liczbę korzeni i ich długość (Tab. 1).

Dodatek do podłoża MS 1 mM $Pb(NO_3)_2$ wykazywał działanie stymulujące na wzrost pędów estragonu w porównaniu do roślin z pożywki kontrolnej. Jednakże, zaobserwowano, że dodatek z kolei 1mM kwasu askorbinowego hamował wzrost pędów. Ich długość zmniejszyła się 16% w porównaniu do kontroli (3.03cm). Najbardziej istotne statystycznie różnice zaobserwowano w przypadku długości i liczby korzeni estragonu. W porównaniu do kontroli (3.95cm) długość korzeni badanych eksplantatów zmniejszyła się o 23% (po zastosowaniu 1mM kwasu askorbinowego wraz z 1mM $Pb(NO_3)_2$) do 67% (w przypadku zastosowania pożywki MS uzupełnionej 1mM kwasem askorbinowym) (Tab. 1). Natomiast liczba korzeni była istotnie statystycznie wyższa u roślin na pożywce MS z dodatkiem 1mM kwasu askorbinowego wraz z 1mM $Pb(NO_3)_2$ i wynosiła 3.8 w porównaniu do kontroli – 2.75. Jednakże, w przypadku długości, jak

i liczby korzeni zaobserwowano, że dodatek kwasu askorbinowego wykazywał działanie hamujące na badane cechy. Przeprowadzona analiza wariancji nie wykazała natomiast statystycznie istotnych różnic w liczbie pędów na jednej roślinie, a także świeżej masie.

Tab. 1. Średnie wartości badanych cech morfologicznych roślin estragonu (*Artemisa dracunculus*) namnażanych w kulturach *in vitro* na pożywce MS z dodatkiem ołowiu i kwasu askorbinowego.

Rodzaj pożywki	Wysokość rośliny (cm)	Liczba pędów	Długość korzeni (cm)	Liczba korzeni	Masa (g)
Kontrola	3.03a	1.50a	3.95a	2.75b	0.12a
Pożywka MS +1mMASA	2.54b	1.22a	1.29c	1.67c	0.12a
Pożywka MS +1mM Pb(NO ₃) ₂	3.51a	1.56a	2.96b	3.38a	0.22a
Pożywka MS+1mM ASA+1mM Pb(NO ₃) ₂	3.61a	1.46a	3.06b	3.80a	0.16a



Rys.1 Kultury pędowe estragonu (*Artemisa dracunculus*) po 6 tygodniach na pożywkach z dodatkiem ołowiu, kwasu askorbinowego, kwasu askorbinowego i ołowiu oraz próba kontrolna.

Podobne do badań własnych wyniki uzyskali Krupa-Mańkiewicz i in. (2019) u goji. Zaobserwowano, że dodatek do pożywki MS 1mM kwasu askorbinowego wraz z 1mM Pb(NO₃)₂ spowodował wzrost długości pędów i korzeni o 31% i 74.5% w porównaniu do goji z pożywki selekcyjnej (MS+1mM Pb(NO₃)₂). Ponadto, liczba korzeni eksplantatów na pożywce MS z kwasem

askorbinowym i ołowiem była najwyższa i wynosiła 2. Lamhamdi i in. (2011) zastosował w swoich badaniach u pszenicy ołów w stężeniu 3mM Pb(NO₃)₂. Dawka ta okazała się być toksyczna dla badanych roślin i mocno ograniczyła ich wzrost. Natomiast Boroumand Jazi i in. (2001) wykazał, że wzrost stężenia Pb(NO₃)₂ w podłożu z 0 do 2mM znacznie obniżało długość pędów i korzeni u roślin *Brassica napus* var. Okapi w porównaniu do kontroli. Według Nagajyoti i in. (2010) hamowanie wzrostu korzeni u roślin jest w dużym stopniu uzależnione od stężenia ołowiu i pH pożywki. Ponadto, może to również wynikać z negatywnego działania ołowiu na podziały komórek korzeni co przyczynia się do ograniczenia ich wzrostu.

Ołów hamuje świeżą masę soi o 35% (*Glycine max* L.). Metal ciężki obniżył tempo fotosyntezy, a także zmniejszył przyrost świeżej masy strąków (Chi-Ying Huang 1974). Kastori (1998) badał wpływ różnych stężeń ołowiu (Pb) na wzrost, zawartość Pb i chlorofilu a+b, fluorescencję chlorofilu i parametry gaszenia w liściach młodych roślin słonecznika (*Helianthus annuus* L.). Zawartość Pb w analizowanych częściach roślin wzrosła po wzroście zawartości Pb w pożywce. Wzrost ten wykazano w większym stopniu w korzeniach niż w łodygach i liściach. W obecności wysokiego stężenia Pb w liściach zaobserwowano spadek suchej masy i zahamowanie wzrostu roślin. Działanie ołowiu na rośliny słonecznika doprowadziło do wyraźnego zmniejszenia zawartości chlorofilu (a + b), któremu towarzyszy znacznie mniejszy spadek wskaźnika oceny fotosyntezy.

4. Wnioski

Ołów jest metalem ciężkim, który powoduje stres roślin, przez co wpływa niekorzystnie na wzrost roślin, wzrost korzeni i przyrost świeżej masy roślin. Wyniki przedstawione w niniejszym doświadczeniu wykazały, że nawet najniższe stężenie roztworu soli Pb(NO₃)₂ wykazuje działanie inhibujące na cechy morfologiczne roślin estragonu namnażanego w kulturach *in vitro*. Szczególnie narażone na działanie stresu wywołanego działaniem metali ciężkich były korzenie. Dodatek do pożywki substancji biologicznie czynnej, jakim był kwas askorbinowy, wykazało pozytywny wpływ w łagodzeniu skutków działania zastosowanego czynnika stresowego. Zatem zastosowanie kwasu askorbinowego może być stanowić potencjalny źródło minimalizowania negatywnych skutków działania ołowiu na rośliny estragonu.

5. Bibliografia

- Agami RA (2014) Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. *Biologia Plantarum* 58 2: 341-347.
- Aglarova A M, Zilfikarov I N, Severtseva O V (2008) Biological characteristics and useful properties of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 42(2): 81-86.
- Azooz M M, Alzahrani A M, Youssef M M (2013) The potential role of seed priming with ascorbic acid and nicotinamide and their interactions to enhance salt tolerance in broad bean (*Vicia faba* L.) *Aust. J. Crop. Sci.* 7: 2091–2100.
- Boroumand Jazi Sh, Lari Yazdi H, Ranjbar M (2011) Effects of salicylic acid on some plant growth parameters under lead stress in *Brassica napus* var. Okapi. *Iranian J. Plant Physiol.* 1(3): 177–185.
- Bybordi A (2012) Effect of ascorbic acid and silicium on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and fatty acid contents in Canola exposure to salt stress. *Journal of Integrative Agriculture* 11(10):1610-1620.
- Charles D J (2012) Tarragon. In *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. Springer, New York: 545-55.
- Jaeger R, Purpura M, Pischel I (2011) U.S. Patent Application No. 12/996,163.
- Krupa-Małkiewicz M, Kruczek A (2018) Alleviating effects of ascorbic acid in lead toxicity in goji (*Lycium barbarum* L.) in *in vitro*. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech.* 340(45)1: 55–64.

- Krupa-Małkiewicz M, Smolik B, Ostojski D, Sędzik M (2015) Effect of ascorbic acid on morphological and biochemical parameters in tomato seedling exposure to salt stress. *Environ. Protect. Nat. Res.* 24(2): 25–27.
- Rutkowski L (2006) Klucz do oznaczania roślin naczyniowych Polski niżowej . Warszawa: Wyd. Naukowe PWN. ISBN 83-01-14342-8 .
- Nagajyoti P C, Lee K D, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants. *Environ. Chem. Lett.* 8: 199–216.
- Najeeb U, Ahmad W, Zia MH, i in. (2017) Enhancing the lead phytostabilization in wetland plant *Juncus effuses* L. through somaclonal manipulation and EDTA enrichment. *Arabian J. Chem.* 10: 3310–3317.
- Saeidi-Sar S, Abbaspour H, Afshari H, I in. (2013) Effects of ascorbic acid and gibberellin GA3 on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum.* 35: 667-677.
- Shultz, Leila M (2006) "*Artemisia dracunculus*". In *Flora of North America* Editorial Committee (ed.). *Flora of North America North of Mexico (FNA)*. 19. New York and Oxford – via eFloras.org, Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA.
- Yang Y, Zhang Y, Wei X. i in. (2011) Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. *Ecotox. Environ. Saf.* 74: 733–740.
- Younis M E, Hasaneen M N A, Kazamel A S (2010) Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects of NaCl and mannitol stress in *Vicia faba* seedlings. *Protoplasma* 239(1):39–48.

4. Plonowanie i jakość owoców dwóch polskich odmian maliny (*Rubus idaeus* L.) po dolistnym zastosowaniu biostymulatorów

Yielding and fruit quality of two Polish raspberry cultivars (*Rubus idaeus* L.) after foliar application of biostimulators.

Bernaciak M.⁽¹⁾, Bil W.⁽¹⁾, Dyguś Sz.⁽¹⁾, Figiel-Kroczyńska M.⁽²⁾, Krupa-Małkiewicz M.⁽¹⁾, Ochmian I.⁽²⁾

⁽¹⁾ Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, Poland

⁽²⁾ Katedra Ogrodnictwa; Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, Poland

Opiekun naukowy: dr inż. Krupa-Małkiewicz Marcelina

Słowa kluczowe: wielkość owoców, Polka, Poranna Rosa, odmiany powtarzające owocowanie

Streszczenie

Towarowa produkcja owoców maliny zaczęła się na szerszą skalę pod koniec lat sześćdziesiątych XX wieku. Obecnie produkcja koncentruje się głównie w USA i Kanadzie oraz Europie. Produkcja owoców maliny w Polsce ma charakter proeksportowy, ponad 70% owoców jest sprzedawanych za granicę. Badania przeprowadzono w sadzie doświadczalnym Katedry Ogrodnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Określono wpływ czterech biostymulatorów na plonowanie i jakość owoców dwóch polskich odmian maliny: Polka o czerwonych owocach i Poranna Rosa o żółtych owocach. Owoce odmiany Porannej Rosy zaczęły bardzo późno, główne plonowanie miało miejsce w październiku. Zastosowanie biostymulatorów miało niejednoznaczny wpływ na plonowanie i jakość owoców badanych odmian malin. U obu odmian Tytanit wpłynął na zwiększenie masy owoców. Preparaty Atonic i Tytanit spowodowały, że największe owoce zbierano na początku zbiorów, a Atonic wpłynął na zahamowanie procesu drobnienia owoców.

Abstract: The commercial production of raspberry fruit began on a larger scale in the late 1960s. Currently, production is concentrated mainly in the US and Canada, and Europe. Production of raspberry fruit in Poland is export-oriented, over 70% of fruit is sold abroad. The study was conducted in the experimental orchard of the Department of Horticulture of the West Pomeranian University of Technology in Szczecin. The effect of four biostimulators on yielding was determined, as well as the quality of the fruit of two Polish raspberry cultivars: Polka with red fruit and Poranna Rosa with yellow fruit. Fruits of the Morning Dew variety began to ripen very late, the main crop took place in October. The use of biostimulators had an ambiguous effect on the yield and quality of fruits of the studied raspberry cultivars.

In both cultivars, Titanit increased the weight of the fruit. Atonic and Titanit preparations caused that the largest fruits were harvested at the beginning of the harvest. In addition, Atonic slowed down the weight loss of fruit.

1. Wstęp

Maliny należą do rodziny *Rosaceae*, rodzaju *Rubus*, który obejmuje około 600 gatunków występujących na całym świecie. Najważniejszym z tych gatunków jest malina właściwa rosnąca w całej Europie. Maliny są to niskie, mniej lub bardziej kolczaste krzewy z jednorocznymi oraz dwuletnimi pędami i trwałą częścią podziemną. Na niej znajdują się paki śpiące, z których wyrastają odrosty korzeniowe i służą one do rozmnażania wegetatywnego roślin (Ostrowski i Zdzeszyńska 1991).

Malina wyróżnia się owocem zbiorowym, który składa się z drobnych pestkowców ściśle przylegających do siebie, a gdy osiągną one pełną dojrzałość, oddzielają się od dna kwiatowego. Odmiany uprawne dzieli się na trzy grupy: czerwona i żółta, czarna, purpurowa (Danek 2004).

Towarowa produkcja owoców maliny zaczęła się na szerszą skalę pod koniec lat sześćdziesiątych XX wieku. Były to małe plantacje o niskim poziomie intensywności, gdzie średni plon nie przekraczał 3-4 t/ha. Krzewy wysadzano rzędowo bez rozpinania pędów na drutach, a z odmian dominowały Latham, Lloyd George i Malling Seedling, później Malling Promise, Norna i Vetan. W latach 70. i 80. rozwinęła się forma prowadzenia pędów malin przy drutach. Taki system prowadzenia krzewów maliny ułatwiał ich pielęgnację i zbiór owoców, jak również wyższa była jakość i plon owoców, który wynosił 4-6 t/ha (Makosz 2006).

Obecnie produkcja koncentruje się głównie w USA i Kanadzie oraz Europie. Niewiele produkuje się również w niektórych krajach południowej półkuli, w Nowej Zelandii, Australii, Argentynie i Chile. W Europie, oprócz Polski, która jest największym producentem, owoce zbiera się również w Rosji, Serbii, Niemczech, na Węgrzech i w Wielkiej Brytanii. W Polsce głównymi rejonami uprawy maliny są: mazowieckie, wielkopolskie w okolicach Kalisza, lubelskie, podkarpackie i zachodniopomorskie w rejonie Koszalina (Makosz 2006).

Produkcja owoców maliny w Polsce ma charakter proeksportowy. Łączny udział eksportu stanowi nie mniej niż 80% zebranych owoców. Eksportuje się zwykle 40% owoców schłodzonych i 30% mrożonych oraz niewielką ilość w stanie świeżym (Makosz 2006). Głównym odbiorcą są kraje Unii Europejskiej, zwłaszcza Niemcy. Istnieją szanse dalszego rozwoju eksportu na ten rynek. Konieczne jest jednak szybkie przystosowanie się producentów i eksporterów do wymagań stawianych przez zagranicznych odbiorców.

Polskie sadownictwo ma największe w Europie możliwości rozwoju, ale żeby dobrze je wykorzystać należy zmienić podejście do produkcji owoców (Słowiński 2005). Przede wszystkim, trzeba więcej uwagi zwracać na jakość owoców, a nie jak do tej pory - na ilość. Sadownicy, którzy sprostają nowym wymaganiom w produkcji owoców deserowych, skorzystają w pierwszych kilku latach po integracji z relatywnie wyższych cen zbytu owoców. Niestety, najczęściej dyskwalifikowane parametry niełatwo jest poprawić tradycyjnymi metodami agrotechnicznymi. Wprowadzany Program Poprawy Jakości Owoców kompleksowo rozwiązuje problemy związane z wielkością owoców, zdolnością i jakością przechowalniczą, ordzawieniami i pękaniem owoców.

Biostymulatory takie jak Atonic SL są stosowane w uprawie roślin w celu usprawnienia procesów wzrostu i rozwoju. Ich wpływ na rośliny nie wynika z bezpośredniego udziału w regulacji procesów życiowych, lecz z oddziaływania na metabolizm w szerokim tego słowa znaczeniu. Stymulują one syntezę naturalnych hormonów, niekiedy zwiększają ich aktywność, usprawniają pobieranie składników mineralnych, intensyfikują podziały komórkowe itp. Ponadto powodują zwiększenie odporności na niekorzystne warunki stresowe (np. mróz i chłód) oraz przyspieszają regenerację uszkodzeń, dlatego nazywane są środkami przeciwstresowymi (Jankowski i Dubis 2008). Stosowanie biostymulatorów w technologii upraw roślin powoduje zwiększenie plonu, często przy jednoczesnym wzroście jego jakości. Wpływają na wzrost elongacyjny pędów (Klimek et. al. 2018). Podobne działanie mają również nanocząstki srebra (Krupa-Mańkiewicz i in. 2019). Biostymulatory usprawniają zachodzące w roślinach procesy życiowe bez modyfikowania ich naturalnego przebiegu. Mechanizm działania został dogłębnie przebadany i poznany (Słowiński 2006).

Konieczność intensyfikacji produkcji roślinnej i zapewnienie jej wysokiej opłacalności powoduje wprowadzenie do szerokiej praktyki coraz nowocześniejszych odmian oraz finezyjnych wręcz technologii ich uprawy. Bardzo często przy technologiach tych wykorzystywane są preparaty pełniące funkcje stymulatorów wzrostu i plonowania roślin, w których substancjami aktywnymi są głównie hormony roślinne – auksyny i gibereliny. (Dynowski 1995; Krupa-Mańkiewicz i in. 2019). Według Basak (2001) preparatem zasługującym na szczególną uwagę jest Tytanit wykazujący właściwości biostymulatora. Aktywuje on procesy metaboliczne podczas wzrostu i rozwoju roślin. Nasila proces fotosyntezy i pobierania składników, stymuluje zapylenie i zapłodnienie, a w wyniku tego zwiększa liczbę nasion w owocach co ma duży wpływ na wyrastanie owoców. Opryskiwanie preparatem Tytanit zwiększa także odporność roślin na choroby grzybowe i bakteryjne. Krzem,

podobnie jak Ca, inkrustuje ściany komórkowe, zwiększając przede wszystkim ich jędrność (Ochmian 2012; Ochmian i Kozos 2015).

Celem niniejszej pracy było przebadanie wpływu bioregulatorów: Atonic, ActiSil, Tytanit i Acadian Seaplants na wzrost i plonowanie dwóch odmian polskich malin: Polka i Poranna Rosa.

2. Materiał, metody badawcze i przebieg doświadczeń

Doświadczenie przeprowadzono w Sadowniczej Stacji Badawczej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiał doświadczalny stanowiły dwie odmiany maliny właściwej (*Rubus idaeus*): Polka i Poranna Rosa. Podczas doświadczenia maliny opryskiwano trzema biostymulatorami o zróżnicowanym działaniu i zawierające w swym składzie różne substancje czynne: Atonic, Biochikol i Tytanit.

Doświadczenie założono na glebie płowej opadowo-glejowej, wytworzonej z gliny zwałowej o składzie mechanicznym gliny lekkiej (26 – 35 frakcji <0,02 mm) i gliny średniej (36 – 50 frakcji < 0,02 mm) (Mijowska i in. 2016) w warunkach klimatycznych Polski północno-zachodniej (Ochmian i in. 2019).

Dwuczynnikowe doświadczenie założono w układzie podbloków losowych w czterech powtórzeniach. Powierzchnia jednego poletka wynosiła 2,5 m², natomiast całe doświadczenie 160 m².

1 czynnik stanowiły 2 odmiany: Polka i Poranna Rosa; 2 czynnik stanowiły biostymulatory: kontrola – rośliny nie opryskiwane, Atonic – stężenie 0,1%, ActiSil – stężenie 0,1%, Tytanit – stężenie 0,04 % i Acadian Seaplants 0,8%. Rośliny opryskiwano opryskiwaczem plecakowym do pełnego zwilżenia liści 5-krotnie co tydzień począwszy początku maja.

W czasie sezonu wegetacyjnego wykonano następujące pomiary:

Termin zbioru - określono początek oraz koniec zbiorów. Masa plonu - w każdym terminie zbioru określono masę plonu ogólnego oraz średnią masę 100 owoców.

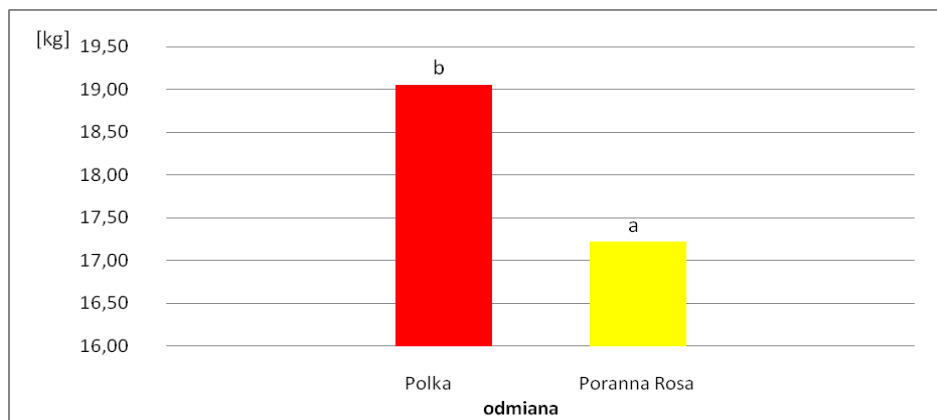
W czasie trwania doświadczenia wykonywano zabiegi mające na celu pielęgnację i ochronę roślin. Przeprowadzono je przez cały okres wegetacji, zgodnie z przyjętymi zasadami. Glebę podlewano za pomocą linii kroplującej typu T-Tape zamontowanej na stałe o wydajności emitera 1L·h⁻¹ (5 l wody·h⁻¹ na odcinku 1mb instalacji). Przyjmuje się, że średnia roczna suma opadów dla sadu Stacji Badawczej w Rajkowie wynosi 550 mm, co nie jest wystarczające do uprawy maliny. Dawki oraz intensywność emitowania wody była modyfikowana w zależności od stopnia uwilgotnienia gleby, określanego za pomocą kontaktowych tensjometrów glebowych. W doświadczeniu użyto nawozów azotowych: saletra amonowa oraz mocznik. Pierwszą dawkę saletry amonowej zastosowano w mieszance z torfem w ilości 15g N na 1mb. Drugą dawkę zastosowano w czasie kwitnienia i formowania się zawiązków owoców, w ilości 15g N na 1mb. Mocznik użyty został w czasie formowania się zawiązków i początku dojrzewania owoców maliny w dawce 25g N na 1mb. Na plantacji nie stosowano środków chemicznych. Stosowane biostymulatory stanowiły ochronę przed patogenami, natomiast aby ograniczyć występowanie chwastów zastosowano ściółkę z trocin w rzędzie na szerokość 1m, natomiast wyrastające chwasty w miarę wzrostu były usuwane mechanicznie.

Przy ocenie istotności różnic między średnimi dla poszczególnych odmian i poziomów nawożenia w celu opisanie jednej cechy, posługiwano się dwuczynnikową analizą wariancji, korzystając z testu Duncana, wykorzystując program Statistica 12.5 (StatSoft, Polska). W celu uśrednienia wyników wykonano syntezę z poszczególnych lat. Średnie nieróżniące się między sobą, przy poziomie istotności wynoszącym 5%, oznaczano tymi samymi literami.

3. Wyniki i dyskusja

Basak (2001) podaje, iż na świecie najczęściej stosowanym biostymulatorem jest Atonic, lecz w Polsce jest on jeszcze za mało przebadany, co do przydatności w sadach w szczególności dla zapobiegania lub łagodzenia skutków uszkodzeń mrozowych. Natomiast Mikos-Bielak (2004) podaje, iż w badaniach prowadzonych na różnych gatunkach roślin, Atonic działa ochronnie na rośliny rosnące w niekorzystnych warunkach klimatycznych, takich jak przymrozki, susza, szok

temperaturowy. W doświadczeniu badano dwie polskie odmiany malin powtarzające owocowanie. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zdecydowanie najbardziej plenną okazała się odmiana 'Polka' (Rys. 1). W badanym okresie uzyskano z niej łącznie ponad 19 kg owoców, a uzyskany plon był większy o ponad 2 kg od 'Porannej Rosy', która dała łącznie niewiele ponad 17 kg owoców z poletka (10 m²).



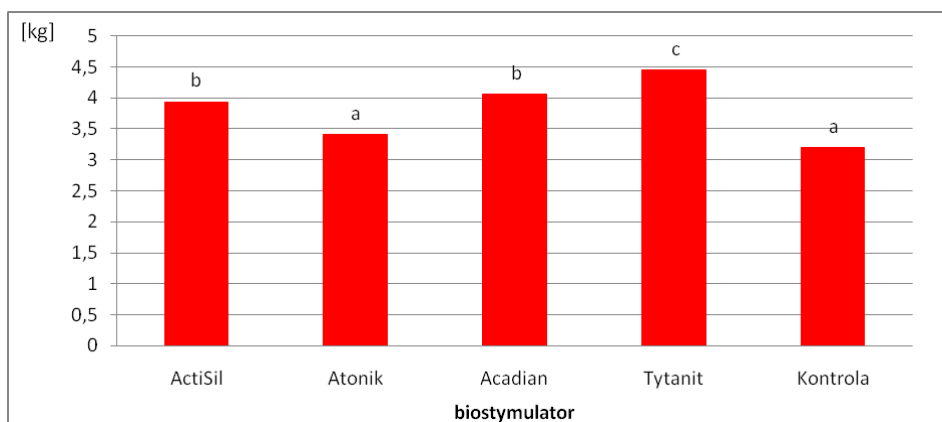
Rys.1. Plon maliny odmiany Polka i Poranna Rosa.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że plonowanie maliny odmiany Polka było zróżnicowane w zależności od zastosowanego biostymulatora (Rys. 2). Większość preparatów wpłynęła na zwiększenie plonu w porównaniu z kontrolą. Rośliny opryskiwane biostymulatorem Tytanit plonowały najlepiej, suma plonu owoców z poszczególnych terminów zbioru wynosiła prawie 4,5 kg owoców z poletka (2,5 m²). Rośliny traktowane preparatem Acadian oraz ActiSil plonowały istotnie gorzej, na poziomie ok. 4 kg owoców z poletka. Nie stwierdzono natomiast wpływu Atonicu na plonowanie roślin. Uzyskany plon był najniższy, podobny jak z obiektów kontrolnych.

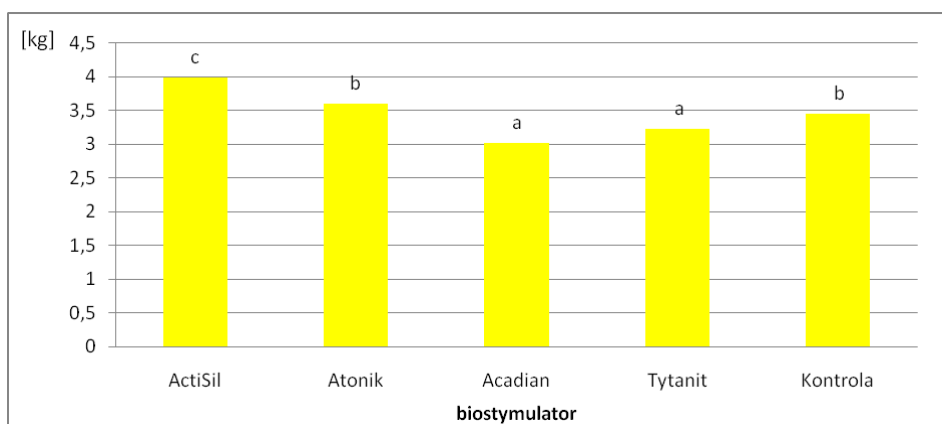
Na rycinie 3 można zaobserwować, że plon maliny odmiany 'Poranna Rosa' był zróżnicowany w zależności od zastosowanego biostymulatora. Plony odmiany z obiektów kontrolnych wyniosły około 3,4 kg owoców z poletka (2,5 m²). Analizując wielkość plonów stwierdzono, że największy wpływ uzyskano dzięki zastosowaniu ActiSila. Użycie tego bioregulatora spowodowało zwiększenie plonowania do 4 kg z poletka. Istotnie gorsze efekty dało zastosowanie preparatu Atonic. Z obiektów traktowanych tym biostymulatorem zebrano 3,6 kg owoców z poletka, lecz środek ten przyspieszył plonowanie badanej odmiany o tydzień (Rys. 5). Nie stwierdzono natomiast wpływu Tytanitu i Acadianu Seaplants na plonowanie roślin. Uzyskany plon z obiektów traktowanych tymi preparatami był najniższy i wyniósł odpowiednio 3,2 i 3 kg owoców z poletka.

Analizując wielkość plonów odmiany 'Polka' (rys. 4) w sezonie trwającym od lipca do października stwierdzono, iż największy plon uzyskano 13 września z obiektów gdzie zastosowano ActiSil. Użycie tego bioregulatora spowodowało wyższą plonów sięgającą 1348 g owoców z poletka. Natomiast dzięki zastosowaniu bioregulatora Tytanit uzyskano największy całkowity plon z badanej odmiany w sezonie wegetacyjnym. Z obiektów traktowanych pozostałymi środkami plon utrzymywał się na podobnym poziomie. Największy wzrost plonu ze wszystkich badanych obiektów nastąpił pomiędzy 31 sierpnia a 13 września. Analizując wielkość plonów odmiany 'Porannej Rosy' (rys. 5) z poszczególnych terminów zbioru możemy zaobserwować wzrost plonowania maliny w kolejnych terminach zbioru, przyjmując największe wartości pod koniec sezonu. Największą wyższą plon stwierdzono pod wpływem stosowania biostymulatora ActiSil. Zbiór który został przeprowadzony w dniu 1 października i wyniósł niewiele ponad 1300 g owoców z poletka. Z obiektów traktowanych preparatem Atonic ogólny plon owoców odmiany 'Poranna Rosa' był niższy, lecz środek ten przyspieszył plonowanie badanej odmiany, pierwsze owoce zbierano już od 16 lipca. Z obiektów opryskiwanych pozostałymi środkami pierwszy plon otrzymano w 3 dekadzie lipca, i był na

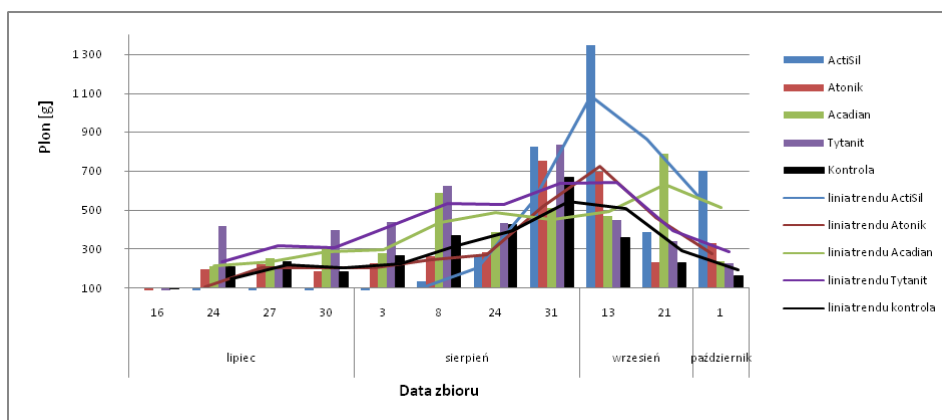
podobnym poziomie w poszczególnych terminach zbioru do 31 sierpnia. Znacząca zwyżka plonu nastąpiła ok. 13 września i trwała do 1 października.



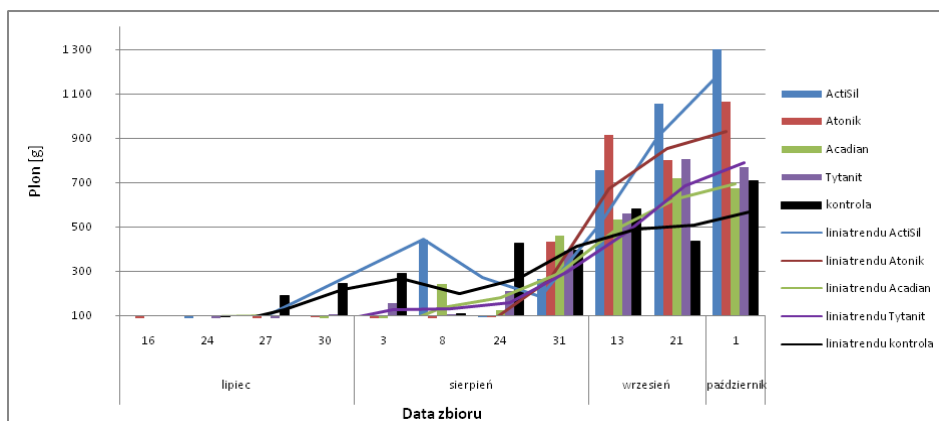
Rys. 2. Plonowanie maliny odmiany ‘Polka’ w zależności od zastosowanych biostymulatorów.



Rys. 3. Plonowanie maliny odmiany ‘Poranna Rosa’ w zależności od zastosowanych biostymulatorów.

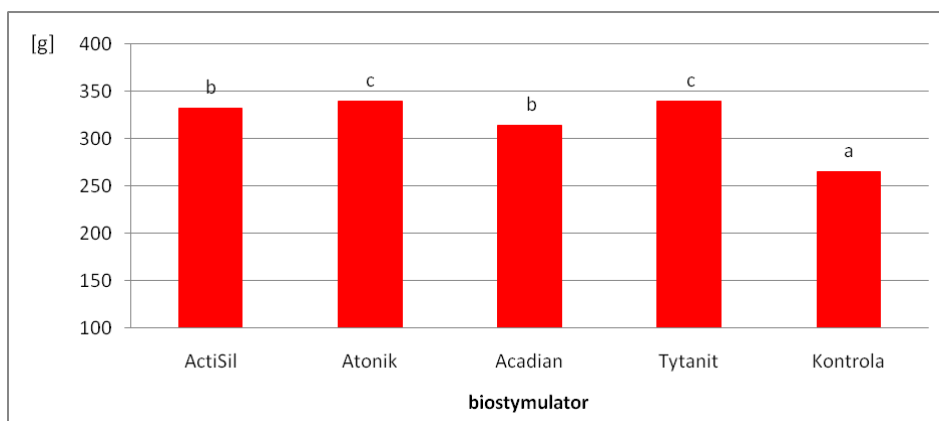


Rys. 4. Plonowanie odmiany maliny ‘Polka’ w zależności od zastosowanych biostymulatorów w poszczególnych terminach zbioru.



Rys. 5. Płonowanie odmiany maliny 'Poranna Rosa' w zależności od zastosowanych biostymulatorów w poszczególnych terminach zbioru.

Na rycinie 6 można zaobserwować, że owoce odmiany 'Polka' w istotnym stopniu reagowały na zastosowane biostymulatory. Oceniając wpływ wszystkich zastosowanych w doświadczeniu biostymulatorów można wnioskować, że szczególnie wysoką zwyzkę średniej masy 100 owoców uzyskano stosując dwa biostymulatory Tytanit i Atonic. Średnia masa 100 owoców dla tych preparatów wyniosła odpowiednio 340 i 339 g. Mniejsze owoce uzyskano w wyniku zastosowania w formie oprysku ActiSila i Acadianem Seaplants. Średnia masa 100 owoców wyniosła odpowiednio 323 g i 313 g. Natomiast najmniejszą wielkość owoców uzyskano z obiektów kontrolnych gdzie średnia masa 100 owoców wyniosła jedynie 264 g.

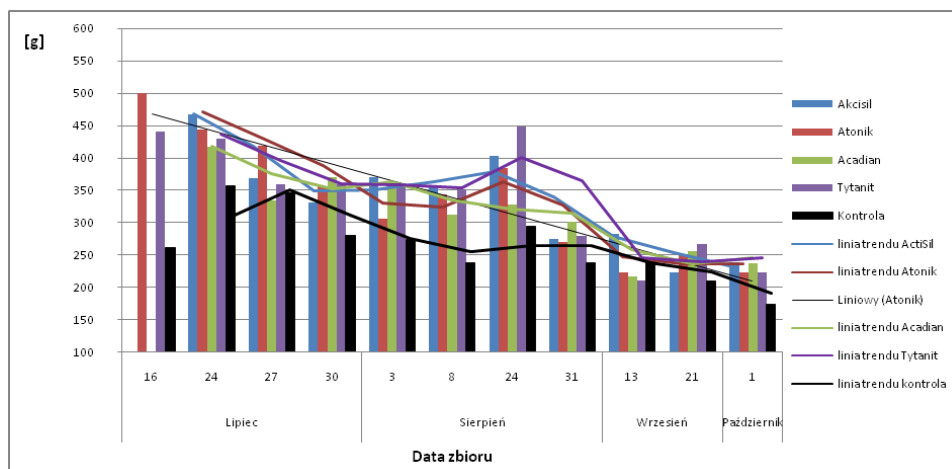


Rys. 6. Średnia masa 100 owoców odmiany 'Polka' w zależności od zastosowanych biostymulatorów.

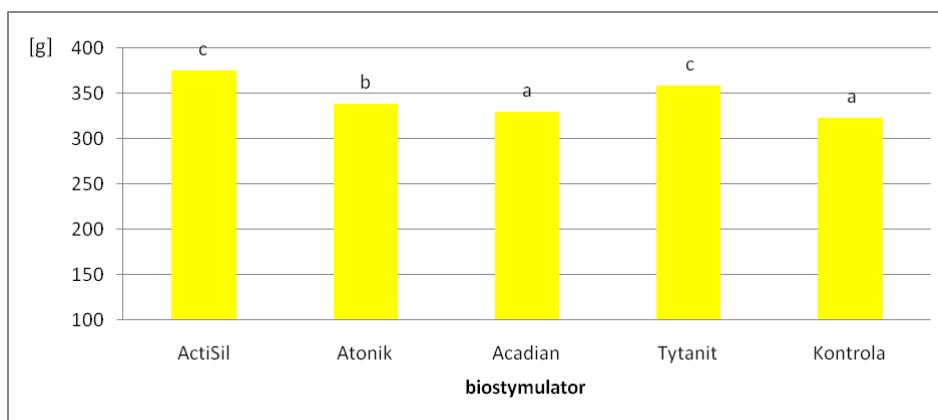
Rycina 7 przedstawia różnice w wielkości owoców. W sezonie wegetacyjnym trwającym od 16 lipca do 1 października, największą masę 100 owoców badanej odmiany, uzyskano 16 lipca przy zastosowaniu Atonica, która wyniosła 500 g. W wyniku użycia pozostałych środków masa 100 owoców zwiększyła się do podobnej wielkości 450 g, którego poziom utrzymywał się od początku zbioru do 24 sierpnia. Natomiast masa 100 owoców zebranych z obiektów kontrolnych, wzrosła jedynie do 357 g w dniu 24 lipca i malała w miarę zbioru.

Rycina 8 przedstawia różnice w masie 100 owoców maliny odmiany 'Poranna Rosa' w zależności od zastosowanego preparatu. Najmniejsze owoce uzyskano z obiektów kontrolnych, średnia masa 100 owoców wyniosła 323 g. Oceniając wpływ wszystkich zastosowanych w doświadczeniu biostymulatorów można wywnioskować, że największą zwyzkę średniej masy 100

owoców uzyskano stosując ActiSil. W wyniku użycia tego biostymulatora średnia masa 100 owoców wyniosła 375 g. Dzięki zastosowaniu w formie oprysku Tytanitu średnia masa 100 owoców była równie wysoka w odniesieniu do kontroli i wyniosła 358 g. Mniejsze owoce uzyskano w wyniku zastosowania biostymulatora Atonic. Średnia masa 100 owoców wyniosła 338g. Jednak dzięki opryskiwaniu tym preparatem otrzymano najwyższą masę 100 owoców, która przypadła na początku zbioru (ryc. 9) Natomiast najgorzej ze wszystkich biostymulatorów wypadł Acadianem Seaplants. Średnia masa 100 owoców tego środka wyniosła jedynie 329g środek ten nie miał wpływu na masę 100 owoców badanej odmiany.

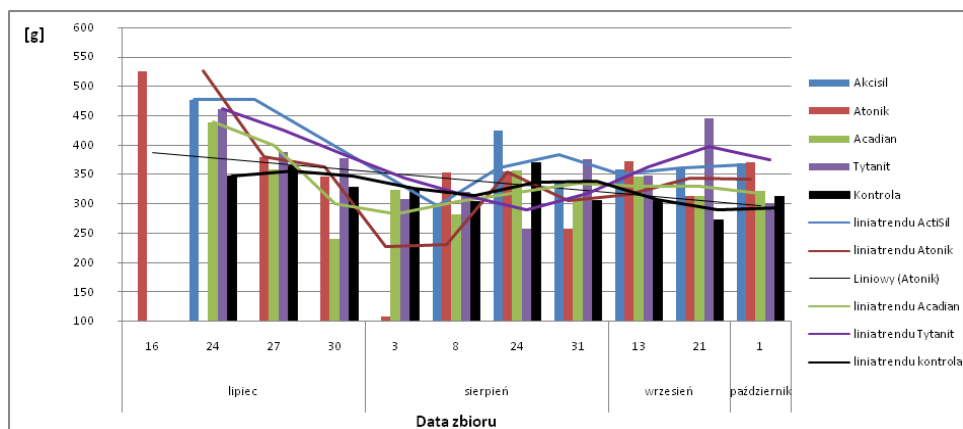


Rys.7. Masa 100 owoców odmiany ‘Polka’ w zależności od zastosowanego biostymulatora w poszczególnych terminach zbioru owoców.



Rys. 8. Średnia masa 100 owoców odmiany ‘Poranna Rosa’ w zależności od zastosowanego biostymulatora.

Rycina 9 przedstawia różnice w masie 100 owoców w poszczególnym terminie zbioru trwającym od 6 lipca do 1 października. Największą masę 100 owoców badanej odmiany uzyskano 16 lipca przy zastosowaniu preparatu Atonic, która wyniosła 526g. W wyniku użycia pozostałych biopreparatów otrzymano największą masę 100 owoców 24 lipca która wynosiła od 470 do 440 g. Natomiast masa 100 owoców zebrana z obiektów kontrolnych, wzrosła jedynie do 365 g w dniu 27 lipca i zmniejszała się w miarę zbioru.



Rys. 9. Masa 100 owoców odmiany ‘Poranna Rosa’ w zależności od zastosowanego biostymulatora w poszczególnych terminach zbioru

4. Podsumowanie

Lepszą z badanych odmian okazała się Polka, która charakteryzowała się większą siłą wzrostu i lepszym plonowaniem. Owoce odmiany Porannej Rosy zaczęły dojrzewać najpóźniej. Główną masę plonu zebrano w październiku. Zastosowanie biostymulatorów miało niejednoznaczny wpływ na plonowanie i jakość owoców badanych odmian malin. U obu odmian Tytanit wpłynęła na zwiększenie masy jednostkowej owoców. Preparaty Atonic i Tytanit wpłynęły na uzyskanie największych owoców na początku zbiorów, w przypadku Atonicu stwierdzono pozytywny wpływ na zahamowanie procesu drobnienia owoców.

5. Literatura

- Basak A (2001) Chemiczne regulowanie zawiązania owoców. *Hasło Ogrodnicze*: 5
- Danek J (2004) *Uprawa maliny i jeżyny*. Hortpress, Warszawa
- Jankowski K, Dubis B (2008) Biostymulatory w polowej produkcji roślinnej, *Materiały Konferencyjne Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin*. Warszawa 7-8 luty 2008, SGGW: 24
- Klimek K, Kapłan M, Najda A (2018) Wpływ regulatorów wzrostu na jakość okulantów jabłoni. *Acta Agroph.* 25(3): 277-288.
- Krupa-Mańkiewicz M, Oszmiański J, Lachowicz S i in. (2019) Effect of nanosilver (nAg) on disinfection, growth, and chemical composition of young barley leaves under in vitro conditions. *Journal of Integrative Agriculture* 18(8): 1871-1881.
- Krupa-Mańkiewicz M, Smolik B i Sędzik M (2019) Influences of ascorbic acid and gibberellic acid in alleviating effects of salinity in *Petunia* under in vitro. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* 88.1: 15-23.
- Makosz E (2004) *Malina, Polskie sadownictwo z ekonomicznego punktu widzenia*. Prognosfruit Lublin : 39-40
- Mijowska K, Ochmian I, Oszmiański J (2016) Impact of cluster zone leaf removal on grapes cv. Regent polyphenol content by the UPLC-PDA/MS method. *Molecules* 21(12): 1688
- Mikos-Bielak M (2004) Bioregulacja plonowania i chemicznej jakości plonu malin jako efekt zastosowania Asahi. *Annales, Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin*: Vol. LIX, 3
- Ochmian I D (2012) The Impact of Foliar Application of Calcium Fertilizers on the Quality of Highbush Blueberry Fruits Belonging to the ‘Duke’ Cultivar. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*: 40(2): 163-169.
- Ochmian I, Kozos K (2015) Influence of foliar fertilisation with calcium fertilisers on the firmness and chemical composition of two highbush blueberry cultivars. *Journal of Elementology*: 20

- Ochmian I, Oszmiański J, Lachowicz S i in. (2019). Rootstock effect on physico-chemical properties and content of bioactive compounds of four cultivars Cornelian cherry fruits. *Scientia Horticulturae* 256: 108588.
- Ostrowski W, Zdzeszyńska R (1991) Zakładanie i prowadzenie towarowej plantacji malin. AR Szczecin
- Słowiński A (2005) Biostymulatory w nowoczesnej uprawie roślin. *Wiś Jutra* 3: 25–26.

5. Produkcja biomasy roślinnej półnaturalnych pastwisk górskich

Biomass production of seminatural mountain pastures

Borkowski Filip⁽¹⁾, Greficz Dawid⁽¹⁾, Kasprzak Hubert⁽¹⁾, Kolasińska Anna⁽¹⁾, Nocoń Zofia⁽¹⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Ekologów, Katedra Ekologii, Biogeochemii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

Opiekun naukowy: dr hab. Tomasz Szymura, prof. UWr

Borkowski Filip: filipborkowski900@gmail.com

Słowa kluczowe: bogactwo gatunkowe, topograficzny indeks wilgotności, zbiorowiska trawiaste

Streszczenie

Zbiorowiska trawiaste, czyli głównie łąki i pastwiska, dostarczają wielu różnych usług ekosystemowych, a w warunkach Europy Środkowej i Zachodniej są najważniejszą ostoją różnorodności biologicznej w krajobrazie rolniczym. Istnienie łąk i pastwisk w naszych warunkach klimatycznych jest bezpośrednio związane z gospodarką ludzką: regularnym koszeniem lub wypasem, dlatego warunkiem niezbędnym do zachowanie wysokiego poziomu różnorodności biologicznej terenów rolniczych jest zrównoważona gospodarka łąkarska, która zapewnia jednocześnie odpowiednią ekonomicznie produkcję biomasy i sprzyja zachowaniu a, nawet zwiększeniu, walorów przyrodniczych. W warunkach przyrodniczych i ekonomicznych Polski łąki i pastwiska zachowały się głównie na siedliskach nie sprzyjających innej produkcji rolniczej, często w górskich. Celem niniejszej pracy jest określenie wpływu warunków topograficznych na wytwarzanie biomasy nadziemnej i podziemnej ekstensywnie użytkowanego pastwiska górskiego, i poznanie zależności pomiędzy warunkami topograficznymi, produkcją biomasy a bogactwem gatunkowym roślin naczyniowych. Projekt wykonany była na pastwiskach położonych w Radomierzu (Sudety Środkowe), gdzie topografia terenu została poddana analizie narzędziami GIS-owymi, a naziemne pomiary produkcji biomasy, wysokości runi i wilgotności podłoża, na wygradzonych poletkach badawczych zabezpieczających run przed zgryzaniem przez bydło. Wstępne wyniki wskazują, że istotną wpływ na wytwarzanie biomasy ma wilgotność podłoża wynikająca z topografii terenu. Uzyskane wyniki sugerują, że produktywność runi pastwiska może być modelowana w oparciu o dane topograficzne.

1. Wstęp

Zbiorowiska trawiaste, głównie łąki i pastwiska, są rozprzestrzenione po wszystkich biogeograficznych regionach Europy. Większość z nich powstała w wyniku wycinki lasów i jest utrzymywana przez wypas lub koszenie (Janssen i in. 2016). Zapewniają one wiele usług ekosystemowych. Dostarczają żywności (mleka, mięsa oraz miodu), wody oraz surowców (pasz, nawozów, bioenergii). Mają wpływ na regulację jakości powietrza - pastwiska są miejscami wypasu zwierząt, które emitują CH₄ oraz N₂O. Uczestniczą w regulacji klimatu poprzez magazynowanie CO₂ oraz mają zdolność łagodzenia ekstremalnych zjawisk, do których należą powodzie czy osunięcia ziemi. (Hönigová i in. 2012). Biorą udział w regulacji cyklu hydrologicznego poprzez magazynowanie wody oraz wpływ na czas i wielkość spływu, który mogą zmniejszyć nawet o 20% w porównaniu z gruntami ornymi i o 50% w porównaniu z obszarami miejskimi, zapobiegając także erozji wodnej. Mają zdolność pochłaniania zanieczyszczeń takie jak związki azotu, które są przekształcane na jony amonowe i azotanowe dzięki aktywności drobnoustrojów. Ponadto łąki i pastwiska stanowią źródło zasobów genetycznych, zdomniczych oraz leczniczych. Są siedliskiem życia wielu gatunków w tym dzikich zapylaczy: z rodziny bzygowatych, trzmieli czy dzikich pszczoł (Hönigová i in. 2012).

Głównym zagrożeniem dla półnaturalnych zbiorowisk trawiastych jest intensyfikacja rolnictwa w Europie. Coraz częściej zamiast nawozów tradycyjnych, jak wapnowanie czy stosowanie gnojowicy używa się nawozów sztucznych, przyczyniające się do zanieczyszczenia środowiska

związkami azotu (Janssen i in. 2016). Równie często, aby osiągnąć wysoką produkcję podsiewa się kilka gatunków wysokoprodukcyjnych traw lub innych gatunków oraz wypasa się większą liczbę zwierząt, co prowadzi do ich zubożenia i degradacji runi łąkowej. Zdarza się, że na zdegradowanych powierzchniach zaprzestaje się wypasu i zamienia się je w przynoszące większe zyski pola uprawne. Znaczącym zagrożeniem dla zbiorowisk trawiastych jest także zaniechanie tradycyjnego wykorzystania (Janssen i in. 2016), prowadzące do uaktywnienia się procesu sukcesji, który prowadzi do zarastania łąk gatunkami ekspansywnymi lub inwazyjnymi.

Z punktu widzenia różnorodności biologicznej zbiorowiska trawiaste są szczególnie ważne, gdyż charakteryzują się dużą dynamiką zmienności składu gatunkowego, która wynika z jednej strony z modyfikacji sposobu użytkowania prowadzącej do zaniku jednych gatunków, a pojawienia się innych. Zwierzęta wypasane na pastwiskach przyczyniają się do rozwoju niskich traw oraz innej niskiej roślinności odpornej na zgryzanie. Z drugiej strony na zmienność składu gatunkowego wpływa występowanie zmiennych warunków siedliskowych, które decydują o możliwości występowania danych gatunków (Zarzycki i Korzeniak 2013).

W rolnictwie ekologicznym szczególnie duże znaczenie ma jakość paszy, którą można uzyskać z pastwisk, ponieważ wpływa ona na zdrowie zwierząt (Nazaruk i in. 2009). Czynnikiem decydującym o jej jakości jest skład gatunkowy runi, która nie powinna składać się wyłącznie z traw, ale również z roślin motylkowych i ziół, gdyż trawy nie są w stanie w pełni zaspokoić potrzeb pokarmowych zwierząt. Dodatkowo, jeśli w runi występują zioła, podnosi to jej wartość, ponieważ mają one działanie profilaktyczne, lecznicze oraz antyseptyczne (Grzegorzczuk i Gołębiowska 2008).

Celem pracy było określenie wpływu warunków topograficznych na wytwarzanie biomasy nadziemnej i podziemnej ekstensywnie użytkowanego pastwiska górskiego i poznanie zależności pomiędzy warunkami topograficznymi, produkcją biomasy, a bogactwem gatunkowym roślin naczyniowych.

2. Materiały i Metody

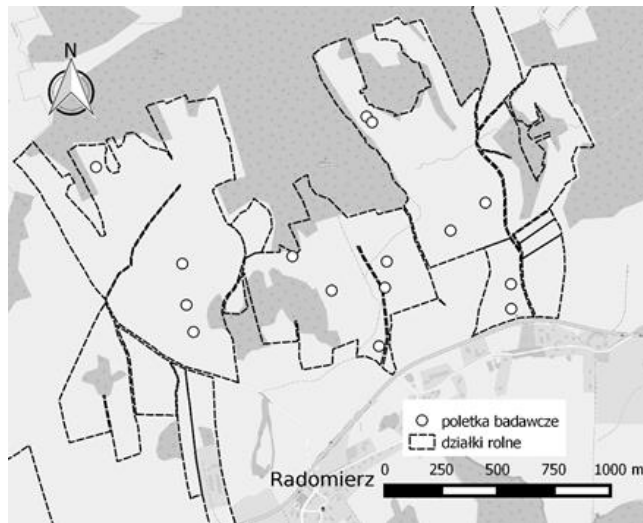
2.1 Obszar badań

Badania przeprowadzane były na terenie stacji dydaktyczno-badawczej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu położonej w Radomierzu (Góry Kaczawskie). Gospodarstwo ma powierzchnię 308,15 ha z czego 227 ha zajmują trwałe użytki zielone w postaci łąk i pastwisk (Rys 1.). Ekstensywnie użytkowane pastwiska są położone w przedziale wysokościowym 450-600 m. n.p.m., w terenie o urozmaiconej rzeźbie (Rys 2.). Średnia roczna temperatura wynosi tutaj 6,9 stopnia Celsjusza, zimą -2,4, a latem 16,3 stopnia. Suma opadów rocznych to 960,8 mm, natomiast w okresie letnim jest to 342,5 mm.

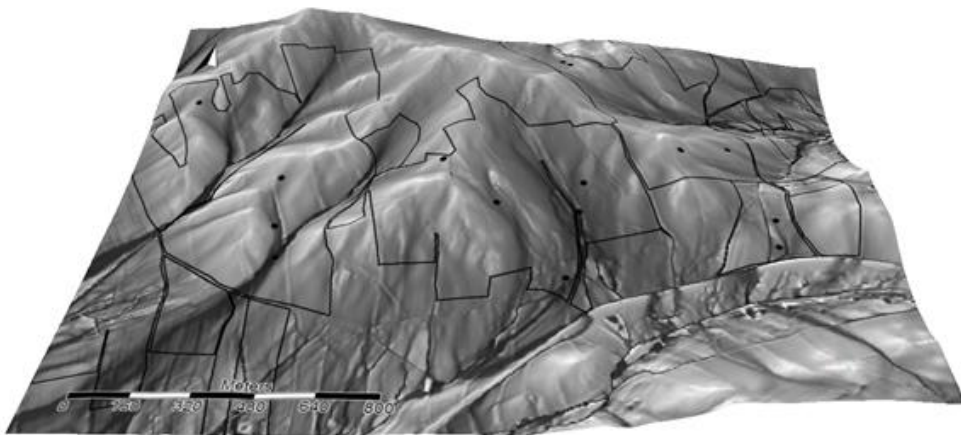
W niższych położeniach występują gleby brunatne (Geoportal Dolnego Śląska), natomiast w wyższych położeniach gleby słabo wykształcone typu rankerów. Stacja zajmuje się hodowlą cieląt opasowych rasy Charolaise. Dominującymi gatunkami roślin na ekstensywnych pastwiskach są: *Agrostis capillaris* (mietlica pospolita), *Arrhenatherum elatius* (rajgras wyniosły), *Festuca rubra* (kostrzewa czerwona), *Trisetum flavescens* (konietlica łąkowa), *Festuca pratensis* (kostrzewa łąkowa), *Dactylis glomerata* (kupkówka pospolita), *Anthriscus sylvestris* (trybula leśna), *Phleum pratense* (tymotka łąkowa), *Poa pratensis* (wiechlina łąkowa).

Wskaźniki topograficzne opisujące warunki środowiskowe na poletkach obliczono na podstawie Numerycznego Modelu Terenu (NMT), z wartością błędu <20 cm powstałego na bazie lotniczego skaningu laserowego i dostarczonego przez Centralny Ośrodek Dokumentacji Geodezyjnej (<http://www.gugik.gov.pl/pzgiik/zamow-dane/numeryczny-model-terenu>). NMT posłużył do obliczenia wysokości nad poziomem morza i nachylenia zbocza. Na podstawie NT obliczono także wartości współczynnika diurnal anisotropic heating (DAH) – odzwierciedla on ilość energii słonecznej potencjalnie docierającej do powierzchni terenu. Ilość ta zależy od nachylenia zbocza i jego ekspozycji na kierunki geograficzne (najcieplejsze są zbocza o ekspozycji SSW) (Hengl i Reuter 2008). Jest to wskaźnik bezwymiarowy, wysokie wartości dodatnie oznaczają dużą ilość energii, podczas gdy wysokie wartości ujemne – małą ilość energii. Obliczono także wartości Topograficznego wskaźnika wilgotności (TWI) – wskazuje on kumulację wody wynikającą

z wielkości zlewni i położenia punktu w jej obrębie oraz nachylenia zboczy (Hengl i Reuter 2008). Jest to wskaźnik bezwymiarowy, wysokie wartości odzwierciedlają potencjalnie dużą wilgotność terenu. Wszystkich obliczeń i wizualizacji dokonano z wykorzystaniem programów SAGA (Conrad i in. 2015) i QGIS (<https://qgis.org/en/site>).



Rys. 1. Położenie stacji dydaktyczno-badawczej w Radomierzu wraz z zaznaczonymi polatkami badawczymi (białe kółka). Źródło mapy podkładowej: OpenStreetMap.



Rys 2. Usytuowanie poletek badawczych na tle rzeźby terenu.

2.2 Pobór próbek

Na terenie pastwisk wygrodzono 15 poletek badawczych, każde w kształcie kwadratu o powierzchni 4m^2 . W celu zabezpieczenia przed zgryzaniem, w kwietniu, przed rozpoczęciem okresu wypasu, wszystkie polećka zostały wygrodzone drutem z pastucha elektrycznego (rys. 3).

Na każdym polietku określono liczbę gatunków roślin naczyniowych występujących na nim. Ze środka każdego polećka pobrano biomasa roślinną wycinając kwadraty wielkości $0,25\text{m}^2$, w dwóch powtórzeniach. Pierwszy termin poboru biomasy odbył się 25 czerwca 2019 roku. W trakcie poboru pomierzono także wilgotność gleby przy użyciu wilgotnościomierza pojemnościowego. Na każdym polietku wykonano cztery pomiary i wyniki uśredniono do polećka. W trakcie, poboru biomasy w II

terminie (19-21.08) dodatkowo pobrano odrost z poletek skoszonych w I terminie oraz, w dwóch powtórzeniach, dokonano poboru próbek gleby wraz korzeniami za pomocą świdra glebowego. Wyciętą biomasę i próbki korzeni pakowano do oznaczonych worków i osuszano powietrznie w laboratorium. Korzenie oczyszczano z gleby przy użyciu dwóch sit glebowych z oczkami o średnicy 2 mm i 0,5 mm a następnie zbierano za pomocą pęset. Oczyszczone korzenie zostały następnie zważone, podobnie jak wycięta biomasa nadziemna.



Rys. 3. Sposób wygrodzenia poletek badawczych.

2.3 Metody analityczne

Obliczono podstawowe parametry statystyczne rozkładu suchej biomasy na badanych poletkach średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, medianę, górny kwartył, dolny kwartył, wartości minimalną i maksymalną. Ponieważ nie wszystkie zmienne można było przekształcić tak, aby były zgodne z wymogami testów parametrycznych, dlatego w celu zachowania jednakowej mocy testów w całej pracy zdecydowano się na wykorzystanie testów nieparametrycznych, wyjątkiem jest wykorzystanie regresji liniowych. Istotność zróżnicowania masy pokosów w poszczególnych terminach testowano wykonując test kolejności par Wilcoksona. Zależności pomiędzy zmiennymi testowano badając korelację rang Spearmana. Jako poziom istotności statystycznej popęśnienia błędu I rodzaju przyjęto próg 0,05 (Łomnicki 2007). Obliczenia wykonano w programie STATISTICA.

3. Wyniki

Podstawowe statystyki zmienności wytwarzanie biomasy przedstawia Tab. 1. Rozkład wartości biomasy pobranej w pierwszym i drugim terminie na badanych stanowiskach prezentuje odpowiednio rysunek 5 i rysunek 6.

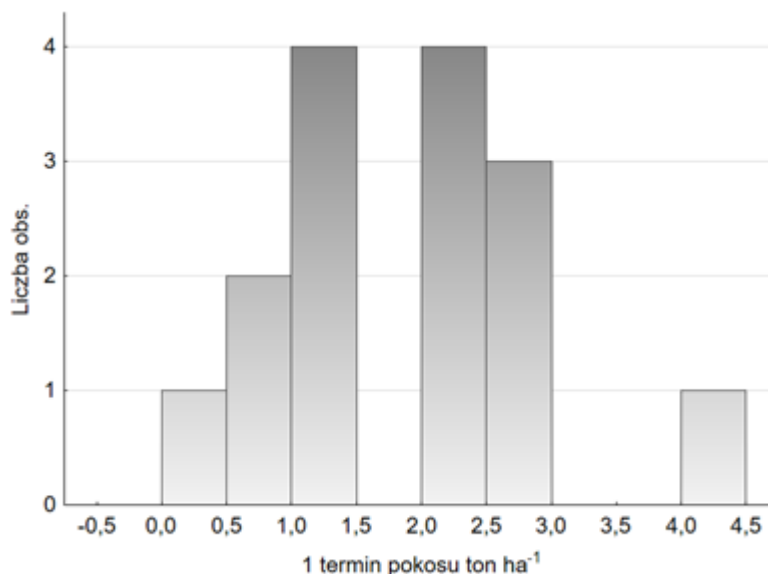
Porównanie testem kolejności par Wilcoksona suchej masy z pokosu w pierwszym terminie i masy pobranej w drugim terminie wskazuje na brak istotnej różnicy między terminami pokosów ($p=0,28$ $Z=1,07$). Ten sam test wskazał również, że większą produktywność obszarów trawiastych można uzyskać wykaszając okresowo trawy - suma biomasy pokosu w pierwszym terminie i odrostu większa od biomasy wykoszonej w drugim terminie ($p=0,008$ $Z=2,66$). Zróżnicowanie produkcji biomasy różnych terminów poborów przedstawia rys. 7.

Topograficzny współczynnik wilgotności wykazuje istotną statystycznie korelację z wartością współczynnika wilgotności ($R=0,92$). Istotna zależność nie łączy współczynnika DAH i TWI ($R=0,7$ $p=0,79$). Wraz ze wzrostem wilgotności roślinie również produkcja biomasy (Tab. 2). Dotyczy to zarówno I, II pokosu jak i odrostu i sumy pokosu i odrostu. Nie występuje istotna statystycznie korelacja między ilością gatunków roślin a produkcją biomasy (p dla korelacji rang

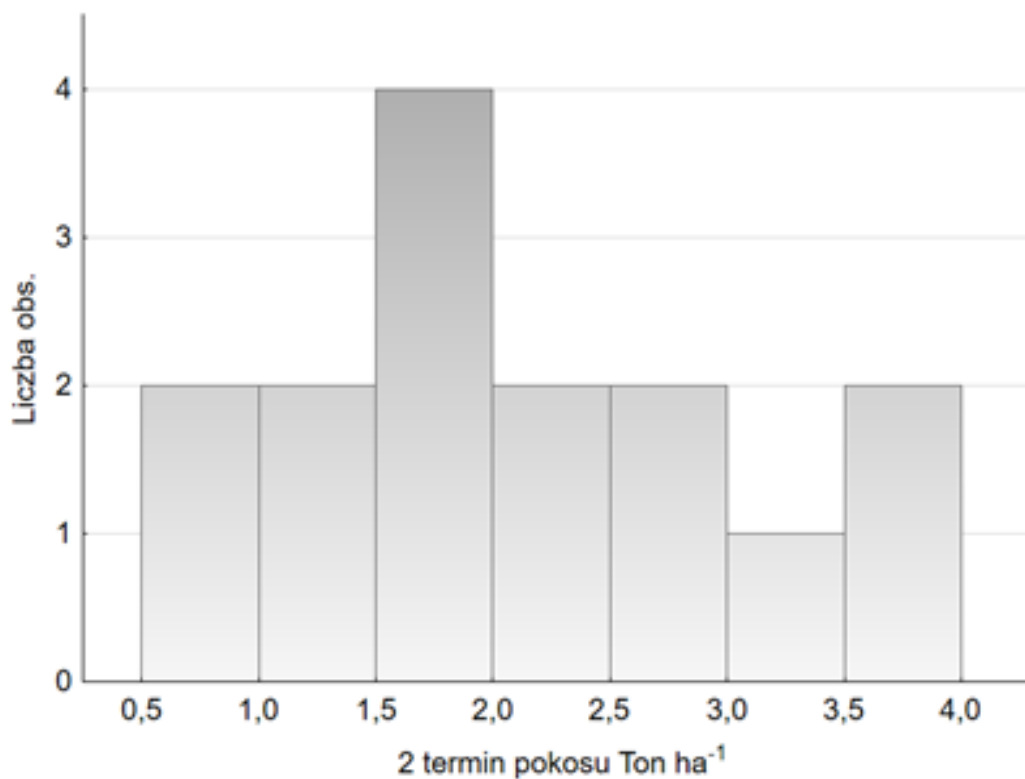
Spearmana wynosi 0,14). Występuje również silna, istotna statystycznie korelacja ($r= 0,97$) między produkcją biomasy pochodzącej z pokosu w pierwszym terminie i jej odrostem. W przypadku korzeni natomiast nie została wykryta żadna istotna statystycznie korelacja. Wyniki poszczególnych korelacji przedstawione są w tabeli 2., a rozrzut wartości biomasy pobranej w 1 terminie względem TWI i DAH przedstawia odpowiednio Rys. 8. i 9. Dopasowana regresja liniowa tłumaczy 34% zmienności wartości pokosu w terminie I jako funkcji TWI, ($p=0,02$).

Tab. 1. Statystyki opisowe biomasy pobranej z poletek badawczych w Radomierzu w różnych okresach.

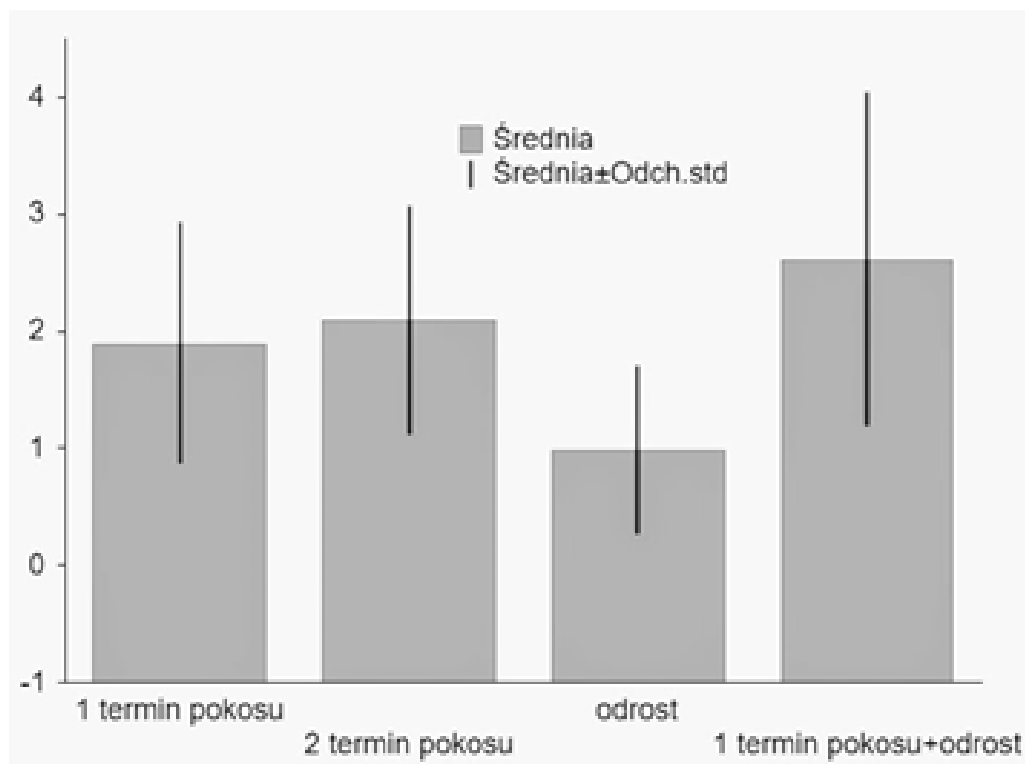
	jednostka	Średnia	Mediana	Mini- mum	Maksi- mum	Dolny Kwartyl	Górny Kwartyl	Odchylenie Standardowe
TWI	bezwymiarowa	7,12	7,24	4,57	11,3	5,53	8,03	1,83
DAH	bezwymiarowa	0,08	0,1	-0,13	0,24	0,006	0,16	0,1
Liczba gatunków	bezwymiarowa	28,8	26	19	34	24	27	3,38
korzenie	g	1,28	0,85	0,35	5,81	0,44	1,47	1,37
I termin pokosu	Ton ha ⁻¹ s.m.	1,89	2,03	0,36	4,04	1,06	2,57	1,02
II termin pokosu	Ton ha ⁻¹ s.m.	2,09	1,86	0,85	3,99	1,22	2,73	0,96
Odrost	Ton ha ⁻¹ s.m.	0,97	0,89	0,16	2,61	0,49	1,18	0,71
I termin pokosu + odrost	Ton ha ⁻¹ s.m.	2,61	2,26	0,77	5,11	1,70	3,39	1,42



Rys. 5. Rozkład wartości biomasy pobranej podczas pokosu w 1 terminie.



Rys. 6. - Rozkład wartości biomasy pobranej podczas pokosu w 2 terminie.



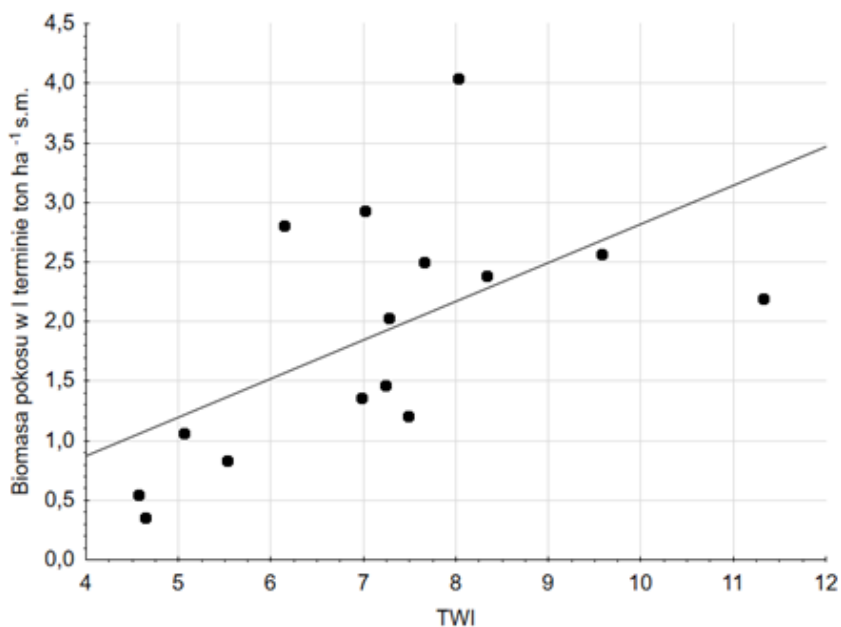
Rys. 7. Produkcja biomasy podczas pokosów w różnych terminach ton ha⁻¹

Tab. 2. Wyniki badanych korelacji

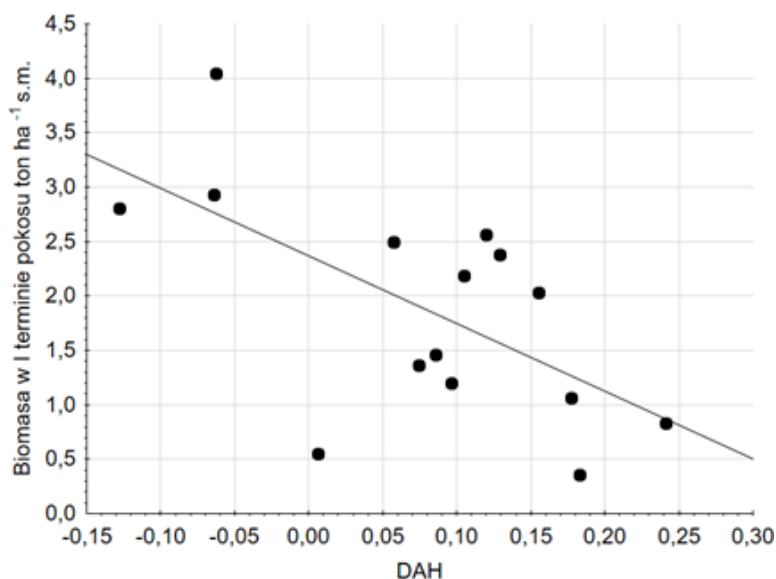
	I termin pokosu	II termin pokosu	I termin pokosu + odrost	Biomasa korzeni
TWI	R=0,64 p=0,01	R=0,53 p=0,04	R=0,6 p=0,09	R=-0,24 p=0,38
Wilgotność	R=0,68 p=0,006	R=0,59 p=0,02	R=0,73 p=0,02	R=0,04 p=0,86
DAH	R=-0,6 p=0,02	R=-0,12 p=0,64	R=-0,71 p=0,03	R=0,16 p=0,56
Liczba gat.	R=-0,20 p=0,06	R=-0,47 p=0,08	R=-0,64 p=0,06	R=-0,02 p=0,91

Tab. 3. Wyniki badanych korelacji - ciąg dalszy

	Wilgotność	Liczba gat.
DAH	R=-0,23 p=0,41	R=-0,19 p=0,46
TWI	R=0,72 p=0,002	R=-0,12 p=0,66



Rys. 8. Zależność między biomasa pochodzącą z pokosu w 1 terminie a TWI. Równanie regresji: $y = -0,4266 + 0,3247x$ ($r^2 = 0,34$, $p = 0,02$).



Rys. 9. Zależność między biomasa pochodząca z pokosu w 1 terminie a DAH. Równanie regresji: = 2,3728-6,2139x ($r^2=0,39$ p=0,015).

4. Dyskusja

4.1 Porównanie produkcji biomasy do innych ekosystemów łąkowych

Całkowity plon roczny, na wysoko produktywnych, podsiewanych i silnie nawożonych łąkach w dobrych warunkach klimatycznych, na żyznych glebach w pierwszy roku po podsianiu może wynosić nawet 55 t/ha suchej masy (Dradrach i Zdrojewski 2008), jednak średni plon siana z łąk w Polsce w wynosi 4,29 t/ha (Jankowska-Huflejt i Domański 2008). Produkcja na terenach podgórskich wahała się od 5,72 t/ha do około 9,9 t/ha (Kasperczyk i in. 2010), w przypadku pastwisk górskich położonych na wysokościach 550-700 m n.p.m. jest mniejszy: 4,2–4,7 t/ha suchej masy (Twardy i in. 2015). Na łąkach górskich zdominowanych przez kostrzewę czerwoną i mietlicę pospolitą, które są jednymi z gatunków dominujących na pastwiskach w Radomierzu, otrzymano średnią produkcję suchej nadziemnej biomasy na poziomie 3,59 t/ha. (Kasperczyk i in. 2008). Z kolei wg danych Kasperczyka, Szewczyka i Kacorzycy (2007) łąki i pastwiska z dużym udziałem kostrzewy czerwonej (*Festuca rubra*) i wiechliny łąkowej (*Poa pratensis*), a więc gatunków dominujących również na pastwiskach w Radomierzu – charakteryzują się raczej niską produkcją suchej biomasy - jedynie 1,58 t/ha.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że produkcja biomasy roślinnej na pastwiskach w Radomierzu jest znacznie niższa niż w wysoko produktywnych, nawożonych i podsiewanych murawach i niższa niż wartości podawana do trwałych użytków zielonych podgórskich i górskich. Biorąc jednak pod uwagę skład runi uzyskane wyniki są podobne do innych łąk i pastwisk górskich w Polsce.

Istotnym czynnikiem ograniczającym produktywność badanych pastwisk była wilgotność (Tab. 2. Rys 8) i w miejscach najsuchszych produkcja biomasy była kilkakrotnie niższa niż w miejscach najwilgotniejszych. Również istotny był wpływ nagrzewania powierzchni gruntu na spadek produkcji biomasy. Można przyjąć, że zwiększenie ładunku cieplnego powoduje zwiększenie wyparowania wody z gleby, a przez to większe jej osuszanie, co wpływa negatywnie na produkcję biomasy. Wpływ ten był istotny tylko dla zbioru w czerwcu (I termin), natomiast zanikał z biegiem czasu i dla zbioru w sierpniu (II termin i odrost) nie był już istotny. Prawdopodobnie zjawisko letniej suszy było na tyle silne, że zwiększone nagrzewanie gruntu nie obniżało już istotnie warunków wodnych, podczas gdy wiosną przy większej wilgotności gleby miało jeszcze wpływ. Tym niemniej wyniki wskazują, że zależność pomiędzy produkcją biomasy a warunki wilgotnościowymi

określonymi za pomocą TWI, jest stała i może posłużyć do modelowania produkcji biomasy nadziemnej. Wyniki wskazują również, że oszacowana na podstawie rzeźby terenu wilgotność koreluje z wilgotnością chwilową mierzoną w terenie (Tab. 3)

Na to, jakie gatunki utrzymają się w składzie runi w dużym stopniu wpływają zabiegi stosowane przez człowieka (Zarzycki i Korzeniak 2013). Stwarza to konieczność użytkowania zbiorowisk trawiastych w taki sposób, by z jednej strony uzyskać wystarczającą wydajność paszową, a z drugiej zachować różnorodność biologiczną. Obecnie w wielu krajach Europy obserwuje się tendencję do urozmaicania składu florystycznego nawet gatunkami dotychczas uznawanymi za chwasty (Jankowska-Huflejt i Domański 2008). Ma to korzystny wpływ nie tylko na środowisko, lecz także na samą wartość paszy. Przykładowo - rośliny z rodziny bobowatych i zioła zawierają substancje antyseptyczne wpływające korzystnie na zdrowie zwierząt. (Grzegorzczak i Gołębiowska 2008), co pozwala na zmniejszenie udziału antybiotyków w diecie wypasanych zwierząt. Wyniki badań prowadzonych w Holandii wskazują, że półnaturalne, bogate w gatunki łąki wykazują mniejsze spadki produkcji biomasy w wyniku anomalii termicznych i suszy niż sztuczne, podsiewane, ubogie w gatunki łąki (De Keersmaecker et al. 2016). Autorzy wskazują, że zwiększanie bogactwa gatunkowego, przy jednoczesnym niskim poziomie zgrzyzania i wykaszania będzie działać łagodząco wpływ ekstremów klimatycznych na produkcję biomasy (De Keersmaecker i inni 2016). Uzyskane w tej pracy wyniki wskazują, że utrzymywanie w runi dużej liczby gatunków nie jest związane z spadkiem produktywności (Tab. 2).

4.2 Wnioski

Wyniki badań wskazują, że głównym czynnikiem warunkującym produkcję nadziemnej biomasy jest wilgotność podłoża, której zróżnicowanie wynika z rzeźby terenu. Produkcja biomasy nie odbiega od innych obiektów tego typu, z podobnymi gatunkami traw dominującymi w runi. Wysokie bogactwo gatunkowe sugeruje, że ekstensywne pastwiska w Radomierzu są zdolne pełnić wiele różnych usług ekosystemowych, zapewniają wysoką jakość paszy i są zdolne do utrzymywania stałej produktywności w warunkach ekstremów klimatycznych.

5. Literatura

- Conrad O, Bechtel B, Bock M et al. (2015) System for Automated Geoscientific Analyses (SAGA) v. 2.1.4. *Geosci. Model Dev.* 8: 1991–2007
- De Keersmaecker W, Van Rooijen N, Lhermitte S et al. (2016) Species-rich semi-natural grasslands have a higher resistance but a lower resilience than intensively managed agricultural grasslands in response to climate anomalies. *Journal of applied ecology*, 53(2): 430-439
- Dradrach A, Zdrojewski Z (2008) Ocena produktywności runi łąkowej po podsianiu mieszanką jednoroczną. *Łąkarstwo w Polsce* 11: 247-259
- Grzegorzczak S, Gołębiowska A (2008) Wpływ dodatku babki lancetowatej na produktywność mieszanki *Festuca pratensis* z *Lotus corniculatus*. *Łąkarstwo w Polsce* 11: 57-66.
- Hengl T, Reuter HI, (2008) *Geomorphometry: Concepts, Software, Applications*. *Developments in Soil Science* vol. 33: 772
- Hönigová I, Vačkář D, Lorencová E et al. (2012) Survey on grassland ecosystem services. Report of the European Topic Centre on Biological Diversity. Nature Conservation Agency of the Czech Republic: 78.
- Jankowska-Huflejt H, Domański PJ (2008) Aktualne i możliwe kierunki wykorzystania trwałych użytków zielonych w Polsce. *Woda - środowisko - obszary wiejskie* 2008 t. 8 z.2b (24): 31-49
- Janssen J, Rodwell J, Garcia Criado M et al. (2016) *European Red List of Habitats*. Part 2. Terrestrial and freshwater habitats: 44
- Kasperczyk M, Szewczyk W, Kacorzak P (2008) Produktywność azotu na łące górskiej. *Łąkarstwo w Polsce* 10: 111-118
- Szymura TH, Szymura M (2019) Spatial structure of grassland patches in Poland: Implications for nature conservation. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 88(1): 1-13.

- Twardy S, Kopacz M, Matoga W (2015) Zmienność produkcji biomasy na górskich użytkach zielonych w zależności od położenia nrm oraz ekspozycji stoków. Łąkarstwo w Polsce 18: 213-227
- Zarzycki J, Korzeniak J (2013) Łąki w polskich Karpatach – stan aktualny, zmiany i możliwości ich zachowania. Roczniki Bieszczadzkie 21: 18-34.

6. Rośliny stosowane w preparatach przeciwbólowych dostępnych w sprzedaży

Plants used in analgesic preparations available in trade

Katarzyna Możdżeń⁽¹⁾, Natalia Cebula⁽²⁾, Beata Barabasz-Krasny⁽²⁾

⁽¹⁾Katedra Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny im. KEN w Krakowie

⁽²⁾Katedra Botaniki, Instytut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny im. KEN w Krakowie

Katarzyna Możdżeń: katarzyna.mozdzen@up.krakow.pl

Słowa kluczowe: ziołolecznictwo, leki ziołowe, terapia przeciwbólowa

Streszczenie

Opracowanie to jest rodzajem przeglądu, dotyczącego roślin leczniczych stosowanych w preparatach przeciwbólowych, dostępnych w aptekach i sklepach zielarskich na terenie Polski. Celem pracy było zaprezentowanie wykazu grupy roślin leczniczych, które najczęściej wchodzi w skład preparatów i mieszanek ziołowych, wykorzystywanych w terapii różnego rodzaju bólów. Artykuł zawiera wykaz 80 gatunków roślin leczniczych z 42 rodzin, dziko rosnących i uprawianych w Polsce oraz sprowadzanych z różnych stref klimatycznych świata, z podaniem popularnych preparatów przeciwbólowych, w których stosowane są ich substraty zielarskie.

1. Wstęp

Rośliny stanowią bardzo istotny składnik światażywionego, m.in. dostarczają tlenu do atmosfery, a pochłaniają dwutlenek węgla, który jest szkodliwy dla środowiska. Człowiekowi trudno jest wyobrazić sobie życie bez nich. Początkowo stanowiły podstawę diety, ale z czasem ludzie odkrywali ich inne zastosowania. Wykorzystywano je, m.in. do budowy schronień, sporządzania ubrań, garbowania skóry, a także jako środki higieniczne i inne. Niektóre z nich miały przypisane pewne cechy magiczne. Ludzie przez długoletnie obserwacje odkryli jeszcze jedną i może najważniejszą właściwość roślin. Zaobserwowali bowiem, że niektóre substraty roślinne stosowane doustnie i używane zewnętrznie uwalniają od różnych dolegliwości bólowych oraz przewlekłych chorób (Sarwa 2001).

Obecnie coraz więcej osób interesuje się ziołolecznictwem. Wzrasta przekonanie o poprawie zdrowia dzięki zażywaniu naturalnych leków ziołowych, zwłaszcza że nastąpił ogromny wzrost chemizacji środowiska, związany z rozwojem naszej cywilizacji. Stąd widoczny jest wyraźny powrót do leków naturalnych. Rośliny lecznicze może uprawiać każdy, jeśli ma do tego odpowiednie warunki i wie, jak się nimi prawidłowo zajmować.

Zaletą surowców roślinnych jest wielokierunkowość działania oraz fakt, że oprócz obecności substancji czynnych posiadają one wiele witamin, biokatalizatorów, enzymów i mikroelementów, poprawiających funkcjonowanie całego organizmu. Ziołolecznictwo, nazywane również fitoterapią, jest metodą, która „dba o zdrowie w czasie choroby”, oczywiście przy odpowiednim stosowaniu preparatów ziołowych. Leki ziołowe, w odróżnieniu do leków syntetycznych, są lepiej tolerowane przez nasz organizm i nie uzależniają nas tak szybko, mimo ich dłuższego stosowania. Dlatego w leczeniu przewlekłych chorób coraz częściej zastępuje się leki syntetyczne preparatami ziołowymi. Tradycyjnie leki roślinne można stosować w postaci: naparów, nalewek, odwarów, maceratów, czy wyciągów alkoholowych. Najczęściej robi się napary i herbatki, które najłatwiej jest sporządzić. Jednak na półkach sklepowych coraz częściej spotyka się zioła w formie powlekanych tabletek, pastylek, drażetek, maści, aerozoli, kapsułek i czopków, które są łatwiejsze do dawkowania. Z pewnością wpływa to jeszcze bardziej na popularność i dostępność leczniczych preparatów ziołowych (Senderski 2007).

Celem podjętej analizy jest prezentacja wykazu oraz charakterystyka roślin leczniczych stosowanych w popularnych preparatach przeciwbólowych, dostępnych w aptekach i sklepach

zielarskich. Opracowanie to uwzględnia przykładową ofertę preparatów, jako pewien obraz możliwości wykorzystania roślin w określonej terapii.

2. Materiał

Materiały do opracowania zebrano w 2015 roku, na podstawie przeglądu składów suplementów diety, mieszanek oraz leków zioło-pochodnych i innych, wykorzystywanych w leczeniu i niwelowaniu różnych rodzajów bólu, dostępnych w sprzedaży w aptekach oraz sklepie zielarskim w południowej Polsce (Kleszczów woj. łódzkie 51°13'N 19°18'E – dwie apteki oraz Tychy woj. śląskie 50°07'25"N 18°59'12"E – sklep zielarski). W oparciu o zebrane informacje sporządzono listę roślin leczniczych. Przy charakterystyce gatunków podano: nazwę łacińską wraz z autorami, rodzinę, status występowania: D – gatunki dziko rosnące, U – gatunki uprawiane, D/U – jednocześnie dziko rosnące i uprawiane, S – gatunki sprowadzane, a także preparat lub preparaty, w których stosuje się daną roślinę. Nazewnictwo gatunków rodzimych i uprawianych przyjęto za opracowaniem „Flora Polski – atlas-roślin” (<https://www.atlas-roslin.pl/>), a gatunków sprowadzanych za Podbielkowskim i Studnik-Wójcikowską (2003). Wykorzystując klasyfikację rodzajów bólu wg Dobrogowskiego i in. (2011) sporządzono również zestawienie odnotowanych roślin leczniczych stosowanych w terapii określonych rodzajów bólu.

3. Wyniki i Dyskusja

Aktualnie w sprzedaży pojawia się coraz więcej preparatów ziołopochodnych i suplementów diety, które oferują różne firmy farmaceutyczne. Bardzo często nie różnią się one znacznie pod względem składu, a nawet stanowią modyfikację mieszanek już dobrze znanych. Warto zatem poznać podstawowe substraty roślinne, choćby te najczęściej wykorzystywane w terapiach różnych rodzajów bólu. W niniejszym opracowaniu zamieszczono 80 gatunków roślin leczniczych, deklarowanych w preparatach przeciwbólowych, dostępnych w handlu (Tab.1). Zaklasyfikowano je do 42 różnych rodzin. Najliczniej reprezentowanymi rodzinami okazały się: Asteraceae (14 gatunków), Lamiaceae (8 gatunków). Z rodzin Apiaceae i Rosaceae odnotowano po 5 przedstawicieli, a z rodziny Fabaceae 4. Pozostałe rodziny reprezentowane były przez – 3 do 1 gatunków.

Wśród roślin leczniczych największą grupę stanowią taksony dziko rosnące, z których pozyskuje się wysokiej jakości surowiec zielarski (D=29 gatunków). Nieco mniej odnotowano gatunków uprawianych (U=24 gatunki) oraz takich, które występują u nas, zarówno w stanie dzikim, jak i w uprawie (D/U=19 gatunków). W analizowanych preparatach najmniej odnotowano gatunków sprowadzanych z innych, nierzadko tropikalnych stref klimatycznych (S=8 gatunków).

Tab.1. Wykaz gatunków i preparatów przeciwbólowych, w których mają zastosowanie ich surowce zielarskie; status występowania: **D** – gatunki dziko rosnące, **U** – gatunki uprawiane, **D/U** – jednocześnie dziko rosnące i uprawiane, **S** – gatunki sprowadzane.

Np.	Nazwa gatunku/ rodzina / status występowania	Preparaty przeciwbólowe zawierające substraty z danej rośliny
1.	<i>Achillea millefolium</i> L. (Asteraceae) D/U	Artecholin N, Digestosan, Entersol, Fito-Mix VI (mieszanka ziołowa przeciw nadkwasocie), Gargaroten fix (zioła do płukania gardła), Herbosan, Krwawnik ziele
2.	<i>Adonis vernalis</i> L. (Ranunculaceae) D/U	Cardiol C
3.	<i>Aesculus hippocastanum</i> L. (Hippocastanaceae) D/U	Bronchial fix, Fitoven, Hemorol, Venescin, Venoforton
4.	<i>Allium sativum</i> L. (Alliaceae) U	Alliofil
5.	<i>Aloë arborescens</i> Mill. (Asphodelaceae) S	Biostymina, Gardlox
6.	<i>Althaea officinalis</i> L. (Malvaceae) U	Amolowe – na gardło, Bronchial fix, Digestosan, Fito-Mix VI, Gastrosan,

Np.	Nazwa gatunku/ rodzina / status występowania	Preparaty przeciwbólowe zawierające substraty z danej rośliny
		Species pectorales Planta, Tussi pico (na podrażnienie gardła i krtani)
7.	<i>Angelica archangelica</i> L. ssp. <i>archangelica</i> (= <i>Archangelica officinalis</i> Hoffm.) (Apiaceae) D/U	Nervosol K
8.	<i>Arnica montana</i> L. (Asteraceae) D/U	Dentosept, Maść arnikowa, Nalewka z koszyczka arniki, Nalewka z kwiatu arniki, Venoforton
9.	<i>Artemisia abrotanum</i> L. (Asteraceae) U	Artecholin N, Enterosol
10.	<i>Artemisia absinthium</i> L. (Asteraceae) D/U	Fix piołun
11.	<i>Betula pendula</i> Roth (Betulaceae) D	Gardlox, Urosan fix, Urosept
12.	<i>Brassica nigra</i> (L.) W.D.J. Koch (Brassicaceae) U	Gorzycza czarna, Hemerol, Montana Haustropfen
13.	<i>Calendula officinalis</i> L. (Asteraceae) U	Biogran B, Hemostin, Koszyczek nagietka, Reumosol
14.	<i>Carum carvi</i> L. (Apiaceae) D/U	Fito-Mix X (mieszanka ziołowa przeczyszczająca)
15.	<i>Chamomilla recutita</i> (L.) Rauschert (= <i>Matricaria chamomilla</i> L.) (Asteraceae) D/U	Bronchial fix, Dentosept, Gastrosan, Hemorol, Herbitussin na gardło, Herbosan, Urosept
16.	<i>Chelidonium majus</i> L. (Papaveraceae) D	Krem z jaskółczego ziela
17.	<i>Cichorium intybus</i> L. (Asteraceae) D	Urosan fix
18.	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl. (= <i>C. verum</i> J.Presl) (Lauraceae) S	Amol, Aromatol
19.	<i>Citrus limon</i> Burm. (Rutaceae) S	Amol, Aromatol, Olejek cytrynowy
20.	<i>Cnicus benedictus</i> L. (Asteraceae) U	Artecholin N, Digestosan
21.	<i>Convallaria majalis</i> L. (Convallariaceae) D/U	Cardiol C, Cardiosan, Krople nasercowe
22.	<i>Crataegus laevigata</i> (Poir.) DC. (= <i>C. oxyacantha</i> L.) (Rosaceae) D	Cardial C, Cardiogran, Cardiosan, Circulosan, Fitoven, Krople nasercowe, Neospasmina, Venoforton, Viscoten
23.	<i>Sarothamnus scoparius</i> (L.) Wimm. ex W.D.J. Koch (= <i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link) (Fabaceae) D	Cardiosan, Viscoten
24.	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench (Asteraceae) U	Hamadest Compositium, Succus Echinaceae
25.	<i>Elymus repens</i> (L.) Gould (Poaceae) D	Fito-Mix VI (mieszanka ziołowa przeciw nadkwasocie), Viscoten
26.	<i>Epilobium parviflorum</i> Schreb. (Onagraceae) D	Wierzbownica drobnokwiatowa – zioła w tabletkach
27.	<i>Equisetum arvense</i> L (Equisetaceae) D	Cardiosan, Circulosan, Fitolizyna nefrocaps, NefroTabs, Skrzyp fix, Urosan fix, Viscoten
28.	<i>Eucalyptus globulus</i> Lab. (Myrtaceae) S	Gardlox, Olejek eukaliptusowy
29.	<i>Euphrasia rostkoviana</i> Hayne (Scrophulariaceae) D	Homeopatyczne krople do oczu ze świetlikiem, Świetlik fix
30.	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (Apiaceae) U	Bronchial fix, Koper włoski
31.	<i>Frangula alnus</i> Mill. (Rhamnaceae) D	Alax, Fito-Mix X (mieszanka ziołowa przeczyszczająca)
32.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (Fabaceae) U	Alax, Fito-Mix VI, Species pectorales Planta

Np.	Nazwa gatunku/ rodzina / status występowania	Preparaty przeciwbólowe zawierające substraty z danej rośliny
33.	<i>Hamamelis virginiana</i> L. (Hamamelidaceae) U	Hamadest Compositium
34.	<i>Humulus lupulus</i> L. (Cannabaceae) D	Furoxin, Nervosol K
35.	<i>Hypericum perforatum</i> L. (Hypericaceae) D	Dziurawiec, Gastrogran
36.	<i>Juglans regia</i> L. (Juglandaceae) D/U	Fito-Mix IX (zioła przeciwbiegunkowe), Liść orzecha włoskiego – ziele pojedyncze
37.	<i>Lamium album</i> L. (Lamiaceae) D	Gargaroten-fix (zioła do płukania gardła)
38.	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. (Lamiaceae) U	Amol, Aromatol, Circulosan, Naturalny olejek eteryczny – lawendowy (ETJA), Nervosol K
39.	<i>Leonurus cardiaca</i> L. (Lamiaceae) D	Cardiogran, Cardiosan, Viscoten
40.	<i>Levisticum officinale</i> W.D.J.Koch (Apiaceae) U	Cardiosan, Fitolizyna nefrocaps, Gastrogran
41.	<i>Linum usitatissimum</i> L. (Linaceae) U	Fito-Mix VI, Len – zioła w tabletkach
42.	<i>Melissa officinalis</i> L. (Lamiaceae) U	Circulosan, Dexacaps, Nervosol K
43.	<i>Mentha ×citrata</i> Ehrh. (= <i>M. ×piperita</i> L.) (Lamiaceae) U	Amol, Amolowe – na gardło, Artecholin N, Digestosan, Isla cassis – łagodzi kaszel i chrypkę, Krople miętowe, Mięta fix, Olejek miętowy
44.	<i>Morus alba</i> L. (Moraceae) D/U	Morwa biała
45.	<i>Oxycoccus palustris</i> Pers. (Ericaceae) D	Furoxin
46.	<i>Panax ginseng</i> C. A. Mey (Araliaceae) S	Ekodis Żeń-szeń
47.	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) A. W. Hill (= <i>P. sativum</i> Hoffm.) (Apiaceae) U	Femisept URO, Fitolizyna nefrocaps, Urosept
48.	<i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Fabaceae) U	NefroTabs, Urosept
49.	<i>Polygonum aviculare</i> L. (Polygonaceae) D	NefroTabs
50.	<i>Potentilla erecta</i> (L.) Raeusch. (Rosaceae) D	Hemorol
51.	<i>Quercus robur</i> L. (Fagaceae) D	Dentosept, Entersol
52.	<i>Rheum palmatum</i> L. (Polygonaceae) U	Fito-Mix X, Korzeń rzewienia
53.	<i>Ribes nigrum</i> L. (Grossulariaceae) D/U	Fitolizyna nefrocaps, Isla cassis
54.	<i>Rosa canina</i> L. (Rosaceae) D	Biogran B, Bronchial fix, Cardiosan
55.	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae) U	Liść rozmarynu
56.	<i>Rubus idaeus</i> L. (Rosaceae) D/U	Fito-Mix IX
57.	<i>Ruscus aculeatus</i> L. (Asparagaceae) S	Cyclovena
58.	<i>Ruta graveolens</i> L. (Rutaceae) U	Circulosan, Fitoven, Viscoten
59.	<i>Salix purpurea</i> L. (Salicaceae) D	Entersol, Herbosan
60.	<i>Salvia officinalis</i> L. (Lamiaceae) U	Dentosept, Entrosol, Gardlox, Gastrogran, Tysal – spray
61.	<i>Sambucus nigra</i> L. (Caprifoliaceae) D/U	Herbitussin – pastylki na kaszel i gardło, Tussi pico – na podrażnienie gardła i krtani
62.	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn. (Asteraceae) U	Artecholin N
63.	<i>Sinapis alba</i> L. (Brassicaceae) D/U	Fito-Mix VI
64.	<i>Solidago virgaurea</i> L. (Asteraceae) D	Fitoven
65.	<i>Sorbus aucuparia</i> L. em. Hedl. (Rosaceae) D/U	Circulosan, Pulmonaria Spezial

Np.	Nazwa gatunku/ rodzina / status występowania	Preparaty przeciwbólowe zawierające substraty z danej rośliny
66.	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perry (= <i>Eugenia caryophyllata</i> Thunb.) (Myrtaceae) S	Aromatol, Olejek goździkowy
67.	<i>Tanacetum vulgare</i> L. (Asteraceae) D	Kwiat wrotyczu
68.	<i>Taraxacum officinale</i> F. H. Wigg. (Asteraceae) D	Artecholin N
69.	<i>Thymus vulgaris</i> L. (Lamiaceae) U	Amolowe – na gardło, Dentosept, Enterosol, Gardlox, Herbitussin – pastylki na kaszel i gardło, Tussi pico – na podrażnienia gardła i krtani, Tymianek i podbiał, Tymsal – spray
70.	<i>Tilia cordata</i> Mill. (Tiliaceae) D/U	Dexacaps, Fitoven, Herbitussin – pastylki na kaszel i gardło, Lipa fix, Lipomal
71.	<i>Trigonella foenum-graecum</i> L. (Fabaceae) U	Gastrogran, Fitolizyna
72.	<i>Tussilago farfara</i> L. (Asteraceae) D	Tymianek i podbiał – pastylki na gardło
73.	<i>Urtica dioica</i> L. (Urticaceae) D	Alliofil, NefroTabs
74.	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. (Ericaceae) D	Urosan fix, Urosept
75.	<i>Valeriana officinalis</i> L. (Valerianaceae) D/U	Cardial C, Cardiosan Pulmonaria Spezial, Circulosan, Krople nasercowe, Krople walerianowe, Neospasmina, Nervosol K
76.	<i>Verbascum densiflorum</i> Bertol. (= <i>V. thapsiforme</i> Schrad.) (Scrophulariaceae) D	Herbitussin – pastylki na kaszel i gardło
77.	<i>Verbena officinalis</i> L. (Verbenaceae) D	NefroTabs
78.	<i>Viburnum opulus</i> L. (Caprifoliaceae) D/U	Hemorol
79.	<i>Viola tricolor</i> L. (Violaceae) D	Bratek fix, Bronchial fix
80.	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Zingiberaceae) S	Lokomotiv

W analizowanej grupie najwięcej znalazło się gatunków z rodziny astrowate (Asterace), ponieważ jest to jedna z liczniejszych rodzin, nie tylko w naszej rodzimej florze (Szafer i Zarzycki 1972), ale i florze całego świata – obejmuje bowiem aż 25 000 gatunków (Kochanowska i Nowak 2003). Również dość często w preparatach przeciwbólowych używa się gatunków z rodziny jasnotowate (Lamiaceae), które obfitują w olejki eteryczne, garbniki i inne substancje lecznicze, co jest wykorzystywane nie tylko w ziołolecznictwie, lecz również w kosmetyce lub kuchni (Sarwa 2001). Przykładem tego rodzaju uniwersalnych roślin są chociażby mięta pieprzowa (*Mentha × citrata*), czy lawenda wąskolistna (*Lavandula angustifolia*) stosowane, m.in. jako składnik popularnego leku przeciwbólowego jakim jest Amol. Wiele ziół z rodziny jasnotowate wykorzystuje się do tworzenia różnego rodzaju mieszanek, które współdziałając ze sobą, przyczyniają się do poprawy pracy układu pokarmowego, podnosząc jednocześnie walory smakowe potraw (Ożarowski i Jaroniewski 1987; Macků i Krejča 1989; Senderski 2007).

Wśród odnotowanych ziół, większość pozyskuje się ze stanu dzikiego lub uprawia w naszych warunkach klimatyczno-glebowych (Tab.1). Jest to naturalne, ponieważ świeżość substratu zielarskiego jest elementem niezbędnym w uzyskaniu jego najwyższej jakości. Rośliny dziko rosnące stosowane w przemyśle farmaceutycznym, w tym również te wykorzystywane do sporządzania preparatów przeciwbólowych, zbiera się w rejonach oddalonych od aglomeracji miejskich, tak aby zanieczyszczenia przemysłowe jak najmniej wpływały na substrat zielarski. Kontrolowane warunki upraw zielarskich również są czynnikiem niezbędnym w utrzymaniu jakości substratu (Nowiński 1980; Rumińska 1983). Niektóre gatunki, takie jak: eukaliptus gałkowy (*Eucalyptus globulus*), imbir (*Zingiber officinale*), czy żeń-szeń (*Panax ginseng*), oplaca się sprowadzać z innych stref klimatycznych, ponieważ ich uprawa na miejscu nie byłaby uzasadniona

ze względów ekonomicznych. Warto oczywiście zadbać, aby warunki transportu ich substratów były odpowiednie.

Człowiek zмага się w swoim życiu z różnorodnymi dolegliwościami zdrowotnymi, którym nierzadko towarzyszy uporczywy ból. Jest to przykry i uciążliwy stan umysłowy i emocjonalny, wiążący się z realnym lub hipotetycznym niebezpieczeństwem dla życia. Często nam towarzyszący, może mieć charakter ostry lub przewlekły, który utrzymuje się nawet do kilku miesięcy. W zależności od miejsca występowania dolegliwości wyróżnić można bóle: powierzchniowe lub wewnętrzne. Ból jest przede wszystkim bodźcem, który ostrzega nasz organizm o potencjalnym zagrożeniu dla zdrowia (Dobrogowski i in. 2011). Jak pokazały przeprowadzone tu analizy, roślin używanych w leczeniu stanów bólowych jest wiele i stosowane są one w preparatach w różnych kombinacjach (Tab.1-2). Do gatunków najczęściej wykorzystywanych należą: głóg dwuszyjkowy (*Crataegus laevigata*) – w 9 preparatach), mięta pieprzowa (*Mentha ×citrata*), macierzanka tymianek (*Thymus vulgaris*), kozłek lekarski (*Valeriana officinalis*) – w 8 preparatach, krwawnik pospolity (*Achillea millefolium*), prawoślaz lekarski (*Althaea officinalis*), skrzyp polny (*Equisetum arvense*), rumianek pospolity (*Chamomilla recutita*) – w 7 preparatach (Tab.1). Wszystkie z odnotowanych tutaj gatunków stosuje się w terapiach bólów głębokich, a z tej grupy jednocześnie 16 używa się również w zwalczaniu bólów powierzchniowych (Tab.2). Najwięcej roślin ma zastosowanie w terapii układów: pokarmowego – bólów żołądka, wątroby, żylaków odbytu (59 gatunków), układu oddechowego – bólów gardła, jamy ustnej (30 gatunków), układu wydalniczego – bólów nerek, pęcherza moczowego (29 gatunków) oraz układu krwionośnego – bólów serca (22 gatunki).

Tab.2. Wykaz gatunków roślin leczniczych stosowanych w terapii różnych rodzajów bólu (wg Dobrogowskiego i in. 2011), odnotowanych w analizowanych preparatach.

Rodzaj bólu	Rośliny wykorzystywane w terapii określonego rodzaju bólu
Bóle powierzchniowe:	
skórne	<i>Aesculus hippocastanum</i> , <i>Aloë arborescens</i> , <i>Chelidonium majus</i> , <i>Citrus limon</i> , <i>Euphrasia rostkoviana</i> , <i>Hamamelis virginiana</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Syzygium aromaticum</i>
zranienia	<i>Calendula officinalis</i> , <i>Cinnamomum cassia</i> , <i>Echinacea purpurea</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Tilia cordata</i>
stłuczenia	<i>Arnica montana</i> , <i>Hamamelis virginiana</i>
oparzenia	<i>Aloë arborescens</i> , <i>Calendula officinalis</i> , <i>Echinacea purpurea</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Tilia cordata</i>
odmrożenia	<i>Quercus robur</i> , <i>Sambucus nigra</i>
Bóle głębokie:	
układu krwionośnego – m.in. bóle serca	<i>Achillea millefolium</i> , <i>Adonis vernalis</i> , <i>Allium sativum</i> , <i>Arnica montana</i> , <i>Convallaria majalis</i> , <i>Crataegus laevigata</i> , <i>Elymus repens</i> , <i>Equisetum arvense</i> , <i>Hamamelis virginiana</i> , <i>Leonurus cardiaca</i> , <i>Morus alba</i> , <i>Panax ginseng</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Polygonum aviculare</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Ruscus aculeatus</i> , <i>Ruta graveolens</i> , <i>Sarothamnus scoparius</i> , <i>Vaccinium vitis-idaea</i> , <i>Viburnum opulus</i> , <i>Viola tricolor</i> , <i>Zingiber officinale</i>
układu pokarmowego – m.in. bóle żołądka, wątroby, żylaków odbytu	<i>Achillea millefolium</i> , <i>Aesculus hippocastanum</i> , <i>Allium sativum</i> , <i>Aloë arborescens</i> , <i>Althaea officinalis</i> , <i>Angelica archangelica</i> ssp. <i>archangelica</i> , <i>Arnica montana</i> , <i>Artemisia abrotanum</i> , <i>Artemisia absinthium</i> , <i>Betula pendula</i> , <i>Calendula officinalis</i> , <i>Carum carvi</i> , <i>Chamomilla recutita</i> , <i>Chelidonium majus</i> , <i>Cichorium intybus</i> , <i>Cinnamomum cassia</i> , <i>Citrus limon</i> , <i>Cnicus benedictus</i> , <i>Equisetum arvense</i> , <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Frangula alnus</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Hamamelis virginiana</i> , <i>Humulus lupulus</i> , <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Juglans regia</i> , <i>Lavandula angustifolia</i> , <i>Leonurus cardiaca</i> , <i>Levisticum officinale</i> , <i>Linum</i>

Rodzaj bólu	Rośliny wykorzystywane w terapii określonego rodzaju bólu
	<i>usitatissimum, Melissa officinalis, Mentha ×citrata, Petroselinum crispum, Polygonum aviculare, Potentilla erecta, Quercus robur, Rheum palmatum, Ribes nigrum, Rosa canina, Rosmarinus officinalis, Rubus idaeus, Ruta graveolens, Salix purpurea, Salvia officinalis, Silybum marianum, Sinapis alba, Solidago virga-aurea, Sorbus aucuparia, Syzygium aromaticum, Taraxacum officinale, Thymus vulgaris, Trigonella foenum-graecum, Urtica dioica, Valeriana officinalis, Verbena officinalis, Viburnum opulus, Viola tricolor, Zingiber officinale</i>
układu wydalniczego – m.in. bóle nerek, pęcherza moczowego	<i>Adonis vernalis, Artemisia abrotanum, Betula pendula, Chamomilla recutita, Cichorium intybus, Cnicus benedictus, Elymus repens, Equisetum arvense, Levisticum officinale, Melissa officinalis, Morus alba, Oxycoccus palustris, Panax ginseng, Petroselinum crispum, Phaseolus vulgaris, Ribes nigrum, Ruta graveolens, Sambucus nigra, Sarothamnus scoparius, Solidago virga-aurea, Sorbus aucuparia, Taraxacum officinale, Urtica dioica, Vaccinium vitis-idaea, Valeriana officinalis, Verbascum densiflorum, Verbena officinalis, Viburnum opulus, Viola tricolor</i>
układu oddechowego – m.in. bóle gardła, jamy ustnej	<i>Adonis vernalis, Allium sativum, Aloë arborescens, Althaea officinalis, Calendula officinalis, Chamomilla recutita, Citrus limon, Echinacea purpurea, Eucalyptus globulus, Euphrasia rostkoviana, Glycyrrhiza glabra, Hamamelis virginiana, Juglans regia, Lamium album, Levisticum officinale, Mentha ×citrata, Morus alba, Potentilla erecta, Quercus robur, Rosa canina, Rosmarinus officinalis, Salvia officinalis, Sambucus nigra, Solidago virga-aurea, Thymus vulgaris, Tilia cordata, Tussilago farfara, Verbascum densiflorum, Verbena officinalis, Viola tricolor</i>
narządów płciowych – m.in. bóle gruczołu krokowego	<i>Epilobium parviflorum, Viburnum opulus</i>
bóle gośćcowe (reumatyczne)	<i>Adonis vernalis, Aesculus hippocastanum, Arnica montana, Brassica nigra, Crataegus laevigata, Melissa officinalis, Rosmarinus officinalis, Salix purpurea, Sinapis alba, Tanacetum vulgare, Taraxacum officinale, Urtica dioica</i>
bóle głowy	<i>Allium sativum, Arnica montana, Cinnamomum cassia, Citrus limon, Eucalyptus globulus, Oxycoccus palustris, Rubus idaeus, Salix purpurea, Sambucus nigra, Thymus vulgaris, Verbena officinalis</i>
bóle oczu	<i>Euphrasia rostkoviana, Sambucus nigra</i>
nerwobóle	<i>Adonis vernalis, Angelica archangelica ssp. archangelica, Humulus lupulus, Hypericum perforatum, Lavandula angustifolia, Salix purpurea, Tanacetum vulgare</i>

Wiele roślin leczniczych działa na kilka rodzajów dolegliwości bólowych nie związanych ze sobą. Stąd często te same gatunki mają zastosowanie w leczeniu, zarówno bólów powierzchniowych, jak i wewnętrznych (Rózański 2002/2003a; b). Duke (2011) opisał właściwości 22 roślin leczniczych w zwalczaniu różnych rodzajów bólu, m.in.: jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*), lukrecji gładkiej (*Glycyrrhiza glabra*), prawoślazu lekarskiego (*Althaea officinalis*), dziewanny drobnokwiatowej (*Verbascum densiflorum*) i innych. Z wymienionych przez tego autora gatunków aż 14 stwierdzono w preparatach przeciwbólowych dostępnych w sprzedaży (Tab.1).

Większość z odnotowanych w opracowaniu roślin jest opisywana w literaturze, jako gatunki mające szerokie zastosowanie w terapii nie tylko bólowej, ale także w innych rodzajach schorzeń (Kresánek i Krejča 1983; Ożarowski i Jaroniewski 1987; Senderski 2007). Na przykład fasola zwyczajna (*Phaseolus vulgaris* L.) wykorzystywana jest w neuropatii cukrzycowej, należącej do zespołu bólów neuropatycznych. Choroba ta charakteryzuje się występowaniem bólów w kończynach dolnych, a także nieprawidłowościami w autonomicznym układzie nerwowym. Strąki fasoli, które stanowią surowiec leczniczy, uzupełniają inne preparaty przeciwcukrzycowe, a nierzadko przyczyniają się do zmniejszenia porcji tychże leków. Oprócz tego można je wykorzystywać w chorobach pęcherza moczowego, nerek oraz w nadciśnieniu. Innym przykładem jest wierzba purpurowa (*Salix purpurea*). Zawarte w korze wierzby glikozydy fenolowe – np. salicyna, wykorzystywane są, m.in. w leczeniu przewlekłych bólów receptorowych. Bóle te występują głównie podczas chorób zwyrodnieniowych stawów, reumatoidalnych, a także chorób kręgosłupa oraz głowy. Napary i herbatki z kory wierzby są często stosowane, ponieważ działają w taki sam sposób, jak leki syntetyczne, a w odróżnieniu od nich nie wpływają szkodliwie na niektóre narządy wewnętrzne organizmu (Skarżyński 1994; Dobrogowski i in. 2011). Oczywiście lista gatunków wykorzystywanych w terapii przeciwbólowej jest większa i z pewnością przeprowadzone analizy nie wyczerpują tego rozległego tematu.

W fitoterapii, jako jednej z modnych w ostatnim czasie metod leczenia różnych schorzeń – m.in. bólowych, należy pamiętać, że preparaty sporządzone na bazie roślin leczniczych nie zawsze przynoszą szybkie i pożądane rezultaty. Na pewno odgrywają one ważną rolę w naszym organizmie i nie uzależniają w taki sposób, jak leki syntetyczne. Aby mówić o ukojeniu bólu, czy ogólnej poprawie zdrowia dzięki zażywaniu naturalnych środków, bardzo ważna jest ilość, sposób i jakość przyjmowanych preparatów ziołowych. Są to niezbędne warunki wszystkich skutecznych kuracji ziołowych.

4. Wnioski

W ostatnim czasie zwiększyła się sprzedaż leków sporządzonych na bazie roślin. Ludzie chętniej kupują zioła, które cechują się wielokierunkowością działania. Analizy deklarowanego składu preparatów, wykorzystywanych w różnych terapiach przeciwbólowych, pozwoliły na sporządzenie wykazu roślin leczniczych. Najwięcej taksonów z tej grupy pochodzi z Europy Środkowej i krajów śródziemnomorskich. Wszystkie odnotowane 80 gatunków, wykorzystuje się w terapii bólów głębokich, a 16 z nich znajduje zastosowanie w leczeniu, zarówno bólów głębokich, jak i powierzchniowych. Preparaty przeciwbólowe sporządzane na bazie roślin najczęściej stosowane są w leczeniu dolegliwości bólowych układu pokarmowego, oddechowego, wydalniczego oraz krwionośnego.

5. Podziękowania

Autorki serdecznie dziękują za życzliwość pracownikom aptek „Dbam O Zdrowie” i „Przyjazna” w Kleszczowie oraz sklepu zielarskiego sieci „Eka Medica” w Tychach. Ponadto wyrażają wdzięczność Recenzentowi za bardzo cenne wskazówki udzielone w trakcie przygotowywania tego artykułu.

6. Literatura

- Dobrogowski J, Zajączkowska R, Dutka J, Wordliczek J (2011) Patofizjologia i klasyfikacja bólu. *Polski Przegląd Neurologiczny* 7 (1): 20–30.
- Duke AJ (2011). *Księga zdrowia. Ziołowa apteka domowa*. Wydawnictwo Publikat. ss. 612. Poznań.
- Flora Polski – atlas-roślin” (<https://www.atlas-roslin.pl/>) [dostęp 17.02.2002]
- Kochanowska J, Nowak T (2003) *Pomoce dydaktyczne dla nauczycieli odwiedzających ogród botaniczny we Wrocławiu*. Wydawnictwo U.T.R. Interior. ss. 124. Wrocław.
- Kresánek J, Krejča J (1983) *Rośliny lecznicze*. Wydawnictwo Sport i Turystyka. ss. 222. Warszawa.

- Macků J, Krejča J (1989) Atlas roślin leczniczych. Zakład Narodowy im. Ossolińskich. ss. 430. Wrocław.
- Nowiński M (1980) Dzieje upraw i roślin leczniczych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. ss. 335. Warszawa.
- Ożarowski A, Jaroniewski W (1987) Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych. ss. 436. Warszawa.
- Podbielkowski Z, Studnik-Wójcikowska B (2003) Słownik roślin użytkowych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. ss. 707. Warszawa.
- Różański H (2002/2003a) Wstęp do zielarstwa i fitoterapii. Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego Krosno-Poznań. <http://www.rozanski.ch/fitochemia.htm> [dostęp 25 lipca 2011]
- Różański H (2002/2003b) Zielarstwo i metody fitoterapii. Wszystko o ziołach i preparatach ziołowych. Część III. Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego Krosno. <http://www.rozanski.ch/fitoterapia1.htm> [dostęp 25 lipca 2011].
- Rumińska A (1983) Rośliny lecznicze: podstawy biologii i agrotechniki. Wyd. III. Wydawnictwo PWN. ss. 549. Warszawa.
- Sarwa AJ (2001) Wielki leksykon roślin leczniczych. Wydawnictwo Książka i Wiedza. ss. 444. Warszawa.
- Senderski ME (2007) Prawie wszystko o ziołach. Wyd. II. Wydawnictwo Mateusz E. Senderski. ss. 702. Podkowa Leśna.
- Skarżyński A (1994) Zioła czynią cuda. Wydawnictwo COMES. ss. 189. Warszawa.
- Szafer W, Zarzycki K (1972) Szata roślinna Polski. T. I. Wydawnictwo PWN. s. 55–70. Warszawa.

7. Ashwagandha – charakterystyka i właściwości zdrowotne

Ashwagandha - characteristics and health properties

Nowosad Karolina⁽¹⁾, Sujka Monika⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra Analizy i Oceny Jakości Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Monika Sujka, prof. uczelni

Nowosad Karolina: karo.nowosad@gmail.com

Słowa kluczowe: *Withania somnifera*, choroby neurodegeneracyjne, Ajurweda

Streszczenie

Withania somnifera (L.) zwana także ashwagandhą, jest indyjską rośliną posiadającą właściwości lecznicze. Jest jednym z najważniejszych ziół Ajurwedy, czyli tradycyjnego systemu medycznego w Indiach. Posiada wiele właściwości prozdrowotnych, które zostały potwierdzone przez wiele badań klinicznych. Wzmacnia układ nerwowy, chroniąc przed chorobami neurodegeneracyjnymi takimi jak: choroba Alzheimera i choroba Parkinsona, ma działanie antystresowe, pomaga regulować poziom kortyzolu. Niezwykle działanie ashwagandhy wynika z obecności unikalnych związków. Zielona część ashwagandhy zawiera witanolidy, które wykazują silne działanie antybakteryjne oraz antynowotorowe. W korzeniu ashwagandhy znajdziemy glikowitanolidy o działaniu adaptogennym (tj. wzmagające proces budowy odporności organizmu) oraz witanozydy. Posiada również właściwości antydepresyjne oraz zwiększa odporności organizmu.

1. Wstęp

Rośliny są jednym z najważniejszych źródeł leków na świecie. Obecnie duża liczba używanych leków pochodzi z roślin, takich jak morfina z *Papaver somniferum*, eugenol z *Sanktuarium Ocimum*, efedryna z efedryny pospolitej, atropina z *Atropa belladonna*, rezerpina z *Roulphia serpentina*. Rośliny lecznicze są bogate w metabolity wtórne oraz niezbędne oleje o znaczeniu terapeutycznym. Zaletami roślin leczniczych są: różnorodne zastosowanie w dolegliwościach, bezpieczeństwo, są łatwe do uzyskania, skuteczne i ekonomiczne. Każdy kraj ma w swojej tradycji listę ziół leczniczych, które stosowane są w leczeniu chorób i innych niepożądanych stanów u ludzi. Do takich roślin ziołowych należy ashwagandha (Singh i in. 2011).

Ashwagandha jest składnikiem wielu preparatów przepisywanych na różne schorzenia układu mięśniowo-szkieletowego (np. zapalenie stawów, reumatyzm) i jako ogólny środek wzmacniający, dodający energii, poprawiający ogólny stan zdrowia, wydłużający życie człowieka oraz zapobiegający chorobom u sportowców, osób starszych i podczas ciąży (Gacche i Dhole 2006). Wzmacnia funkcje mózgu i układu nerwowego oraz poprawia pamięć. Poprawia funkcjonowanie układu rozrodczego. Będąc silnym adaptogenem, zwiększa odporność organizmu na stres. Ashwagandha wzmacnia obronę organizmu przed chorobami, poprawiając odporność komórkową. Posiada również silne właściwości przeciwutleniające, które pomagają chronić przed uszkodzeniami komórkowymi powodowanymi przez wolne rodniki (Mishra i in. 2000).

Badania kliniczne potwierdzają terapeutyczne zastosowanie ashwagandhy w zaburzeniach lękowych, poznawczych, neurologicznych, zapaleniach oraz w chorobie Parkinsona. Chemoprewencyjne właściwości ashwagandhy sprawiają, że jest to potencjalnie przydatny dodatek dla pacjentów poddawanych radioterapii i chemioterapii. Ashwagandha jest również stosowana terapeutycznie jako adaptogen u pacjentów zmagających się z bezsennością i osłabieniem spowodowanym stresem oraz jako środek pobudzający odporność u pacjentów z niską liczbą białych krwinek we krwi (Verma i Kumar 2011).

2. Przegląd literatury

Withania somnifera (L.) (nazwa zwyczajowa - ashwagandha) to indyjska roślina lecznicza, która rośnie jako wiecznie zielony krzew w suchych częściach Indii, Beludżystanie, Pakistanie,

Afganistanie, Sri Lance, RPA, Egipcie, Maroku i Jordanii. W Indiach jest szeroko uprawiana w prowincjach Madhya Pradesh, Uttar Pradesh, równinach Pendżabu i północno-zachodnich częściach Indii, takich jak Gujarat i Rajasthan (Ambiye i in. 2013). Ashwagandha jest powszechnie znana jako „Indian Winter cherry” lub „Indian Ginseng”. Jest to jedno z najważniejszych ziół Ajurwedy, czyli tradycyjnego systemu medycznego w Indiach; używana przez tysiąclecia jako Rasayana ze względu na szerokie korzyści zdrowotne. Rasayana to ziołowy lub metaliczny preparat, który przedłuża młodzieńczy stan zdrowia fizycznego i psychicznego oraz powoduje szczęście. Tego rodzaju środki zaradcze podaje się małym dzieciom jako toniki, a także w średnim wieku i osobom starszym w celu zwiększenia długowieczności. Wśród ajurwedyjskich ziół Rasayany ashwagandha zajmuje najwybitniejsze miejsce. Ashwagandha jest powszechnie dostępna jako drobno przesiany proszek, który można mieszać z wodą, ghee (oczyszczonym masłem) lub miodem. W Ayurweda, świeże korzenie ashwagandhy, przed procesem suszenia, są czasami gotowane w mleku, w celu wypłukania niepożądanych składników (Singh i in. 2011). Jagody są używane jako substytut podpuszczki, do koagulacji mleka w produkcji sera. Ashwagandha w sanskrycie oznacza „zapach konia”, a w języku tamilijskim nazywa się Amukkrang Kilangu. Nazwa gatunku *somnifera* to po łacinie „wywołanie snu”, co oznacza, że przypisuje się jej właściwości uspokajające. Niektórzy ziołarze nazywają ashwagandha indyjskim żeń-szeniem, ponieważ jest on stosowany w medycynie ajurwedyjskiej w sposób podobny do tego, który stosuje się w tradycyjnej medycynie chińskiej (Verma i Kumar 2011).

Rośnie jako krótki krzew (35–75 cm) z centralną łodygą, z której gałęzie rozciągają się promieniście w gwiazdny wzór (gwiazdzisty). Kwiaty są małe i zielone, a dojrzałe owoce są pomarańczowo-czerwone i mają właściwości koagulujące mleko. Długie, brązowe, bulwiaste korzenie rośliny są wykorzystywane do celów leczniczych (Ambiye i in. 2013).

Biologicznie czynnymi składnikami chemicznymi są alkaloidy (anaferyna, anahigryna, witanina, somniferyna, tropina), steroidowe laktony (zanolidy, witanolidy A-Y), saponiny zawierające grupę acylową (sitoindozyd VII i VIII) oraz fitosterole (beta-sitosterol) (Mishra i in. 2000). Korzenie *Withania somnifera* składają się głównie ze związków znanych jako witanolidy, które mają swoje wyjątkowe właściwości lecznicze. Witanolidy to związki steroidowe, które przypominają, zarówno pod względem działania, jak i wyglądu, aktywne składniki żeń-szenia azjatyckiego (*Panax ginseng*) znane jako ginsenozydy. Witanolidy służą jako ważne prekursorzy hormonów, które w razie potrzeby mogą przekształcać się w ludzkie hormony fizjologiczne. Zgodnie z teorią, gdy występuje nadmiar pewnego hormonu, prekursor hormonu pochodzenia roślinnego zajmuje miejsca receptorów błony komórkowej, tak że właściwy hormon nie może się przyczepić i wywierać swój wpływ. Jeśli poziom hormonu jest niski, hormon pochodzenia roślinnego wywiera niewielki wpływ (Choudhary i in. 2012).

Szeroko zakrojone badania toksykologiczne Rani i in. (2005) wykazały, że ashwagandha jest nietoksyczna, gdy jest stosowana w rozsądnych dawkach. Nie należy przekraczać dawek, które są wskazane za bezpieczne dla spożycia przez ludzi. Na dzień dzisiejszy w literaturze przedmiotu nie odnotowano żadnych interakcji między ashwagandhą a innymi ziołami czy lekami.

Stwierdzono, że preparaty wytworzone z ashwagandhy odgrywają potencjalną rolę terapeutyczną w prawie wszystkich zaburzeniach związanych z OUN (Kulkarni i Dhir 2008). Choroba Alzheimera (AD) charakteryzuje się postępującą dysfunkcją pamięci i wyższych funkcji poznawczych. Obecnie nie ma lekarstwa, które w pełni wyleczyłoby z tej choroby, a badania skupiają się na lekach spowalniających postęp choroby lub zapewniających profilaktykę. *Withania somnifera* (WS) jest szeroko stosowana w medycynie ajurwedyjskiej jako środek wzmacniający nerwy i wzmacniający pamięć (Choudhary i in. 2012). Badanie przeprowadzone przez Kurapati i in. (2013) potwierdza neuroprotektoryjne działanie ekstraktu korzenia WS przeciwko β -amyloidowi, który indukuje neuropatogenezę. Choudhary i współpracownicy (2005) stwierdzili, że ananolidy 4-5 wyizolowane odpowiednio z *Withania somnifera* hamowały enzymy acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy. Ponadto związki wykazywały również zależne od dawki (0,005-1,0 mg/ml) skurczowe i antagonistyczne potencjały wobec Ca^{2+} w izolowanych preparatach jelita czczego królika. Zdolność do hamowania cholinoesterazy wraz z właściwościami antagonistycznymi wobec wapnia, może spowodować, że związki 1-5 będą potencjalnymi kandydatami na leki

w dalszych badaniach w leczeniu choroby Alzheimera i związanych z tym problemów. 6-hydroksydopamina (6-OHDA) jest związkami, który wywołuje w mózgu podobne skutki, które obserwujemy w przypadku choroby Parkinsona. W jednym z badań oceniono jak wpływa ekstrakt z ashwagandhy na chorobę Parkinsona indukowaną 6-OHDA u szczurów. W tym celu podawano wstępnie 100, 200 i 300 mg/kg masy ciała wyciągu z *W. somnifera* doustnie przez 3 tygodnie. W 21 dniu badania wstrzyknięto szczurom do prawego prążkowania roztwór 6-hydroksydopaminy. Trzy tygodnie po wstrzyknięciach 6-OHDA, szczury badano pod kątem aktywności neurobehawioralnej, a następnie uśmiercano w celu oceny lipidoperoksydacji, zawartości glutationu, aktywności S-transferazy glutationowej, reduktazy glutationowej, peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy, zawartości katecholaminy i ekspresji hydroksylazy tyrozynowej. Stwierdzono, że wyciąg *W. somnifera* poprawia wszystkie parametry w sposób zależny od dawki. Badanie pokazuje, że wyciąg z *W. somnifera* może być pomocny w ochronie neuronów w chorobie Parkinsona (Ahmad i in. 2005).

Wykazano również, że ekstrakty z ashwagandhy mają działanie przeciwpadaczkowe. *W. somnifera* i jej bioaktywne witanolidy skutecznie zmniejszają napady drgawkowe. Nauka motoryczna była znacznie upośledzona u szczurów z padaczką. Leczenie witanolidami znacząco odwróciło deficyt uczenia się motorycznego u szczurów z padaczką w porównaniu ze szczurami kontrolnymi (Soman i in. 2013).

Immunosupresja jest główną wadą niekonwencjonalnych terapii raka, takich jak radioterapia i chemioterapia. Obie metody mają niepożądane skutki uboczne, takie jak nudności, wymioty, łysienie, owrzodzenie błony śluzowej, zwłóknienie płuc, toksyczność sercowa i wątrobowa. Rośliny, które zawierają immunomodulatory mogłyby złagodzić te objawy, jednak są one wciąż bardzo rzadko używane we współczesnej medycynie (Davis i Kuttan 2000). Davis i Kuttan (2000) przeprowadzili badanie, w którym podawali myszom sproszkowany korzeń ashwagandhy. Stwierdzili, że podawanie ekstraktu ze sproszkowanego korzenia rośliny *Withania somnifera* stymuluje aktywność immunologiczną u myszy. Zaobserwowano wzrost liczby białych krwinek, poprawiła się również komórkowość szpiku kostnego.

Uważa się, że aktywność chemoprewencyjna jest częściowo wynikiem działania antyoksydacyjnego, wychwytyjącego wolne rodniki ekstraktu. Efekt chemoprewencyjny wykazano w badaniu ekstraktu z korzenia ashwagandhy na indukowanym raku skóry u myszy Swiss albino, której podano ashwagandhę przed i podczas ekspozycji na skórę środka rakotwórczego: 7,12-dimetylobenz[a]antracenu (Davis i Kuttan 2002).

W badaniu *in vitro* wykazano, że witanolidy z *Withania somnifera* hamują wzrost linii komórkowych raka piersi, centralnego układu nerwowego, płuc i okrężnicy u ludzi porównywalnie z doksorubicyną. Anaferyna A skuteczniej hamowała wzrost linii komórkowych raka piersi i okrężnicy niż doksorubicyna. Wyniki te sugerują, że ekstrakty *Withania somnifera* mogą zapobiegać lub hamować wzrost guza u pacjentów z rakiem i sugerować potencjał rozwoju nowych środków chemioterapeutycznych (Prakash i in. 2002).

Ashwagandha wykazuje również aktywność antybakteryjną. Owais i in. (2005) stwierdzili, że zarówno ekstrakty roślinne, jak i alkoholowe (zarówno korzeń, jak i liście) mają silną aktywność przeciwbakteryjną wobec szeregu bakterii. Ekstrakt metanolowy ma maksymalną aktywność hamującą wobec spektrum bakterii, w tym *Salmonella typhimurium*.

Z bulw korzeni *Withania somnifera* wyizolowano monomeryczną glikoproteinę, którą oznaczono „WSG” (*Withania somnifera* glycoprotein). Wykazywała ona silną aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko fitopatogennym grzybom i bakteriom. WSG wykazywał silną aktywność przeciwwgrzybiczą przeciwko *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum*, *F. verticilloides* i aktywność przeciwbakteryjną przeciwko *Clvibacter michiganensis subsp. michiganensis* (Girish i in. 2006).

Dhuley (2000) przeprowadził badanie na szczurach, którym podawał ashwagandhę. Suplementacja spowodowała zwiększenie wydolności u szczurów, znaczny wzrost względnej masy ciała, wzrost glikogenu w mięśniu sercowym i wątrobie, poprawę procesu krzepnięcia krwi. Na podstawie tych obserwacji stwierdzono, że ashwagandha posiada właściwości adaptogenne, kardiotropowe, kardioprotekcyjne i przeciwzakrzepowe.

Kushwaha i współpracownicy (2017) badali wpływ ashwagandhy na nadciśnienie. W tym celu podwali 2g sproszkowanej ashwagandhy z mlekiem (grupa I) oraz z wodą (grupa II). Badanie objęło 51 osób w wieku od 40 do 70 lat, z nadciśnieniem tętniczym. Ciśnienie krwi badano przez 3 miesiące. Po 3 miesiącach kuracji stwierdzono ogólny spadek ciśnienia skurczowego. Ponadto obniżenie skurczowego ciśnienia krwi było większe w grupie I, podczas gdy spadek rozkurczowego ciśnienia krwi był znaczący w obu grupach.

W podwójnie ślepej próbie klinicznej, ashwagandha była testowana w grupie 101 zdrowych mężczyzn, w wieku 50-59 lat, w dawce 3 gramy dziennie przez jeden rok. Zaobserwowano znaczącą poprawę stężenia hemoglobiny, liczby czerwonych krwinek i melaniny, zmniejszył się poziom cholesterolu w surowicy. Tempo sedymentacji erytrocytów uległo znacznemu obniżeniu, a 71,4% mężczyzn zgłosiło poprawę sprawności seksualnej (Jayaprakasam i in. 2003).

Działanie hipoglikemiczne, moczopędne i hipocholesterolemiczne korzenia ashwagandhy badano u ludzi z cukrzycą typu 2 oraz łagodną hipercholesterolemią. Pacjentom podawano sproszkowany ekstrakt przez 30 dni. Zaobserwowano zmniejszenie stężenia glukozy we krwi porównywalne z doustnym lekiem hipoglikemicznym. Stwierdzono również znaczny wzrost stężenia sodu w moczu, objętości moczu i obniżenie poziomu cholesterolu, triglicerydów i lipoprotein o niskiej gęstości w surowicy krwi (Andallu i Radhika 2000).

Ashwagandha została opisana w tradycyjnej indyjskiej medycynie ajurwedyjskiej jako afrodyzjak, który może być stosowany w zaburzeniach seksualnych u mężczyzn i w leczeniu niepłodności. Zostało przeprowadzone badanie w celu oceny aktywności spermatogennej ekstraktu z korzenia ashwagandha u pacjentów z oligospermią. Czterdziestu sześciu mężczyzn z oligospermią (liczba plemników <20 milionów/ml nasienia) włączono i losowo przydzielono do leczenia ekstraktem z korzenia ashwagandha (675 mg trzy razy dziennie przez 90 dni) lub do placebo. Parametry nasienia i poziomy hormonów w surowicy oszacowano na koniec 90-dniowego leczenia. Liczba plemników wzrosła o 167%, objętość nasienia o 53% oraz zaobserwowano wzrost ruchliwości plemników o 57%. Poprawa tych parametrów była minimalna w grupie otrzymującej placebo. Ponadto zaobserwowano znacznie większą poprawę i regulację poziomów hormonów w surowicy podczas leczenia ashwagandhą w porównaniu z placebo (Ambiye i in. 2013).

3. Podsumowanie

Withania somnifera (Ashwagandha) to roślina stosowana w medycynie od czasów Ajurwedy, starożytnego systemu medycyny indyjskiej. *Withania somnifera* była używana jako zioło *Rasayana* przez ponad 2500 lat. Ashwagandha była stosowana jako afrodyzjak, środek przeciwzapalny, ściągający oraz w leczeniu zapalenia oskrzeli, astmy, wrzodów, bezsenności i demencji starczej.

Obecnie ashwagandha używana jest na wiele dolegliwości. W wielu preparatach ajurwedyjskich, które są obecnie sprzedawane w Indiach i innych krajach, *W. somnifera* bierze udział jako składnik aktywny i jest przepisywany w leczeniu różnych dolegliwości, które wpływają na zdrowie ludzi. Przeprowadzono wiele badań farmakologicznych opisujących biologiczne właściwości *W. somnifera*. Badania te wykazały, że ekstrakty z ashwagandhy mają działanie przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, wspomagające układ krwionośny i nerwowy, antystresowe i immunomodulujące. Ekstrakt z korzenia znacznie zmniejsza peroksydację lipidów i zwiększa dysmutazę nadtlenkową (SOD) i aktywność katalazy, co jest dowodem na jego właściwości przeciwutleniające. *W. somnifera* może być użyteczną terapią neuroochronną w różnych zaburzeniach związanych z ośrodkowym układem nerwowym. Lek nie ma poważnych działań toksycznych, dlatego może być bezpiecznie stosowany w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych.

Najlepiej przebadanymi związkami ashwagandy są witanolidy. Mają one głównie działanie immunomodulacyjne, hipoglikemiczne, hipolipidemiczne, przeciwbakteryjne. Stosowane są w profilaktyce i leczeniu chorób układu sercowo – naczyniowego.

4. Literatura

Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS i in. (2005) Neuroprotective effects of *Withania somnifera* on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats. *Hum Exp Toxicol* 24: 137–47.

- Ambiye VR, Langade D, Dongre S i in. (2013) Clinical evaluation of the spermatogenic activity of the root extract of Ashwagandha (*Withania somnifera*) in oligospermic males: a pilot study. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013.
- Andallu B, Radhika B (2000) Hypoglycemic, diuretic and hypocholesterolemic effect of winter cherry (*Withania somnifera*) root. *Indian J Exp Biol* 38: 607-609.
- Choudhary MI, Nawaz SA, ul-Haq Z i in. (2005) Withanolides a new class of natural cholinesterase inhibitors with calciumantagonistic properties. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 276–87.
- Choudhary D, Bhattacharyya S, Bose S (2017) Efficacy and safety of Ashwagandha (*Withania somnifera* (L.) Dunal) root extract in improving memory and cognitive functions. *Journal of Dietary Supplements* 14(6): 599-612.
- Davis L, Kuttan G (2000) Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *J Ethnopharmacol* 71: 193-200.
- Davis L, Kuttan G (2002) Effect of *Withania somnifera* on CTL activity. *J Exp Clin Cancer Res* 21: 115-118.
- Dhuley JN (2000) Retracted: adaptogenic and cardioprotective action of ashwagandha in rats and frogs. *Journal of Ethnopharmacology* 70: 57-63.
- Gacche RN, Dhole NA (2006) Antioxidant and possible anti-inflammatory potential of selected medicinal plants prescribed in the Indian traditional system of medicine. *Pharmaceutical Biology* 44: 389-395.
- Girish KS, Machiah KD, Ushanandini S i in. (2006) Antimicrobial properties of a non-toxic glycoprotein (WSG) from *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Journal of Basic Microbiology* 46: 365-374.
- Jayaprakasam B, Zhang Y, Seeram N i in. (2003) Growth inhibition of tumor cell lines by withanolides from *Withania somnifera* leaves. *Life Sci* 74: 125-132.
- Kulkarni SK, Dhir A (2008) *Withania somnifera*: an Indian ginseng. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32: 1093-1105.
- Kurapati KRV, Atluri VSR, Samikkannu T i in. (2013) Ashwagandha (*Withania somnifera*) reverses β -amyloid1-42 induced toxicity in human neuronal cells: implications in HIV-associated neurocognitive disorders (HAND). *PLoS One* 8: 77624.
- Kushwaha S, Betsy A, Chawla P (2012) Effect of Ashwagandha (*Withania somnifera*) root powder supplementation in treatment of hypertension. *Studies on Ethno-Medicine* 6: 111-115.
- Mishra LC, Singh BB, Dagenais S (2000) Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. *Alternative medicine Reviews* 5: 334-346.
- Owais M, Sharad KS, Shehbaz A i in. (2005) Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (ashwagandha) an indigenous medicinal plant against experimental murine salmonellosis. *Phytomedicine* 12: 229-235.
- Prakash J, Gupta SK, Dinda AK (2002) *Withania somnifera* root extract prevents DMBA-induced squamous cell carcinoma of skin in Swiss albino mice. *Nutr Cancer* 42: 91-97.
- Rani G, Kaur K, Wadhwa R i in. (2005) Evaluation of the anti-genotoxicity of leaf extract of Ashwagandha. *Food Chem Toxicol* 43: 95–8.
- Singh N, Bhalla M, de Jager P i in. (2011) An overview on ashwagandha: A Rasayana (Rejuvenator) of Ayurveda. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8.
- Soman S, Anju TR, Jayanarayanan S i in. (2013) Impaired motor learning attributed to altered AMPA receptor function in the cerebellum of rats with temporal lobe epilepsy: ameliorating effects of *Withania somnifera* and withanolide A. *Epilepsy & Behavior* 27(3): 484-491.

8. Problematyka ochrony środowiska przyrodniczego i kulturowego w gminie wiejskiej Puchaczów

Problems of the natural and cultural environment protection in the rural commune of Puchaczów

Sylwia Szeffler

Katedra Architektury Krajobrazu, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab.inż. Małgorzata Milecka, profesor uczelni

Sylwia Szeffler: syszef@wp.pl

Słowa kluczowe: Analiza SWOT, obszary wiejskie, ochrona wyróżników krajobrazu.

Streszczenie

Obszary wiejskie tracą swoją unikatowość na skutek procesów urbanizacyjnych, a w ślad za tym także istotne walory przyrodniczo-kulturowe. Jedną z metod ochrony środowiska przyrodniczego i kulturowego wsi jest odpowiednie zagospodarowanie terenu, pozostające w zgodzie z uwarunkowaniami przyrodniczymi. Artykuł ma formę pracy przeglądowej, której celem jest zaprezentowanie problematyki ochrony środowiska w gminie wiejskiej Puchaczów za pomocą analizy SWOT. Rozpoznanie mocnych i słabych strony zapisów w dokumentach planistycznych umożliwi wskazanie szans i zagrożeń dla dalszych możliwości kształtowania rozwoju zrównoważonego gminy. Puchaczów to gmina wiejska zlokalizowana na terenie województwa lubelskiego, w powiecie łęczyńskim. Szczególną i wyróżniającą cechą opisywanego terenu jest położenie w zasięgu występowania złóż węgla kamiennego, co ma kluczowy wpływ na rozwój gminy.

1. Wstęp

Krajobraz wiejski posiada specyficzne, typowe wartości, stanowiące swoiste wyróżniki (Niedźwiecka-Filipiak 2009). Definiują one określoną przestrzeń wiejską, ułatwiając jej identyfikację. Ze względu na sposób powstania wyróżniki dzieli się na naturalne (przyrodnicze) oraz antropogeniczne. Do pierwszej grupy zakwalifikować można formy i strukturę ukształtowania terenu, wody powierzchniowe, klimat, faunę i szatę roślinną. Obecnie w krajobrazie wiejskim nie istnieje wiele elementów, które można nazwać naturalnymi, w dosłownym tego słowa znaczeniu. W przeszłości stanowiły one uwarunkowania wpływające na lokalizację wsi, jednak na przestrzeni lat człowiek w coraz większym stopniu nauczył się kształtować otaczającą go przestrzeń, dostosowując ją do własnych potrzeb. Należy jednak pamiętać, że odporność środowiska na ingerencję człowieka jest ograniczona i w przypadku nieodpowiedniego użytkowania może dojść do niszczenia jej walorów (Wiśniewska 2007).

Kolejna grupa wyróżników, czyli wyróżniki antropogeniczne dzieli się na materialne i niematerialne. Do niematerialnych zalicza się wszystkie komponenty związane ze strefą duchową (zwyczaje, tradycje, uroczystości). W grupie drugiej znajdują się detale widoczne w krajobrazie, mające wpływ na wizualną stronę wsi. Są to układy przestrzenne, układy zabudowań, zieleń czy infrastruktura (Niedźwiecka-Filipiak 2009). Wszelkie zachowane ślady przeszłości (zabytki, układy przestrzenne) mające wpływ na wizerunek obszaru i jego emocjonalny odbiór, określane są jako duch miejsca *genius loci* (Dąbrowska-Budziło 2011). Genius loci często stanowi połączenie walorów przyrodniczych i kulturowych przestrzeni, jest elementem niematerialnym, który nadaje niezwykle cechy, sprzyja emocjonalnym związkom człowieka z otoczeniem (Myga-Piątek 2011).

Artykuł ma formę pracy przeglądowej, której celem jest zaprezentowanie problematyki ochrony środowiska przyrodniczego i kulturowego na przykładzie gminy wiejskiej Puchaczów. Gmina położona jest w województwie lubelskim, w którym udział użytków rolniczych szacuje się na ok. 70% (Ściborek-Rycyk 2018). Wskaźnik ten należy do jednych z najwyższych w kraju. W gminie

Puchaczów prócz dominującej funkcji rolniczej rozwinął się przemysł wydobywczy, związany z eksploatacją węgla kamiennego. Skuteczną formą ochrony krajobrazu gminy jest odpowiednie zagospodarowanie terenu, zgodne z uwarunkowaniami przyrodniczymi i uwzględniające wartości kulturowe. Wykorzystując metodę analizy SWOT wskazano mocne i słabe strony związane z ochroną środowiska w gminie oraz szanse i zagrożenia dla dalszego rozwoju zrównoważonego obszaru, łączącego czynniki konkurencyjne: społeczne, ekonomiczne i ekologiczne. W prac postawiono hipotezę, iż mimo wdrażania zasad rozwoju zrównoważonego, uwarunkowania przyrodnicze oraz wartości kulturowe, często nie są równoważne z czynnikami gospodarczymi czy społecznymi w planowaniu przestrzennym.

2. Opis zagadnienia

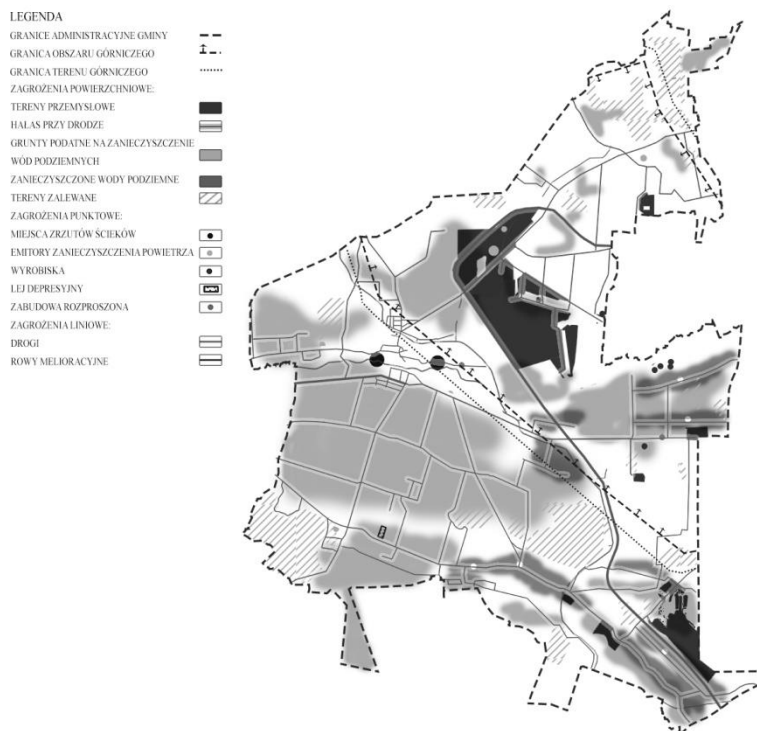
W obecnych czasach coraz częstszym zjawiskiem zauważalnym na obszarach wiejskich jest wypieranie elementów tradycyjnych na rzecz nowoczesności. Dzieje się tak ze względu na nasilony proces semiurbanizacji, czyli przenikania miast do wsi. Krajobraz traci swoją unikatowość, otoczenie staje się monochromatyczne. Tereny dawniej typowo rolnicze są zagospodarowane, jako ośrodki przemysłowe czy usługowe. Jednocześnie obszary wiejskie stają się coraz bardziej atrakcyjne dla mieszkańców miast. Nieodpowiednie kierunki rozwoju przestrzeni wiejskich mogą powodować procesy degradacyjne, skutkujące w przyszłości utraceniem ich wyjątkowych cech. Ważnym aspektem, który powinien być uwzględniony w planowaniu przestrzennym wsi jest ochrona środowiska. Ochrona ta kojarzy się przede wszystkim z wyznaczaniem obszarów i obiektów chronionych. Należy jednak pamiętać, że pojęcie to oznacza także harmonijne kształtowanie ogółu krajobrazu, nie tylko obszarów o wysokich wartościach przyrodniczych i kulturowych (Żarska 2011). Analiza aktualnego stanu ochrony wartości przyrodniczych i kulturowych jest użyteczna w procesie diagnozy jakości środowiska. Diagnoza zaś konieczna jest do dalszego planowania działań w krajobrazie i powinna stanowić punkt wyjścia dla opracowania kierunków polityki proekologicznego rozwoju lokalnego.

Przy rozpoznaniu problematyki ochrony środowiska przyrodniczego i kulturowego w gminie Puchaczów posłużono się danymi z mapy sozologicznej (<https://puchaczow.e-mapa.net/>), analizą zagrożeń dla środowiska (Rys. 1), a także mapą prezentującą strukturę funkcjonalno-przestrzenną gminy (Rys. 2) oraz dokumentami planistycznymi. Na podstawie zgromadzonych informacji wykonano mapę charakteryzującą formy ochrony środowiska przyrodniczego i kulturowego w gminie Puchaczów (Rys. 2). W części graficznej zaznaczono granice Parku Krajobrazowego Pojezierze Łęczyńskie, Nadwieprzańskiego Parku Krajobrazowego i ich otulin, granice Ekologicznego Systemu Obszarów Chronionych oraz teren projektowanego rezerwatu przyrody i strefy ochronnej. Szczególnie ważnymi informacjami zaznaczonymi na mapie są granice obszaru górniczego, terenu górniczego oraz terenów szkód górniczych. Z uwagi na górniczy (wydobywczy) charakter gminy określono lokalizację obiektów wpisanych do rejestru zabytków i pomników przyrody. Wykorzystując metodę analizy SWOT (Tab. 1) wykazano mocne i słabe związane z zagadnieniem ochrony środowiska przyrodniczego i kulturowego w gminie oraz wskazano szanse i zagrożenia dla rozwoju zrównoważonego obszaru.

3. Przegląd literatury

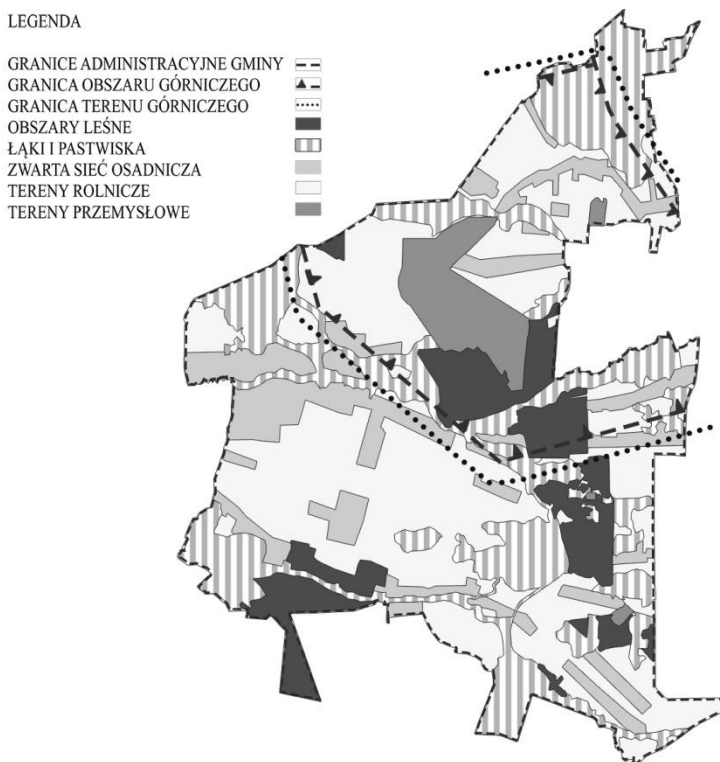
Obszary wiejskie w Polsce stanowią ok. 93% powierzchni, a liczba ich mieszkańców wynosi 40 % całej populacji w państwie (GUS 2017). Tereny te mają zatem znaczący wpływ na stan środowiska kraju, dlatego tak istotną kwestią jest problematyka związana z odpowiednim ich kształtowaniem. Zgodnie z koncepcją rozwoju zrównoważonego tereny wiejskie powinny cechować się wielofunkcyjnością. Pogodzenie funkcji rolniczej, przemysłowej z ochroną środowiska przyrodniczego i kulturowego jest zadaniem trudnym do zrealizowania (Staniak 2009). Intensyfikacja produkcji rolniczej czy jak w przypadku gminy Puchaczów wydobywczej wiąże się z zagrożeniem zachowania różnorodności biologicznej. Według Żarskiej (2011) w ochronie środowiska przyrodniczego wsi ważne jest bogactwo struktur ekologicznych krajobrazu rolniczego, związane z występowaniem kompleksów leśnych, łąkowych, zadrzewień śródpolnych. Wiele z cennych

przyrodniczo układów roślinnych powiązanych jest z założeniami historycznymi np. zabytkowymi parkami. Na potrzebę uwzględnienia walorów kulturowych w procesie zarządzania polityką przestrzenną gminy zwrócił uwagę Hernik (2008). Zasoby środowiska kulturowego przyczyniają się do wykształcenia tożsamości lokalnej, a ponadto są szansą dla rozwoju regionalnego, a nie utrudnieniem.



Rys. 1 Analiza zagrożeń dla środowiska w gminie Puchaczów (Szeffler 2018).

W gminie Puchaczów istotną kwestię stanowi przemysł wydobywczy związany z pozyskiwaniem węgla kamiennego. Największym przedsiębiorstwem działającym w regionie jest Lubelski Węgiel „Bogdanka” S.A (Szot-Gabryś 2008). Kopalnia zlokalizowana jest w centralnej części gminy, pomiędzy dwoma Parkami Krajobrazowymi – Nadwieprzańskim Parkiem Krajobrazowym oraz Parkiem Krajobrazowym Pojezierze Łęczyńskie. Tereny i obszary górnicze zajmują ok. 45 % powierzchni całej gminy (Rys. 2). Swoim zasięgiem obejmują część otulin wyżej wymienionych parków krajobrazowych oraz fragment Ekologicznego Systemu Obszarów Chronionych. Zgodnie z definicją zawartą w ustawie Prawo geologiczne i górnicze (Dz. U. Nr 163, poz. 98) za obszar górniczy uważa się przestrzeń w granicach, której możliwe jest wydobywanie kopalin, natomiast teren górniczy to powierzchnia objęta możliwymi, szkodliwymi działaniami spowodowanymi robotami górniczymi. Warto nadmienić, że według miejscowego planu zagospodarowania przestrzennego gminy Puchaczów (Mącik i in. 2002) nie przewidziano na obszarze górniczym rozwoju przemysłu niezwiązanego z wydobywaniem węgla. W gminie Puchaczów wyznaczono trzy obszary szkód górniczych I kategorii (Mącik i in. 2002). Na terenach tych prognozowane są największe niekorzystne zmiany jakościowe środowiska, powstałe na skutek eksploatacji węgla, do których zalicza się tworzenie obniżen i zalewisk terenu czy przyrastające składowisko skały płonnej (Szot-Gabryś 2008). Ponadto kopalnia „Bogdanka” jest największym emitorem zanieczyszczeń przemysłowych w gminie, wpływającym negatywnie na stan powietrza atmosferycznego, wód gruntowych czy nasilającym hałas (<https://puchaczow.e-mapa.net/>).



Rys. 2. Struktura funkcjonalno-przestrzenna gminy (Szeffler 2018).

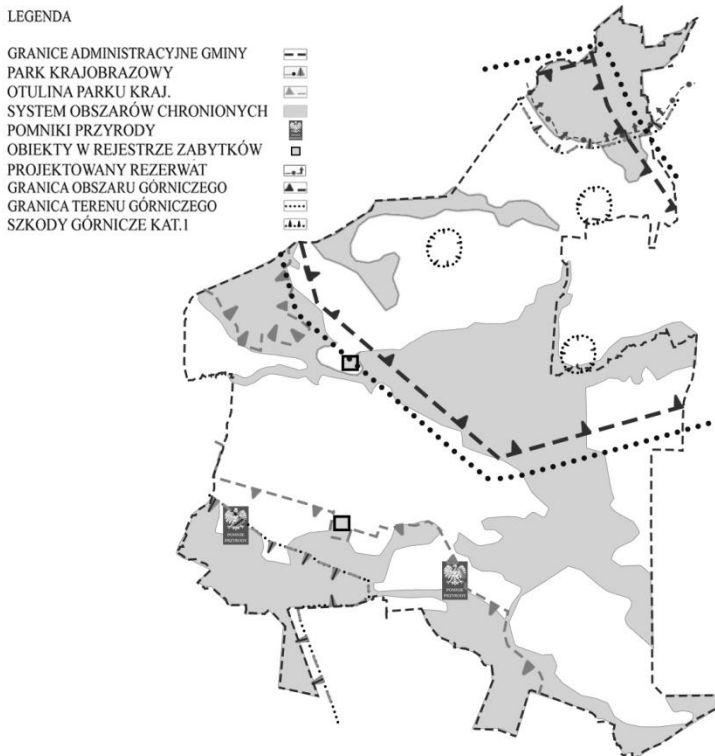
Jedną z form ochrony środowiska przyrodniczego w gminie Puchaczów jest Ekologiczny System Obszarów Chronionych (ESOCH) położony w granicach korytarzy płatów ekologicznych - dolin głównych cieków wodnych: Świnki, Kanału Wieprza-Krzyny, Mogilnicy oraz kompleksów leśnych i łąkowych. Obszary leśne zajmują ok. 12 % powierzchni całej gminy (Ryc. 2). Kompleks leśny znajdujący się na południu, w okolicach miejscowości Ciechanki wchodzi w skład Nadwieprzańskiego Parku Krajobrazowego i jego otuliny. Las Puchaczowski zlokalizowany w centralnej części obszaru pełni funkcję izolującą teren od kopalni węgla. Zgodnie z miejscowym planem zagospodarowania przestrzennego (Mącik i in. 2002) w granicach Ekologicznego Systemu Obszarów Chronionych zabrania lokalizowania kopalni surowców mineralnych, stacji paliw i parkingów, odprowadzania ścieków do gruntu, lokalizowania składowisk odpadów, czy zmiany ukształtowania terenu. Zagospodarowania Ekologicznego Systemu Obszarów Chronionych powinno być podporządkowane funkcjom ekologicznym i ochronie środowiska, dlatego też wprowadzono zakaz zmiany sposobu użytkowania kompleksów leśnych, dopuszcza się jednak ich przystosowanie do usług związanych z funkcją rekreacyjną.

Według danych z centralnego rejestru form ochrony przyrody (<http://crfop.gdos.gov.pl>) w gminie Puchaczów istnieją jedynie 2 pomniki przyrody: wiąz szypułkowy (*Ulmus laevis*) o pierśnicy równej 210 cm, oraz aleja lipowa pochodząca z XIX w., będąca pozostałością zespołu dworsko – parkowego (Kuna 2006). Władze gminy planują w przyszłości objąć ochroną pomnikową kolejne okazy drzew (plan rozwoju lokalnego gminy Puchaczów 2007).

Jezioro Uściwierzek oraz otaczające je torfowiska zlokalizowane w północnej części gminy stanowią fragment projektowanego rezerwatu „Uroczysko Uciwierskie”. Obszar charakteryzuje się występowaniem rzadkich gatunków roślin tj. rosiczka okrągłolistna czy grzązel żółty (plan rozwoju lokalnego gminy Puchaczów 2007).

Na obszarze gminy Puchaczów znajdują się 3 obiekty wpisanych do rejestru zabytków województwa lubelskiego (obwieszczenie nr 1/2019 lubelskiego wojewódzkiego konserwatora zabytków w Lublinie z dnia 14 stycznia 2019 r. w sprawie wykazu zabytków wpisanych do rejestru

zabytków nieruchomych województwa lubelskiego i rejestru zabytków archeologicznych województwa lubelskiego). Zalicza się do nich zespół dworsko-parkowy zlokalizowany w Ciechankach, w którego skład wchodzi dwór, park ze stawem oraz drzewostanem. Stan budynku dworu ocenić można, jako średni, wymagający remontu. Pozostałe obiekty położone są w miejscowości Puchaczów. Wszystkie zespoły wpisane do rejestru zabytków województwa lubelskiego objęte są strefą ścisłej ochrony konserwatorskiej (Maćcik i in. 2002).



Rys. 3. Analiza form ochrony środowiska i krajobrazu kulturowego w gminie Puchaczów (Szeffler 2019).

W tabeli 1 przedstawiono analizę SWOT odnoszącą się do ochrony środowiska kulturowego w gminie Puchaczów. Umożliwi ona wypracowanie wniosków końcowych, które mogą posłużyć gminie przy tworzeniu dokumentów planistycznych – studium uwarunkowań i kierunków zagospodarowania przestrzennego i miejscowego planu zagospodarowania przestrzennego.

Jak wynika z analizy SWOT przemysł wydobywczy związany z pozyskiwaniem węgla kamiennego jest elementem zarówno pozytywnym jak i negatywnym dla funkcjonowania gminy. Lokalizacja w regionie kopalni węgla „Bogdanka” wpływa na zmniejszenie bezrobocia, zwiększenie ilości firm zajmujących się produkcją i handlem cegły klinkierowej, a w rezultacie do poprawy jakości życia mieszkańców gminy Puchaczów (Maćcik i in. 2012). Niestety występowanie na badanym terenie kopalni wiąże się z postępującą degradacją środowiska – powietrza atmosferycznego, wód czy zwiększonym natężeniem hałasu.

Wprowadzenie miejscowego planu zagospodarowania przestrzennego gminy Puchaczów umożliwiło utworzenie Ekologicznego Systemu Obszarów Chronionych. Ważnym zapisem widniejącym w dokumencie jest podporządkowanie zagospodarowania terenu funkcjom ekologicznym i ochrony środowiska. Na obszarze wskazane zostały obszary wymagające dolesienia. Działania takie stanowią szanse zwiększenia lesistości gminy, poprawę bioróżnorodności i jakości środowiska.

Ze względu na walory środowiska przyrodniczego i kulturowego w gminie Puchaczów istnieje możliwość rozwoju turystyki wiejskiej. Zgodnie z obowiązującymi dokumentami na terenie Ekologicznego Systemu Obszarów Chronionych dopuszcza się przystosowanie kompleksów leśnych do rekreacji. Umożliwia się stworzenie ścieżek pieszych, konnych i szlaków rowerowych, a także usytuowanie zadaszeń turystycznych czy przystosowanie istniejącej zabudowy do funkcji usługowej. Zbyt intensywna turystyka na danych terenach wpłynie na zwiększenie degradacji spowodowanej czynnikami antropogenicznym. Teren należy przystosować do potrzeb ruchu turystycznego i rekreacyjnego. Należy wziąć pod uwagę fakt, że rozwój turystyki może być czynnikiem niszczącym jak również wspierającym kształtowanie i ochronę krajobrazu (Środulska-Wielgus 2009).

Tab. 1. Analiza SWOT ochrony środowiska przyrodniczego i kulturowego gminy Puchaczów (Szeffler 2019).

Mocne strony	Słabe strony
<ul style="list-style-type: none"> • Restrykcyjne przepisy dotyczące funkcjonowania obszaru górniczego; • Występowanie zróżnicowanych formy ochrony środowiska przyrodniczego; • Występowanie korytarzy, płatów ekologicznych i ich ochrona; • Obecność obiektów wpisanych do rejestru zabytków oraz ich ścisła ochrona; 	<ul style="list-style-type: none"> • Duża powierzchnia terenu i obszaru górniczego (ok. 45%), obejmujące tereny cenne przyrodniczo; • Występowanie na terenie gminy trzech obszarów szkód górniczych I kategorii; • Mała ilość kompleksów leśnych w stosunku do powierzchni obszar; • Mała ilość pomników przyrody • Niezadawalający stan wszystkich zabytków;
Szanse	Zagrożenia
<ul style="list-style-type: none"> • Dalszy rozwój funkcji przemysłowej związanej z wydobyciem węgla; • Poprawa funkcjonowania ochrony Ekologicznego Systemu Obszarów Chronionych; • Zwiększenie jakości wód podziemnych i powierzchniowych; • Zwiększanie powierzchni lasów i zadrzewień śródpolnych; • Świadoma ochrona przyrody, poprzez wskazywanie obiektów do ochrony; • Możliwość rozwoju funkcji turystycznej; • Poprawa jakości życia ludzi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Przekładanie uwarunkowań ekonomicznych nad przyrodnicze; • Degradacja obszarów cennych przyrodniczo; • Obniżenie jakości powietrza; • Obniżenie jakości wód; • Niszczenie zabytków i ich otoczenia, • Utrata wyróżników krajobrazu gminy Puchaczów.

4. Podsumowanie i wnioski

Do zadań własnych gminy należy kształtowanie i prowadzenie polityki przestrzennej, w tym uchwalanie obligatoryjnych dokumentów planistycznych – studium uwarunkowań i kierunków zagospodarowania przestrzennego, czy miejscowych planów zagospodarowania przestrzennego. Zgodnie z ustawą o planowaniu i zagospodarowaniu przestrzennym (Dz.U. 2003 nr 80 poz. 717) krajobraz powinien być kształtowany zgodnie z ładem przestrzennym w uporządkowanych relacjach, uwzględniających wszelkie uwarunkowania i wymagania funkcjonalne oraz zasady ochrony środowiska, a przede wszystkim z zasadami rozwoju zrównoważonego.

W planowaniu przestrzennym gminy Puchaczów zaobserwować można iż, często uwarunkowania ekonomiczne przekłada się nad wartościami przyrodniczymi i kulturowymi. Elementy środowiska naturalnego powinny być podstawą rozwoju zagospodarowania przestrzennego, a zasoby kulturowe powinny ten rozwój wspierać. Wysoki stopień antropogenizacji krajobrazu obszarów wiejskich może powodować zmniejszenie walorów środowiska. Kształtowanie przestrzeni powinno być nakierowane na ekspozowanie wartości naturalnych. Wprowadzanie do obszaru gminy nowych funkcji (np. rozwoju turystyki) musi wynikać z wniosków płynących z analiz i waloryzacji środowiska. Konieczna jest ochrona terenów o dużej różnorodności biologicznej. Połączenie działań związanych formowaniem nowych stref, a także ochroną obecnych powiązań i struktur ekologicznych, warunkuje poprawne funkcjonowanie regionu.

5. Literatura:

- Dąbrowska-Budziło K (2011) Genius loci, jako potencjalne źródło inspiracji dla kształtowania krajobrazu. *Prace Komisji Krajobrazu Kulturowego* 15: 34-43.
- Hernik J (2008) Potrzeba uwzględniania walorów krajobrazu kulturowego w zarządzaniu gminą wiejską. *Prace Komisji Krajobrazu Kulturowego PTG* 10: 61-68.
- Kuna T (2006) Gmina Puchaczów. Powiat łęczyński przyroda, zabytki, pomniki przyrody, zdjęcia, mapy informacje adresowe, red. Chrzanowska A, Kolary-Woźniak M, Misiewicz E.
- Mącik E. i in. (2002) Miejscowy plan zagospodarowania przestrzennego gminy Puchaczów. Uchwała nr IV/30./2002 Rady gminy Puchaczów z dnia 30 grudnia 2002 r. w sprawie miejscowego planu zagospodarowania przestrzennego gminy Puchaczów.
- Mącik E. i in. (2012) Studium uwarunkowań i kierunków zagospodarowania przestrzennego gminy Puchaczów. Załącznik 1 do uchwały nr XXVIII/166/12 Rady gminy Puchaczów z dnia 18 grudnia 2012 r.
- Niedźwiecka-Filipiak I (2009) Wyróżniki krajobrazu i architektury wsi Polski południowo-zachodniej. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.
- Staniak M (2009) Zrównoważony rozwój obszarów wiejskich w aspekcie środowiskowym. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie* 9, 3: 187-194.
- Szot-Gabryś T (2008) Strategia rozwoju lokalnego gminy Puchaczów na lata 2007-2015.
- Środulska-Wielgus J (2009) Szlaki turystyki kulturowej jako sposoby ochrony i udostępniania krajobrazu. *Nauka Przyr. Technol.* 3, 1 :52.
- Wiśniewska M (2007) Osadnictwo wiejskie. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej.
- Żarska B (2011) Ochrona krajobrazu. Wydawnictwo SGGW.

9. Biocenotyczna rola zadrzewień śródpolnych w krajobrazie wiejskim

Biocenotic role of shelterbelt in the rural landscape

Sylwia Szeffler

Katedra Architektury Krajobrazu, Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab.inż. Małgorzata Milecka, profesor uczelni

Sylwia Szeffler: syszef@wp.pl

Słowa kluczowe: Zadrzewienia śródpolne, obszary wiejskie, bioróżnorodność.

Streszczenie

Zadrzewienia śródpolne stanowią ważny element krajobrazu wiejskiego zarówno pod względem ekologicznym, jak i estetycznym, podkreślając unikatowy, lokalny charakter wsi. Spełniają one szereg funkcji ochronnych, produkcyjnych czy społeczno-kulturowych. W zależności od formy, w jakiej występują mogą odgrywać rolę korytarzy lub wysp ekologicznych, często stanowią także element płatów czy węzłów. Ponadto są środowiskiem ostojowym dla licznych gatunków rodzimej flory i fauny.

1. Wstęp

Krajobraz wiejski to specyficzny rodzaj krajobrazu kulturowego, powstały na skutek działalności człowieka w przeciągu wielu wieków. W obecnych czasach pojawiły się tendencje dotyczące polifunkcyjności obszarów wiejskich, wynikające z założeń zrównoważonego rozwoju w krajach Unii Europejskiej (Kupidura i in. 2011), jednak w dalszym ciągu podstawową rolą tych terenów jest produkcja rolna (Wiśniewska, 2007). Funkcja rolnicza miała wpływ na pierwotny układ przestrzenny wsi, który wynikał zarówno z uwarunkowań przyrodniczych, jak i kulturowych. Aktualnie w coraz większym stopniu funkcja rolnicza terenu wpływa na otoczenie, dostosowując je do rosnących potrzeb gospodarczych. Rozwój społeczno-gospodarczy w drugiej połowie XX wieku przyczynił się do intensyfikacji rolnictwa i procesów urbanistycznych, a także, co za tym idzie, silnej fragmentaryzacji środowiska przyrodniczego oraz zubożeniem rodzimej szaty roślinnej (Orzechowski i Trzcianowska 2016). Ważnym aspektem, który powinien zostać uwzględniony w planowaniu przestrzennym wsi w ramach zasad rozwoju zrównoważonego jest ochrona środowiska objawiająca się poprzez wzmocnienie i zabezpieczenie istniejących układów przyrodniczych, jak również zastosowanie nowych zadrzewień śródpolnych.

Artykuł ma formę pracy przeglądowej, której celem jest zaprezentowanie formy i roli zadrzewień śródpolnych w krajobrazie wiejskim. W pracy przedstawiono definicję oraz rys rozwoju zadrzewień śródpolnych na ziemiach polskich, a także omówiono ich korzystne oddziaływanie na krajobraz.



Rys. 4. Cechy charakterystyczne krajobrazu wiejskiego (Szeffler 2019).

2. Opis zagadnienia

Zgodnie z definicją zawartą w ustawie z dnia 16 kwietnia 2004 r. o ochronie przyrody (Dz.U. 2004 nr 92 poz. 880) zadrzewienia rozumiane są, jako pojedyncze okazy drzew i krzewów lub ich grupy (Rys. 2), które nie są zaliczane do lasów lub plantacji, włącznie z zajmowanym przez nie obszarem, a także pozostałymi składnikami szaty roślinnej tego terenu. Zadrzewienia śródpolne występują na gruntach użytkowanych rolniczo. Ustawa o ochronie środowiska (Dz.U. 2001 nr 62 poz. 627) podkreśla znaczenie zadrzewień w procesie ochrony zwierząt i roślin natomiast w ustawie o planowaniu i zagospodarowaniu przestrzennym (Dz.U. 2003 nr 80 poz. 717) zaznaczono, że zadrzewienia stanowią istoty element o funkcjach środowiskowych, a co za tym idzie powinny zostać uwzględnione w dokumentach planowania przestrzennego (Bożętka 2017).



Rys. 5. Formy zadrzewień śródpolnych (Szeffler 2019).

Biorąc pod uwagę usytuowanie drzew lub krzewów oraz zajmowaną powierzchnię i kształt, zadrzewienia dzielimy na :

- Okazy pojedyncze;
- Grupy drzew i krzewów - zadrzewienia mające powierzchnię mniejszą niż 0,02 ha niestanowiące rzędu
 - Zadrzewienia kępowe - o powierzchni co najmniej 0,02 ha, ale mniejsze niż 0,10 ha, nie mające formy rzędu lub pasa;
 - Powierzchniowe – mające powierzchnię co najmniej 0,10 ha, nie będące pasem zadrzewień;
 - Rzędowe- o formie pasa w którym odległości między drzewami nie przekraczają 50 m, a między sąsiednimi krzewami – 15 m;
 - Pasmowe - dwurzędowe zadrzewienia o szerokości do 20 m i długości ok. 100 m (Waszak 2002).

Historia rozwoju zadrzewień śródpolnych na ziemiach polskiej związana jest z osobą Generała Dezyderego Chłapowskiego, który uważany jest za pioniera rolnictwa ekologicznego. W latach 20. XIX wieku, w swoim majątku w Turwi na Wielkopolsce, utworzył rozległy system zadrzewień i tym samym w istotny sposób przyczynił się do wzrostu produkcji rolniczej w swoim gospodarstwie. Wprowadzone przez Chłapowskiego zadrzewienia mają charakter rzędów i kęp drzew i krzewów o powierzchni od 0,1 do 15 ha. Ukształtowane są w formie alei, zbiorowisk przy ciekach wodnych, ciągach komunikacyjnych oraz zadrzewień kępowych. Zadrzewienia znajdujące się wzdłuż dróg to przede wszystkim robinie, lipy, czy topole, wzdłuż cieków wodnych dominują olsze, natomiast drogi obsadzone są czereśniami i jabłoniemi, a w niektórych przypadkach również dębami (<https://regionwielkopolska.pl>). Warto zaznaczyć, że pionierskie koncepcje Chłapowskiego zostały wykluczone w skutek wzrostu popularności rolnictwa nowoczesnego, które w widoczny sposób wpłynęło na uproszczenie struktury upraw poprzez eliminację zadrzewień śródpolnych. Sytuacja ta zmieniła się dopiero w 1954 r., kiedy to w Turwi powstała stacja badawcza Polskiej Akademii Nauk, która skupiła swoje badania na tematyce zadrzewień w krajobrazie wiejskim i w dużym stopniu przywróciła rangę zadrzewień śródpolnych, jako elementów korzystnych dla upraw

(<http://wsrodpol.swietodrzewa.pl>). W latach 80. W parku prowadzone były badania dotyczące zagrożeń dla terenów wiejskich Wielkopolski, a także szukano metod jego ochrony w planowaniu przestrzennym (Raszeja 2010). Obecnie dawny majątek znajduje się teraz na terenie Parku Krajobrazowego im. gen. Dezyderego Chłapowskiego, utworzonego w 1992 r. Powierzchnia Parku Krajobrazowego wynosi 172 km² (<https://regionwielkopolska.pl>) Szacuje się, że wiek niektórych z zachowanych zadrzewień wynosi ok. 200 lat. Ocalone do obecnych czasów lub zrekonstruowane zadrzewienia stanowią zespoły o wysokich walorach przyrodniczych, krajobrazowych, kulturowych oraz naukowo-dydaktycznych Parku (Kasprzak i Raszka 2007).

3. Przegląd literatury

Zadrzewienia śródpolne stanowią istotny aspekt obszarów wiejskich zarówno pod względem ekologicznym jak i estetycznym, a także wywierają wpływ na rolniczą produkcję roślinną (Dudek i Polak 2016). Funkcje zadrzewień dzieli się na:

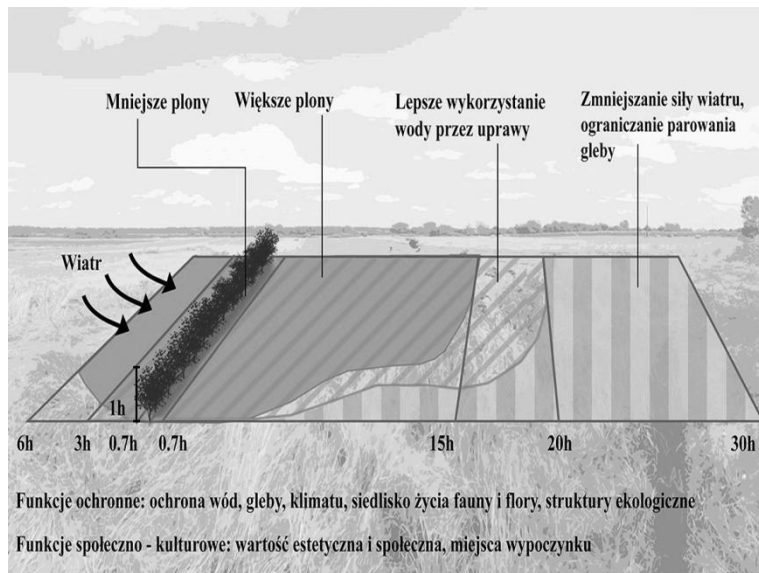
- Funkcje ochronne, które w sposób bardziej szczegółowy można podzielić na glebochronne i wodochronne, klimatyczne, biocenotyczne, sanitarno-higieniczne;
- Produkcyjne, związane z pozyskiwaniem surowca drzewnego, a w sposób pośredni również przy zwiększaniu ilości plonów;
- Społeczno-kulturowe, w których zadrzewienia śródpolne odgrywają rolę wyróżników krajobrazu wiejskiego, są elementem charakterystycznym i rozpoznawalnym wśród społeczności lokalnych. Ponadto mogą stanowić miejsce wypoczynku dla osób pracujących na uprawach rolnych (Waszak 2002).

Do funkcji ochronnych zadrzewień zalicza się pozytywny wpływ na klimat. Zmniejszają one prędkości wiatru średnio o 15–26%. Mają wpływ na zmniejszanie strat wody z gleby o ok. 25%. Ponadto ograniczają erozję wietrzną, wodną, a także zmniejszają ilość niekorzystnych związków chemicznych w glebie, będących następstwem stosowania nawozów mineralnych (Nowak-Rzęsa 2010). Zadrzewienia śródpolne wpływają również na temperaturę powietrza i gleby. W odległości od zadrzewień śródpolnych równej 1h temperatura powietrza jest wyższa średnio o 5°C w porównaniu z obszarami otwartymi, natomiast temperatura gleby jest wyższa o odległości od zadrzewień śródpolnych równej 1h temperatura powietrza jest wyższa średnio o 2°C. Zadrzewienia śródpolne będą, więc zmniejszały ryzyko występowania przymrozków, które mogą być niebezpieczne dla niektórych gatunków roślin uprawnych (Orzechowski i Trzcianowska 2016).

Fauna występująca w zadrzewieniach śródpolnych wpływa korzystnie na sąsiadujące uprawy rolne, zwiększając uprawy rolne nawet o 50% (Orzechowski i Trzcianowska 2016). Pas zadrzewień o szerokości równej 1h będzie oddziaływał na teren 30-krotnie większy (Rys. 3). Należy pamiętać, że w bezpośrednim sąsiedztwie zadrzewień plonowanie upraw jest niższe w stosunku do średniej dla danego terenu (Koreleski 2006) Zwrócił na to uwagę również Cleugh (1998), który stwierdził, że oddziaływanie zadrzewień na mikroklimat nie zawsze zwiększają wydajność plonów. Według Jonczaka (2010) takie obniżenie plonów wynika z deficytu wody w glebie i większego systemu korzeniowego drzew.

Analizując zadrzewienia śródpolne na poziomie krajobrazu należy przede wszystkim wziąć pod uwagę ich funkcję strukturotwórczą (Bożętka 2017). W zależności od ukształtowania zadrzewień śródpolnych mogą odgrywać one rolę korytarzy lub wysp ekologicznych, często stanowią także część płatów czy węzłów ekologicznych. Korytarze ekologiczne (Rys. 4) to pasmowe struktury ekologiczne, pełniące funkcję łączników pomiędzy wyspami lub płatami ekologicznymi (Chmielewski, 2013). Umożliwiają swobodną migrację energii, materii i informacji w środowisku.

Wyspy ekologiczne (Rys. 5) to odizolowane, mniejsze fragmenty ekosystemów, powstające na skutek działalności człowieka (Chmielewski, 2013). Odpowiednio zaprojektowane korytarze i wyspy ekologiczne ułatwiają kontakt pomiędzy osobnikami z oddalonymi populacjami. Pozwalają na bezpieczną migrację wielu gatunków zwierząt, omijając bariery ekologiczne.



Rys. 3. Oddziaływanie pasa zadrzewień o wysokości równej 1h na uprawy (Szefler 2019 na podst. Jakubczak i Wołk).



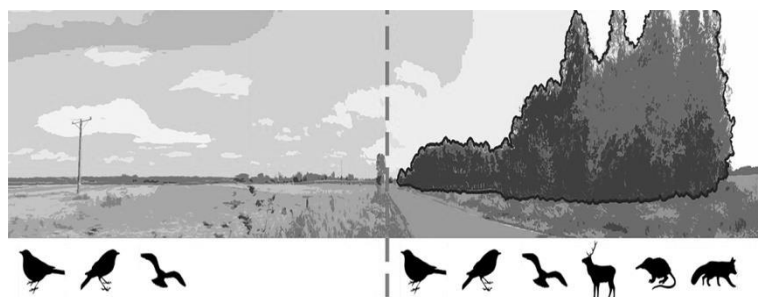
Rys. 4. Zadrzewienia śródpolne, które stanowią część korytarza ekologicznego (Szefler 2019).



Rys. 5. Zadrzewienia śródpolne w formie wysp ekologicznych (Szefler 2019).

Zadrzewienia śródpolne spełniają również istotną rolę w procesie kształtowania różnorodności biologicznej. Zgodnie z Konwencją o różnorodności biologicznej bioróżnorodność to pojęcie odnoszące się do stopnia zróżnicowania organizmów żyjących na ziemi (Dz.U. z 2002 r. nr 184, poz. 1532). Jednym z głównych zagrożeń dla różnorodności biologicznej jest rolnictwo. Maksymalizacja produkcji powoduje zubożenie szaty roślinnej. W porównaniu do kompleksów leśnych tereny rolnicze charakteryzują się obecnością mniejszej ilości gatunków roślin i zwierząt. Deficyt ten wypełniany jest poprzez zadrzewienia śródpolne, które wzbogacają skład gatunkowy

(Orzechowski i Trzcianowska 2016). Zachowanie i tworzenie nowych struktur zadrzewień śródpolnych jest kluczowe dla zachowania bioróżnorodności na terenach wiejskich. Zadrzewienia śródpolne stanowią substytut środowiska leśnego na terenach, na których kompleksy leśne nie występują (Kamiński 2016).



Rys. 6. Wpływ zadrzewień śródpolnych na zwiększanie bioróżnorodności na terenach rolniczych (Szeffler 2019).

Warto nadmienić, że zadrzewienia śródpolne są środowiskiem ostojujowym dla licznych gatunków rodzimej flory i fauny. Występują tam ptaki, np. trznadel, modraszka, czajka, pliszka żółta, dzięcioł średni, (Cieślak 1994), drobne ssaki np. zając szarak, mysz polna i nietoperze (Orłowski 2003), a także owady zapylające np. trzmiel rudy i ziemny, makatka zwyczajna, porobnica, muchówki, paż królowej, rusałka pawik (Ryszkowski 1998). Zadrzewienia śródpolne zapewniają bogatą i ciągłą bazę pokarmową przez cały sezon wegetacyjny, stwarzają odpowiednie miejsca do zakładania gniazd, w przeciwieństwie do pól uprawnych, a także pełnią funkcję dróg migracyjnych.



Rys. 7. Znaczenie zadrzewień śródpolnych dla owadów zapylających (Szeffler 2019).

W procesie kształtowania zadrzewień śródpolnych bardzo ważną kwestią jest dobór odpowiednich gatunków rodzimych (Nowak-Rzęsa 2010). Na glebach suchych sprawdzają się gatunki t.j: grusza pospolita (*Pyrus communis*), śliwa tarnina (*Prunus spinosa*), jabłoń dzika (*Malus sylvestris*). Na siedliskach wilgotnych i zacienionych: czeremcha zwyczajna (*Prunus padus*), bez czarny (*Sambucus nigra*), jarząb pospolity (*Sorbus aucuparia*), leszczyna pospolita (*Corylus avellana*) (Waszak 2002). Warto nadmienić, iż w procesie planowania zadrzewień poza aspektami siedliskowymi należy brać pod uwagę również inne czynniki np. bezpieczeństwo ludzi i mienia. Nieodpowiednio zaprojektowane zadrzewienia mogą stanowić realne zagrożenie (Kamiński 2016).

4. Podsumowanie

Podsumowując zadrzewienia śródpolne odgrywają znaczącą rolę w krajobrazie wiejskim zarówno pod względem ekologicznym (biocenotycznym), jak i estetycznym, kulturowym. Poprawiają one walory krajobrazu, są jego wyróżnikami, wpływającymi pośrednio na rozwój turystyki. Zadrzewienia śródpolne pełnią funkcję korytarzy lub wysp ekologicznych oraz zwiększają bioróżnorodność. Są środowiskiem ostojujowym dla licznych gatunków rodzimej flory i fauny.

Ponadto pełnią funkcję ochronną - hamują prędkość wiatru, ograniczają erozje wietrzną i wodną. Wpływają na wielkość plonów, a także stanowią barierę biogeochemiczną dla zanieczyszczeń pochodzących z obszarów użytkowanych rolniczo. Wzmocnienie, zabezpieczenie istniejących układów zadrzewień oraz zastosowanie ich nowych form powinno być uwzględnione w procesie planowania przestrzennego obszarów wiejskich.

5. Literatura

- Bożętka B (2007) Wybrane problemy waloryzacji zadrzewień i zakrzewień obszarów rolnych. Waloryzacja środowiska przyrodniczego w planowaniu przestrzennym: 117-127.
- Chmielewski TJ (2013) Systemy krajobrazowe struktura –funkcjonowanie – planowanie. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Cieślak M (1994) Awifaunistyczne wskazówki do kształtowania zadrzewień śródpolnych. Ochr. Środ. i Zas. Nat. 8: 27-41.
- Cleugh HA (1998) Effects of windbreaks on airflow, microclimates and crop yields. *Agroforestry Systems* 4: 55-84.
- Jakubczak Z, Wołk A (1977) Wpływ zadrzewień na warunki agroekologiczne oraz planowanie roślin uprawnych. Materiały z Konferencji naukowej nt. znaczenie zadrzewień w kształtowaniu przyrodniczego środowiska człowieka. Sękocin.
- Jonczak J (2010) Wpływ zadrzewień pasowych topoli na plonowanie zbóż oraz gospodarkę wodną i zasoby składników pokarmowych w glebie. *Roczniki Gleboznawcze* 61(2): 37-44.
- Kamiński W (2016) Rola zadrzewień w kształtowaniu różnorodności biologicznej, wybrane aspekty prawne dotyczące ochrony zadrzewień. Stowarzyszenie Centrum Aktywności Społecznej „Pryzmat”. Suwałki.
- Kasprzak K, Raszka B (2007) Park Krajobrazowy im. Gen. Dezyderego Chłapowskiego. Wydawnictwo WBPiCAK. Poznań.
- Koreleski K (2006) Wstępna ocena wpływu lasów i zadrzewień na wartość gruntów ornych. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* 2(1): 5-14.
- Nowak-Rzasa M (2010) Zadrzewienia śródpolne jako cenny element krajobrazu obszarów wiejskich. *Acta Scientiarum Polonorum. Administratio Locorum* 9(4): 99-106.
- Orłowski G (2003) Waloryzacja zadrzewień śródpolnych fragmentu obszaru rolniczego Równiny Wrocławskiej. *Acta Scientiarum Polonorum. Silvarum Colendarum Ratio et Industria Lignaria* 2(1): 47-58.
- Orzechowski M, Trzcianowska M (2016) Zadrzewienia śródpolne w gospodarowaniu przestrzenią. *Studia i Materiały Centrum Edukacji Przyrodniczo-Leśnej* 16(5): 153-163.
- Raszeja E (2010) Struktura krajobrazu rolniczego w Parku Krajobrazowym im. gen. Dezyderego Chłapowskiego. *Acta Scientiarum Polonorum. Administratio Locorum* 9(1): 97-110.
- Kupidura A, Kupidura M, Łuszcwski M (2011) Wartość krajobrazu – Rozwój przestrzeni obszarów wiejskich. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Wiśniewska M (2007) Osadnictwo wiejskie, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej. Warszawa.
- Ryszkowski L (1998) Nature-friendly farming. Shelterbelts in Poland. *Naturopa* 86: 9.
- Waszak A (2002) Drzewa i krzewy na obrzeżach miast. *Przegląd Komunalny* 6(18): 76-77.
- Strony internetowe:
<https://regionwielkopolska.pl>
<http://wsrodpol.swietodrzewa.pl>

10. Broń chemiczna jako jeden z rodzajów broni masowego rażenia

Chemical weapons as one of the types of Weapons of Mass Destruction

Edyta Janik⁽¹⁾, Michał Ceremuga⁽²⁾, Maksymilian Stela⁽³⁾, Michał Bijak⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centrum Zapobiegania Zagrożeniom Biologicznym, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

⁽²⁾ Wojskowy Instytut Techniczny Uzbrojenia, Zielonka

⁽³⁾ Zakład Rozpoznania i Likwidacji Skażeń, Wojskowy Instytut Chemii i Radiometrii, Warszawa
Opiekun naukowy: dr hab. Michał Bijak prof. UŁ

Edyta Janik: edyta.janik@unilodz.eu

Słowa kluczowe: iperyt siarkowy, fosgen, sarin, broń chemiczna

Streszczenie

Jednym z rodzajów broni masowego rażenia jest broń chemiczna, której podstawowym czynnikiem rażącym jest związek chemiczny o toksycznych właściwościach. Dodatkowo do broni chemicznej oprócz samych związków chemicznych wliczają się ich prekursorzy a także wszystkie urządzenia specjalnie zaprojektowane do bezpośredniego użycia tego typu broni. Czynniki broni chemicznej należą do różnych klas związków i wykazują różne właściwości fizykochemiczne i toksyczne. Wśród najważniejszych czynników zaliczanych do broni chemicznej można wymienić: sarin, tabun, soman, Vx, iperyt siarkowy, fosgen, chlor czy też cyjanowodor. Czynniki te na wielką skalę zostały po raz pierwszy wykorzystane podczas I Wojny Światowej, czego wynikiem była śmierć ponad miliona osób. Pierwszym krokiem mającym na celu zakaz używania tej broni podczas konfliktów zbrojnych było podpisanie Protokołu Genewskiego, który jednak nie zakazywał produkcji i badań nad bronią chemiczną. Dopiero w 1993 roku podpisano Konwencję o Zakazie Broni Chemicznej, która zakazała badań, produkcji i przechowywania broni chemicznej. Pomimo obowiązującej Konwencji m.in. w Syrii przeprowadzone zostały ataki terrorystyczne z wykorzystaniem broni chemicznej.

1. Wstęp

Broń chemiczna to jeden z rodzajów broni masowego rażenia, której czynnikami są związki chemiczne i ich prekursorzy posiadające toksyczne właściwości, mogące powodować czasowe obezwładnienie, obrażenia ciała, zaburzenia sensoryczne oraz śmierć. Do broni chemicznej należą również wszelkie urządzenia specjalnie zaprojektowane do bezpośredniego użycia tego typu czynników. Wśród broni masowego rażenia broń chemiczna jest jedną z najbardziej brutalnych stworzonych przez człowieka. Czynniki broni chemicznej charakteryzują się wysoką toksycznością i mogą zostać użyte w postaci gazu, cieczy i aerozolu bądź środki adsorbowane na cząstkach w celu uzyskania proszku (Ganesan i in. 2010). Jako jedne z pierwszych wydarzeń, kiedy użyto broni chemicznej można wymienić toksyczne dymy wywołujące ślepotę i substancje zapalające w trakcie trwania wojen toczonych w starożytnych Indiach około 2000 roku p.n.e. W trakcie wojen peloponeskich trwających w latach 431-404 roku p.n.e. wykorzystano trujące opary powstałe ze spalania drewna nasączonego siarką, które kierowano w stronę przeciwnika. Zastosowanie trujących związków chemicznych pozyskanych z ekstraktów roślinnych w celu zatruwania przeciwników jest szeroko udokumentowane w średniowieczu i renesansie, natomiast po znacznym rozwoju przemysłu chemicznego w XIX wieku możliwa stała się masowa produkcja i zastosowanie związków chemicznych w trakcie działań wojennych. Wykorzystanie czynników broni chemicznej znacznie wzrosło podczas I Wojny Światowej (1914-1918). Związki takie jak fosgen, chlor, iperyt siarkowy czy cyjanek stały się elementem uzbrojenia wojsk każdej ze stron. Działania te zapoczątkowały wojska niemieckie, które w 1915 roku skutecznie wykorzystywały chlor przeciwko wojskom belgijskim stacjonującym w Ypres. Atak ten był pierwszym atakiem gazowym w historii, w którym ogłoszono nowy rodzaj broni wkraczający na pola bitwy. W wyniku braku właściwego przygotowania ochrony

przed tego typu atakiem (np. maski przeciwgazowe) zginęło ok. 5000 osób a 15 000 żołnierzy belgijskich i innych wojsk znajdujących się w tym regionie zostało rannych (Dickinson i in. 2017).

To wydarzenie było pierwszym użyciem czynnika chemicznego na dużą skalę z zamiarem spowodowania poważnych obrażeń lub śmierci, dlatego zostało zaklasyfikowane jako użycie broni masowego rażenia. Wykorzystanie gazów bojowych trwało do końca wojny. W tym samym roku siły niemieckie użyły także fosgenu. W 1917 roku po raz pierwszy użyto iperytu siarkowego, który działał drażniąco także na skórę. Łącznie ponad 190 000 ton związków chemicznych zostało użytych na polach bitew, w większej części na froncie zachodnim. Wśród nich znajdowały się fosgen, gaz łzawiący, iperyt siarkowy, cyjanowodór, luizyty. Związki pochłonęły ponad 1,3 mln ofiar. Krajami zaangażowanymi w rozwój broni chemicznej były Niemcy, Wielka Brytania, Stany Zjednoczone i Francja. Po tym, jak niemieckie siły zbrojne po raz pierwszy użyły chloru, wiele państw rozpoczęło intensywne badania nad różnymi związkami chemicznymi. W latach 1915–1918 prawie każda znana szkodliwa substancja chemiczna była badana pod kątem jej potencjału jako broni. Wielka Brytania zastosowała adamsyt przeciwko wojskom rosyjskim w 1919 r. i prawdopodobnie przeciwko Irakowi w latach dwudziestych. Bolszewicy używali trującego gazu podczas chłopskiej Rebelii Tambowskiej w 1920 roku. Hiszpania stosowała chemikalia przeciwko marokańskim plemionom w latach dwudziestych a Włochy zastosowały iperyt siarkowy przeciwko Libii w 1930 r. oraz w Etiopii w 1936 roku. 17 czerwca 1925 r. podpisano Protokół Genewski, czyli międzynarodowy układ dotyczący zakazu stosowania podczas wojen duszących, trujących i podobnych gazów oraz cieczy a także środków bakteriologicznych. Tego dnia protokół podpisało 36 krajów, w tym Niemcy, Belgia, Wielka Brytania, Włochy, Rosja, Francja, Austria i Stany Zjednoczone. Protokół ten zakazywał stosowania broni chemicznej i biologicznej jednak nie zakazywał prowadzenia badań nad nimi, produkcji oraz przechowywania. Zarówno Włochy jak i Niemcy produkowały duże zapasy broni chemicznej podczas II wojny światowej wraz z Rosją, Stanami Zjednoczonymi i Wielką Brytanią, ale nigdy nie używały ich w Europie z wyjątkiem zgłoszonego w 1939 r. przypadkowego użycia iperytu siarkowego przez wojska niemieckie w Warszawie. Egipt użył broni chemicznej, choć nieskutecznie, w Jemenie w 1963 roku. Japońska sekta Aum Shinrikyō w 1995 r. dokonała w tokijskim metrze zamachu terrorystycznego z użyciem sarinu. Skutkiem ataku śmierć poniosło 12 osób a ponad 5000 było rannych. W 1993 r. przyjęta została Konwencja o Zakazie Broni Chemicznej. Realizacja zadań Konwencji została powierzona powołanej w tym celu Organizacji ds. Zakazu Broni Chemicznej, mającej swoją siedzibę w Hadze, w Holandii. Konwencja obowiązuje od 1997 roku (Walker 2017; Ganesan i in. 2010). Naruszenie obowiązującej Konwencji wielokrotnie miało miejsce np. w Syrii. Największy atak z wykorzystaniem czynników broni chemicznej został przeprowadzony w 2013 roku. Podczas ataku na Ghutę wykorzystano sarin należący do związków typu paralityczno-drgawkowego. Obecnie na całym świecie terroryzm chemiczny stanowi poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa ludzi, którego skala ofiar przewyższa te spowodowane bronią konwencjonalną. Szacuje się, że około 70 różnych związków zostało wykorzystanych lub zgromadzonych do działań wojennych w XX wieku. Biorąc pod uwagę najnowsze osiągnięcia technologiczne, łatwy dostęp do surowców, dostępność technicznych informacji w Internecie, wzrost przestępczości i korupcji terroryści nie mają trudności z wykorzystaniem czynników broni chemicznej do osiągnięcia swoich celów (Patocka 2016; Szinicz 2005).

2. Klasyfikacja czynników broni chemicznej

Broń chemiczną można klasyfikować na różne sposoby. Z punktu widzenia struktury chemicznej głównymi kategoriami są związki siarkoorganiczne, fluoroorganiczne, fosforoorganiczne i związki arsenu. Najczęstsza klasyfikacja dotyczy jednak wywoływanych skutków toksycznych względem ludzi. Na tej podstawie można wyróżnić związki o charakterze paralityczno-drgawkowym, które wpływają na funkcjonowanie układu nerwowego. Związki te nie występują naturalnie. Pierwszym znanym czynnikiem tego typu był tabun, opracowany przez niemieckiego chemika Gerharda Schradera w latach 30 XX wieku podczas jego badań nad rozwojem nowych środków owadobójczych. Do związków o tym charakterze należą również soman, sarin i VX. Wszystkie charakteryzują się wysoką toksycznością, mogą powodować śmierć w ciągu kilku minut do kilku godzin zależnie od stężenia. Związki te działają na organizm powodując nieodwracalne hamowanie

enzymu acetylocholinoesterazy czyli enzymu odpowiedzialnego za uwalnianie z połączeń nerwowych neuroprzekaźnika jakim jest acetylocholina. Hamowanie działania enzymu skutkuje akumulacją acetylocholinoesterazy w obrębie zakończeń nerwowych co prowadzi do nadmiernego pobudzenia lub porażenia nerwu. Skutki działania na organizm obejmują zwężenie źrenicy (tzw. Mioza), zwiększone wytwarzanie śliny oraz wydzieliny z nosa, zwiększone pocenie się, oddawanie moczu, defekację, zwężenie oskrzeli, zmniejszenie częstości akcji serca i ciśnienia krwi, drgawki i skurcze mięśni, zaburzenia rytmu serca. Najbardziej krytycznym skutkiem jest porażenie mięśni oddechowych. Ostatecznie śmierć wynika z porażenia układu oddechowego. Jeśli stężenie czynnika nerwowego jest wysokie, śmierć następuje praktycznie natychmiast (Ganesan i in. 2010). Kolejno wyróżnić można środki o charakterze parzącym, którą powodują m.in. oparzenia skóry. Przedstawicielami środków parzących są przede wszystkim iperyt siarkowy, luizyty, iperyt azotowy. Związki te wywołują podrażnienia oczu, w tym zapalenie spojówek, zmętnienie rogówki i owrzodzenie. Uszkodzenia skóry mogą objawiać się obecnością rumienia podobnego do oparzeń słonecznych po pęcherze i martwicę. Inhalacja może uszkodzić błonę śluzową dróg oddechowych i prowadzić do ich niedrożności a także może powodować tworzenie się błon rzekomych. Do środków duszących zaliczają się cyjanowodor i chlorocyjan. Mechanizm ich działania polega na hamowaniu układu enzymatycznego oksydazy cytochromowej i blokowaniu transportu tlenu do tkanek wywołując tym samym uszkodzenia narządów w organizmie. Cyjanowodor odkryty po raz pierwszy przez szwedzkiego chemika w 1872 roku. Stosowany był w przemyśle chemicznym na długo przed wybuchem I Wojny Światowej. Francuzi jako pierwsi użyli pocisków z cyjanowodorem w bitwie pod Sommą w 1916 roku. Fosgen, difosgen, chlor i chloropikryna należą do środków o charakterze krtuszącym. Niska i umiarkowana ekspozycja na te związki wywołuje ból oka, łzawienie, kaszel, duszności i skurcz oskrzeli. Wysokie stężenia indukują skurcz krtani, rozległą martwicę tkanek, obrzęk płuc i w końcu niewydolność oddechową. Związki te na ogół są cięższe od powietrza. Zarówno chlor jak i fosgen są wykorzystywane w wielu procesach przemysłowych. Dodatkowo wśród czynników broni chemicznej wyróżnić można środki chemiczne, które wywołują zmiany w myśleniu, percepcji i nastroju, nie powodując żadnych poważnych zaburzeń w autonomicznym układzie nerwowym ani innych poważnych niepełnosprawności i są określane jako czynniki psychomimetyczne. Grupa ta zwykle obejmuje substancje, które podawane w małych dawkach (<10 mg), powodują stany podobne do zaburzeń psychiatrycznych lub innych objawów pochodzących z ośrodkowego układu nerwowego takie jak utrata uczucia, omamy, niepokój, otępienie czy fobie. Do tej grupy można zaklasyfikować LSD, psylocybinę i ibogainę. Wyróżnić można także związki pomocnicze, które powodują tymczasowe obezwładnienie przez podrażnienie oczu (łzawienie i skurcz powiek) i podrażnienie górnych dróg oddechowych czy też wymioty. Do tej grupy można zaliczyć np. gaz łzawiący (Black 2016; Geoghegan i in. 2006).

3. Charakterystyka wybranych czynników broni chemicznej

3.1 Iperyty siarkowy

Iperyty siarkowy ($C_4H_8Cl_2S$) nazywany także gazem musztardowym w warunkach normalnych jest lepka, słabo lotna, oleista cieczą. Jest słabo rozpuszczalny w wodzie i bardzo dobrze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych a jego barwa obejmuje kolory od jasnożółtego do ciemnego brązu. Iperyty siarkowy po raz pierwszy został zsyntetyzowany na początku XIX wieku przez Despretza (1822), a później przez Guthrie i Niemann (1860), w którym to czasie zauważono jego charakterystyczny musztardowo - czosnkowy zapach oraz działanie drażniące na skórę. Gaz musztardowy jest związkiem alkilującym, który po absorpcji wiąże się łatwo z szeregiem ważnych biologicznie cząsteczek, w tym białek i kwasów nukleinowych. Za toksyczne właściwości iperytu odpowiedzialna jest reakcja wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania powodująca powstanie reaktywnego cyklicznego jonu sulfonowego, zdolnego do reakcji z DNA (Balali-Mood i in. 2005; Black 2016). Oczy są bardzo wrażliwe na kontakt z iperytem. Podatność ta związana jest z kilkoma cechami oka, w tym z wodno-śluzową powierzchnią rogówki i spojówki, a także z dużą szybkością obrotu i intensywną aktywnością metaboliczną komórek nabłonka rogówki. Pierwsze objawy kliniczne pojawiają się około godziny po ekspozycji, zaczynając od wrażenia szorstkości,

postępującej bolesności i przekrwienia, a następnie do obrzęku i wszystkich objawów ostrego zapalenia spojówek. W ciągu 2 - 6 godzin po ekspozycji pojawia się silny ból oka, łzawienie, światłowstręt a czasem nawet przejściowa ślepota. Dodatkowo wystąpić mogą skurcz powiek, obrzęk okołoooczodołowy i stany zapalne. Ze strony układu oddechowego pojawić się mogą nieżyt nosa i krwawienia, ból gardła, uszkodzenie krtani, zapalenie tchawicy i oskrzeli. Przy większym stężeniu iperytu następuje kaszel z ropną płwociną, zapalenie płuc, martwica błony śluzowej i niewydolność oddechowa. Kontakt iperytu siarkowego ze skórą skutkuje rumieniem, pojawieniem się pęcherzy, złuszczeniem naskórka, zmianami pigmentacyjnymi skóry i martwicą. Oparzenia spowodowane tym związkami goją się znacznie trudniej niż oparzenia termiczne. Narażenie na wysokie stężenia iperytu może również powodować toksyczność ogólnoustrojową zwłaszcza upośledzenie czynności szpiku kostnego, w konsekwencji supresja immunologiczna i zwiększona podatność na infekcje. Opieka medyczna opiera się na wykorzystywaniu opatrunków z solą srebrną sulfatazolu oraz traktowaniu skóry roztworami steroidowymi w celu zmniejszenia podrażnienia i swędzenia. Otwarte pęcherze oczyszcza się solą fizjologiczną. Podaje się także leki przeciwhistaminowe a w ciężkich przypadkach także środki uspokajające. Oczywiście przemyć jak najszybciej wodą. Należy unikać opasek na oczy i bandaży, ponieważ mogą podnieść temperaturę i przyspieszyć efekty toksyczne. W przypadku układu oddechowego zaleca się stosowanie antybiotykoterapii ze względu na ryzyko wtórnych infekcji. Wdychanie beklometazonu w dużych dawkach zapobiega obrzękowi płuc. Dodatkowo podaje się też leki rozszerzające oskrzela ((Dickinson i in. 2017; Shakarjian 2009).

3.2 Sarin

Sarin to związek fosforoorganiczny. W temperaturze pokojowej występuje jako klarowna, bezbarwna i bezwonna ciecz. Ze względu na wysoką lotność można go łatwo przekształcić z postaci płynnej w gazową. Synteza sarinu polega estryfikacji difluorku metylofosfonowego izopropanolem w obecności izopropylaminy, który pełni rolę katalizatora zasadowego i substancji zobojętniającej powstający fluorowodór. Mechanizm działania polega na nieodwracalnym blokowaniu działania acetylocholinoesterazy czyli enzymu, który rozkłada acetylcholinę poprzez tworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy atomem fosforu inhibitora a centrum esterazowym enzymu a następnie fosforylacji grupy serynowej. Zahamowanie działania acetylocholinoesterazy powoduje nagromadzenie się w szczelinach synaptycznych i płytkach nerwowo-mięśniowych znacznych ilości acetylcholiny (Chai i in. 2017). Skutkiem tego jest pobudzenie receptorów nikotynowych i muskarynowych co określa się jako „przełom cholinergiczny”. Pobudzenie receptorów muskarynowych powoduje zwężenie źrenic i brak reakcji na światło, nadmierne ślinienie i łzawienie, wymioty, biegunkę, duszności, obrzęk płuc oraz bradykardię. Pobudzenie receptorów nikotynowych wywołuje natomiast osłabienie mięśniowe, oczopląs, drżenia włókienkowe mięśni. Dodatkowymi objawami zatrucia są także zaburzenia mowy, niepokój, trudności z koncentracją. W celu odkażenia powierzchni skóry narażonej na działania sarinu należy użyć wody z mydłem, soli fizjologicznej lub wodnego, alkalicznego roztworu podchlorynu sodu. Leczenie obejmuje przede wszystkim podawanie tlenu, środków przeciwdrgawkowych i uspokajających. Podać należy także leki antycholinergiczne np. atropinę i oksymy. Atropina działa jako konkurencyjny antagonistą przeciwko nadmiarowi acetylcholiny, wiążąc się z receptorami muskarynowymi w obwodowym układzie nerwowym i ośrodkowym układzie nerwowym. Oksymy działają jako reaktywatory acetylocholinoesterazy poprzez hydrolizę fosforylowanego enzymu. Chociaż sarin wykazuje wysoką toksyczność, w organizmie jest szybko metabolizowany i wydalany. Głównym metabolitem sarinu jest kwas izopropylometylofosfonowy, który wydalany jest z organizmu głównie z moczem. U szczurów, którym wstrzyknięto sarin, 59% i 91% podanej dawki zostało wydalone odpowiednio po 4 i 24 godzinach. Po 48 godzinach metabolit ten był niewykrywalny w moczu (Abou-Doni i in. 2016; Matson i in. 2017).

3.3 Fosgen

Fosgen (COCl₂) czyli tlenochlorek węgla jest bezbarwnym, toksycznym gazem o charakterystycznym, słodkim zapachu skoszonego siana. Fosgen jest niepalny, cięższy od powietrza, rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych (toluen, benzen, kwas octowy) a w wodzie ulega hydrolizie do kwasu octowego i dwutlenku węgla. W temperaturze poniżej 7 °C

występuje w postaci żółtawej cieczy i w tej formie jest transportowany. W temperaturze pokojowej natomiast ma postać gazu. Podczas wybuchów tworzy białawą a następnie bezbarwną chmurę gazu cięższego od powietrza (Solińska-Lewna 2010). Fosgen wykorzystywany jest w różnych gałęziach przemysłu farmaceutycznego i chemicznego. Podstawowym zastosowaniem fosgenu jest wytwarzanie diizocyanianu toluenu, który jest prekursorem żywic poliuretanowych używanych do wytwarzania pianek czy elastomerów. Fosgen stosuje się również w produkcji herbicydów, pestycydów, barwników i leków. Oprócz przemysłowej produkcji podejrzanymi źródłami fosgenu atmosferycznego są emisje niezorganizowane, rozkład termiczny chlorowanych węglowodorów i fotoutlenianie chloru etylu. Narażenie na fosgen może wystąpić w pożarach z udziałem niektórych chlorowanych związków organicznych występujących w wielu rozpuszczalnikach domowych np. zmywaczach do farb i płynach do czyszczenia na sucho. Uważa się, że toksyczne właściwości fosgenu determinowane są przez dwa różne mechanizmy: hydrolizę i acylację. W pierwszym mechanizmie fosgen ulega hydrolizie do chlorowodoru i dwutlenku węgla w kontakcie z wodą w drogach oddechowych. Drugim i prawdopodobnie bardziej szkodliwym mechanizmem działania fosgenu jest acylacja. Dzięki acylacji fosgen reaguje z grupami hydroksylowymi, tiolowymi, aminowymi i sulfhydrylowymi w białkach, węglowodanach i lipidach. Liczne badania na zwierzętach i opisy przypadków u ludzi mających kontakt z fosgenem wykazały łzawienie oczu i obrzęk spojówek, podrażnienie górnych dróg oddechowych, wzrost przepuszczalności naczyń i obrzęk płuc. Coraz więcej dowodów sugeruje, że ekspozycja na fosgen inicjuje kaskadę zapalnych cytokin i innych mediatorów, prowadząc do zwiększonej przepuszczalności naczyń włosowatych płuc i tworzenia obrzęków. Postępowanie w przypadku zatrucia tym związkiem jest zasadniczo wspomagające. Odkażenie odgrywa tutaj kluczową rolę i jeśli jakkolwiek obszar skóry został odsłonięty należy dokładnie opłukać miejsce wodą z mydłem. Należy także wspomagać funkcjonowanie układu oddechowego. Antybiotyki powinny być podawane tylko w przypadku zapalenia płuc bądź oskrzeli. Wczesna interwencja jest istotna, ponieważ może zmniejszyć liczbę wolnych rodników odpowiedzialnych za peroksydację lipidów czy zapobiec uwalnianiu biologicznych mediatorów, takich jak leukotrieny, które są odpowiedzialne za zwiększona przepuszczalność naczyń włosowatych płuc. W badaniach na zwierzętach wykazano korzystne działanie przy podawaniu wielu leków, w tym antagonistów leukotrienów, ibuprofenu, kolchicyny, cyklofosfamidu, terbutaliny, aminofiliny i izoproterenolu (Polat 2018; Hardison 2014; Vaish 2013).

4. Podsumowanie

Broń masowego rażenia to broń mogąca spowodować masowe ofiary wśród ludności. Do tego typu broni zaliczyć można broń nuklearną, radiologiczną, biologiczną i chemiczną. Zdolność broni masowego do rażenia celów żywych jest niezaprzeczalna a skutki jej użycia nie kończą się zaraz po jej zastosowaniu. Często powrót do pełnego zdrowia ludzi narażonych na jej działanie jest długi lub niemożliwy. Rozwój broni chemicznej przypada na XX wiek a podczas I Wojny Światowej. W wyniku stosowania mi.in. chloru, iperytu siarkowego i fosgenu zginęło ponad milion osób. Broń chemiczną można podzielić na kilka kategorii w zależności od wywoływanych skutków i wyróżnić można środki duszące, parzące, paralityczno-drgawkowe i halucynogenne. W teorii badania nad bronią chemiczną i jej produkcja jest zakazana przez obowiązującą od 1997 roku Konwencję lecz w praktyce w ostatnich latach miało miejsce przynajmniej kilka ataków z wykorzystaniem tego typu broni. Obecnie broń chemiczna stanowi bardzo duży problem w kontekście zagrożeń terrorystycznych, od lat służby na całym świecie pozyskują informacje o zainteresowaniu tego typu czynnikami przez organizacje terrorystyczne, dlatego też wiedza na temat broni chemicznej pomimo konwencji powinna być stale rozwijana w kontekście przeciwdziałania skutkom jej ewentualnego użycia.

5. Literatura

Abou-Donia M, Siracuse B, Gupta N et. al (2016) Sarin (GB, O-isopropyl methylphosphonofluoridate) neurotoxicity: critical review. *Critical Reviews in Toxicology* 46: 845-875.

- Balali-Mood M, Hefazi M (2005) The Clinical Toxicology of Sulfur Mustard. *Archives of Iranian Medicine* 8: 162-179.
- Black R (2016) Development, Historical Use and Properties of Chemical Warfare Agents , in *Chemical Warfare Toxicology*. In: *Fundamental Aspects* 1: 1-28.
- Chai PR, Boyer EW, Al-Nahhas H et. Al. (2017) Toxic chemical weapons of association and warfare: nerve agents VX and sarin. *Toxicology Communication* 1: 21-23.
- Dickinson ET, Love JS (2017) A Review of Chemical Warfare Agents and Treatment Option. *Journal of Emergency Medical Services* 42.
- Ganesan K, Raza SK, Vijayaraghavan R (2010) Chemical warfare agents. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences* 2: 166-178.
- Geoghegan J, Tong JL (2006) Chemical Warfare Agents. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care and Pain* 6: 230 – 234.
- Hardison LS, Wright E, Pizon AF (2014) Phosgene Exposure: A Case of Accidental Industrial Exposure. *Journal of Medical Toxicology* 10: 51-56.
- Heymann WR (2014) Threats of biological and chemical warfare on civilian populations. *Journal of the American Academy of Dermatology* 51: 452-453
- Matson LM, Lee-Stubbs RB, Cadieux CL et. Al. (2017) Assessment of mouse strain differences in baseline esterase activities and toxic response to sarin. *Toxicology* 410: 10-15.
- Patocka J (2016) Syria Conflict and Chemical Weapons: What is reality? *Military Medical Science Letters* 85: 1-5.
- Polat S, Gunata M, Parlakpınar H (2018) Chemical Warfare Agents and Treatment Strategies. *Annals of Chemical Research* 25:776-782.
- Solińska-Lewna B, Hermelin A (2010) Zatrucie fosgenem – Analiza przypadków. *Medycyna pracy* 61: 101-104.
- Shakarjian MP, Heck DE, Gray JP (2009) Mechanism Mediating the Vesicant Actions of Sulfur Mustard after Cutaneous Exposure. *Toxicological Sciences* 114:5-19.
- Szinic L (2005) History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 214: 167-181.
- Walker PF (2017) A Century of Chemical Warfare: Building a World Free of Chemical Weapons. In: *One Hundred Years of Chemical Warfare: Research, Deployment, Consequences*. Springer, Cham. 379-400.
- Vaish AK, Consul S, Agrawal A et. Al. (2013) Accidental phosgene gas exposure: A review with background study of 10 cases. *Journal of Emergencies Trauma and Shock* 6: 271-275.

11. Niekonwencjonalne wykorzystanie olejów jadalnych jako środków smarnych

Unconventional use of edible oils as lubricants

Szczypka Monika

Katedra Agrotechnologii i Analizy Jakości, Wydział Inżynierii Produkcji, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, ul. Komandorska 118/120; 53-345 Wrocław

Opiekun naukowy: prof. nadzw. dr hab. inż. Wojciech Golimowski

Szczypka Monika: monika.szczypka@ue.wroc.pl

Słowa Kluczowe: tłuszcze roślinne, technologia żywności, paliwa, tribologia, medycyna

Streszczenie

Oleje roślinne pod względem chemicznym to triacyloglicerole (TAG) zbudowane z cząsteczki glicerolu i trzech cząsteczek kwasów tłuszczowych, połączonych wiązaniem estrowym. Tłuszcze roślinne stanowią źródło energii dla organizmu człowieka ze względu na to, iż są one źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym z rodziny n-3 i n-6 oraz witamin. Wykazują one właściwości prozdrowotne, które w znacznej mierze zależą od ilości i jakości kwasów tłuszczowych, czy ww. witamin. Ponadto oleje roślinne znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach życia m.in. w żywieniu, dietetyce, medycynie, kosmetologii, jako alternatywne paliwa oraz w tribologii. Oleje pochodzenia roślinnego, oprócz wykorzystania ich jako żywności, mają również szerokie zastosowanie m.in. w przemyśle, a przeprowadzone badania dowiodły, iż możliwe jest zasilanie silników wysokoprężnych zarówno estrami metylowymi oleju rzepakowego, jak i surowym olejem rzepakowym. Przykładowym zastosowaniem oleju w przemyśle jest jego użycie do pracy pilarki łańcuchowej. Tribologia to nauka umożliwiająca poznanie procesów tarcia, zużycia oraz smarowania zespołów ruchomych podczas styku ciał stałych. Podczas procesów zachodzących pomiędzy ciałami stałymi zachodzą przemiany wielkości funkcjonalnych takich jak: ruch, praca oraz materiał. Środki smarne, będące podstawą badań tribologicznych, mogą być produkowane z różnych surowców, w tym biodegradowalnych. Do najczęściej stosowanych surowców biodegradowalnych zalicza olej rzepakowy, sojowy, gorczycowy, czy olej z alg. Wybór surowca do zastosowania jako środek smarny zależy m.in. od regionu geograficznego, jego dostępność oraz kosztów produkcji roślin oleistych. Ponadto oleje roślinne w porównaniu do wszystkich innych olejów bazowych pochodzenia mineralnego, które znalazły zastosowanie przy produkcji środków smarnych, wykazują zdecydowanie największą biodegradowalność.

1. Wstęp

Podstawnym zjawiskiem fizycznym, umożliwiającym współpracę elementów składowych maszyn i urządzeń jest tarcie, będące podstawą wielu badań tribologii. Jak ważne jest poznanie zjawisk, którymi zajmuje się tribologia przekonał się już pod koniec lat sześćdziesiątych XX wieku rząd brytyjski, który ocenił straty ponoszone przez ich gospodarkę wskutek zużywania się maszyn na około 515 milionów funtów rocznie (Lawrowski, 2008).

Obecna polityka zrównoważonego rozwoju krajów należących do Unii Europejskiej jako podstawowe założenie określiła ograniczenie negatywnego wpływu działalności człowieka na środowisko przyrodnicze. Produkty pochodzenia naftowego, w różnych warunkach eksploatacyjnych, negatywnie wpływają na środowisko przyrodnicze. Najczęstszą przyczyną dostania się środków smarnych do środowiska jest rozszczelnienie układu smarnego, nieprawidłowe zastosowanie systemu smarowania oraz odparowania czynnika smarnego.

Aktualna działalność proekologiczna polega na poszukiwaniu innowacyjnych, alternatywnych do obecnych materiałów, surowców biodegradowalnych. Produkty naftowe takie jak oleje mineralne wykazują niską zdolność (od 15% do 35%) do biochemicznego rozkładu w środowisku (Pettersson, 2007). Szkodliwe dla środowiska przyrodniczego produkty, w tym wymienione powyżej produkty

naftowe, zastępowane są alternatywnymi surowcami biodegradowalnymi. Oleje roślinne, jak również produkty syntetyczne to najczęściej wymieniane odpowiedniki dla baz naftowych. Ze względu na szybszy proces biochemicznego rozkładu olejów roślinnych w środowisku przyrodniczym, w porównaniu do olejów mineralnych, cechują się one znacznie lepszą biodegradowalnością wynoszącą od 80 do 100%. Ponadto oleje roślinne niezależnie od pochodzenia geograficznego, czy warunków uprawy roślin, w porównaniu do wszystkich innych olejów bazowych, które znalazły zastosowanie przy produkcji środków smarnych, wykazują większą biodegradowalność. Fakt ten tłumaczony jest w literaturze tym, iż są to materiały syntezowane przez przyrodę (Pettersson, 2007; Rogoś i Urbański, 2014).

2. Opis zagadnienia

Celem pracy była analiza niekonwencjonalnego wykorzystania olejów jadalnych stosowanych w tribologii jako środków smarnych. Oleje roślinne stanowią kompozycję naturalnych związków estrowych glicerolu z kwasami tłuszczowymi. To właśnie kwasy tłuszczowe decydują o właściwościach fizykochemicznych lipidów. Długość łańcucha oraz liczba i położenie podwójnych wiązań decyduje o właściwościach i znaczeniu żywieniowym poszczególnych kwasów tłuszczowych i tworzonych przez nie triacylogliceroli (Beran, 2008). Obecnie coraz większą wagę przywiązuje się do wykorzystania tłuszczów niejadalnych, które mogą być używane do celów technicznych. Niejadalne tłuszcze roślinne oraz zwierzęce powstają w szeregu procesów związanych z produkcją spożywczą oraz przemysłową (Ferenc i Pikoń, 2005).

Jako środki smarne duże zainteresowanie wśród badaczy budzą m.in. oleje mineralne, półsyntetyczne, syntetyczne oraz roślinne. Oleje roślinne są bardziej biodegradowalne oraz mniej toksyczne dla środowiska, niż oleje mineralne. Środki smarne produkowane są z różnych surowców, w tym najczęściej z olejów roślinnych takich jak olej rzepakowy, gorczycowy, sojowy, czy olej z alg (Gawęcki, 1997).

3. Przegląd literatury

Tłuszcze roślinne od lat znajdowały zastosowanie w wielu dziedzinach. Źródłem tłuszczów roślinnych są przede wszystkim nasiona uprawnych roślin oleistych takich jak: rzepak, słonecznik zwyczajny, soja, oliwki, len zwyczajny, mak, bawełna, krokosz barwierski, rzodkiew oleista, orzechy ziemne, orzech kokosowy, palma oleista oraz sezam indyjski. Znacznie rzadziej do produkcji olejów używa się owoce ww. roślin. Oleje roślinne charakteryzują się stanem ciekłym w temperaturze pokojowej ($\pm 20^{\circ}\text{C}$), natomiast wyjątek stanowią: olej kokosowy, z ziaren palmowych oraz olej palmowy, które w temperaturze pokojowej są olejami stałymi. Tłuszcze roślinne w zależności od rodzaju charakteryzują się znaczną zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych m.in.: linolenowego (0,1-54%), linolowego (4-75%) czy oleinowego (4-89,5%) w porównaniu do innych produktów żywnościowych, w tym produktów pochodzenia zwierzęcego (Thapa i in., 2018).

Otrzymywane za pomocą mechanicznego wyciskania roślin oleje tłoczone na zimno stanowią cenne źródło NNKT (niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe), witamin czy katorenoidów przyczyniających się do określania ich jako olejów o wysokiej wartości odżywczej. Od wielu lat oleje roślinne używane są w przemyśle spożywczym do produkcji olejów do sałatek, margaryn, majonezów, czy do smażenia, dostarczając jednocześnie niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe dla organizmu. Zawarte w nich cenne nienasycone kwasy tłuszczowe spowodowały, że oleje znalazły szerokie zastosowanie w technologii żywności. Oleje roślinne wykorzystywane są również w żywieniu niemowląt, ze względu na to, iż od narodzin dziecka, ważne jest aby w skład jego diety wchodziły produkty wysokotłuszczowe. W preparatach mlekozastępczych obecnych jest od 21,0 do 27,7 g /100 g proszku produktów wysokotłuszczowych, w skład, których wchodzi nasycone, jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Z badań wynika, że w preparatach mlekozastępczych proporcja nasyconych kwasów tłuszczowych (ang. *saturated fatty acids*, SFA), jednonienasyconych (ang. *monounsaturated fatty acid*, MUFA), a także wielonienasyconych (ang. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) jest zbliżona do tłuszczu obecnego w mleku kobiecym (de Souza i in., 2017).

Tłuszcze roślinne stanowią źródło energii dla organizmu człowieka, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (WNKT) oraz witamin w nich rozpuszczalnych. Zawarte w olejach wielonienasycone kwasy tłuszczowe przyczyniają się do zwiększenia odporności organizmu, a także chronią przed chorobami nerek, wątroby, serca, jak również niwelują stany zapalne skóry. Zawarte w olejach roślinnych kwasy tłuszczowe wykazują pozytywne działanie na skórę, przez co mają coraz szersze zastosowanie w kosmetologii. Oleje roślinne dodane do kosmetyków tworzą warstwę ochronną pokrywającą naskórek, zapobiegając tym samym utracie wody przez skórę. Wykazano, że spożywanie olejów roślinnych przyczynia się do niwelowania stanów zapalnych skóry (Boelsma, 2001). Z kolei niska zawartość kwasu linolowego oraz α -linolenowego w organizmie przyczynia się do powstawania suchej skóry. Podawanie np. kapsułek z olejem z wiesiołka, który jest bogatym źródłem GLA uelastycznia, nawilża, wygładza, poprawia gęstość oraz odporność skóry. Z kolei stosowanie oleju konopnego przez pacjentów ze skórą atopową zmniejsza takie dolegliwości skóry jak jej suchość i świąd (Zhang, 2015).

Przepisy prawne obowiązujące w Unii Europejskiej przyczyniają się do poszukiwania alternatywnych odnawialnych paliw dla silników spalinowych. Poszukiwanie niniejszych źródeł przyczyniło się do odkrycia kolejnego zastosowania dla olejów roślinnych. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż możliwe jest zasilanie silnika surowym olejem rzepakowym jednak wymaga to odpowiedniego przystosowania silnika o zapłonie samoczynnym. Olej napędowy (ON) oraz oleje roślinne (OR) charakteryzują się dobrymi właściwościami fizykochemicznymi, które umożliwiają ich wykorzystania jako paliwo silnikowe (Wojdalski i in., 2013). Wymieniony olej rzepakowy posiada niektóre właściwości korzystniejsze od oleju napędowego, a także właściwości odbiegające od tych, którymi powinny charakteryzować się paliwa mineralne wymagane przez normy (Górski i in., 2015).

Od początku XXI wieku zaobserwowano znaczący wzrost świadomości ekologicznej społeczeństwa europejskiego. Oleje roślinne są bardziej biodegradowalne oraz mniej toksyczne dla środowiska, niż oleje mineralne. W odróżnieniu do tłuszczów naturalnych, jednoznaczne określenie budowy chemicznej bazowych olejów mineralnych jest znacznie bardziej skomplikowane i wymaga zaawansowanych technik detekcji, często ze sobą współzależnych. Właściwości olejów mineralnych zależą od składu ropy naftowej oraz procesów ich obróbki przemysłowej, którym olej został poddany. Skład bazowego oleju mineralnego to węglowodory różniące się strukturą, stopniem nasycenia i masą molową o większym stopniu zróżnicowania niż oleje roślinne. Ponadto oleje mineralne mogą być zanieczyszczone związkami zawierającymi siarkę, azot i tlen. Oleje mineralne, otrzymany z ropy naftowej charakteryzują się bardziej różnorodnymi właściwościami eksploatacyjnymi oraz fizykochemicznymi niż oleje roślinne, jednakże wykluczają aspekt ochrony środowiska (Beran 2008).

Potencjanie możliwe środki smarne mogą bazować na następujących olejach roślinnych: rzepakowym, rzepakowym niskoerukowym, rzepakowym wysokoerukowym, słonecznikowym, słonecznikowym wysokooleinowym, sojowym, oliwkowym, lnianym, palmowym, arachidowym, kukurydzianym, rycynowym, gorczycowym, czy oleju z alg (Szczypka i Golimowski, 2018). Olej rzepakowy niskoerukowy składa się z: 2-4% kwasu palmitynowego ($C_{16}H_{32}O_2$), 1-2% kwasu stearynowego ($C_{18}H_{36}O_2$), 60% kwasu oleinowego ($C_{18}H_{34}O_2$), 20% kwasu linolowego ($C_{18}H_{32}C_2$), 8% kwasu linolenowego ($C_{18}H_{30}O_2$) oraz 2% kwasu erukowego ($C_{22}H_{42}O_2$). Olej rzepakowy wysokoerukowy składa się natomiast z: 2% kwasu palmitynowego ($C_{16}H_{32}O_2$), 1% kwasu stearynowego ($C_{18}H_{36}O_2$), 15% kwasu oleinowego ($C_{18}H_{34}O_2$), 15% kwasu linolowego ($C_{18}H_{32}C_2$), 7% kwasu linolenowego ($C_{18}H_{30}O_2$) oraz 50% kwasu erukowego ($C_{22}H_{42}O_2$). Olej słonecznikowy składa się z: 4-19% kwasu palmitynowego ($C_{16}H_{32}O_2$), 3-6% kwasu stearynowego ($C_{18}H_{36}O_2$), 14-35% kwasu oleinowego ($C_{18}H_{34}O_2$), 50-75% kwasu linolowego ($C_{18}H_{32}C_2$), 0,1% kwasu linolenowego ($C_{18}H_{30}O_2$) oraz nie zawiera kwasu erukowego ($C_{22}H_{42}O_2$). Olej słonecznikowy wysokooleinowy składa się z: 4,5% kwasu palmitynowego ($C_{16}H_{32}O_2$) i kwasu stearynowego ($C_{18}H_{36}O_2$), 89,5% kwasu oleinowego ($C_{18}H_{34}O_2$), 6,0% kwasu linolowego ($C_{18}H_{32}C_2$) i kwasu linolenowego ($C_{18}H_{30}O_2$) oraz nie zawiera kwasu erukowego ($C_{22}H_{42}O_2$). Olej sojowy składa się z: 7-10% kwasu palmitynowego ($C_{16}H_{32}O_2$), 3-5% kwasu stearynowego ($C_{18}H_{36}O_2$), 22-31% kwasu oleinowego ($C_{18}H_{34}O_2$), 49-55% kwasu linolowego ($C_{18}H_{32}C_2$), 6-11% kwasu linolenowego ($C_{18}H_{30}O_2$) oraz nie zawiera kwasu erukowego ($C_{22}H_{42}O_2$). Olej lniany składa się z 6-7% kwasu

palmitynowego ($C_{16}H_{32}O_2$), 3-5% kwasu stearynowego ($C_{18}H_{36}O_2$), 20-26% kwasu oleinowego ($C_{18}H_{34}O_2$), 14-20% kwasu linolowego ($C_{18}H_{32}C_2$), 51-54% kwasu linolenowego ($C_{18}H_{30}O_2$) oraz nie zawiera kwasu erukowego ($C_{22}H_{42}O_2$). Olej kukurydziany składa się z: 9,9% kwasu palmitynowego ($C_{16}H_{32}O_2$), 3,1% kwasu stearynowego ($C_{18}H_{36}O_2$), 29,1% kwasu oleinowego ($C_{18}H_{34}O_2$), 56,8% kwasu linolowego ($C_{18}H_{32}C_2$), 1,1% kwasu linolenowego ($C_{18}H_{30}O_2$) oraz nie zawiera kwasu erukowego ($C_{22}H_{42}O_2$). Olej arachidowy składa się z: 10,4% kwasu palmitynowego ($C_{16}H_{32}O_2$), 8,9% kwasu stearynowego ($C_{18}H_{36}O_2$), 47,1% kwasu oleinowego ($C_{18}H_{34}O_2$), 32,9% kwasu linolowego ($C_{18}H_{32}C_2$), 0,5% kwasu linolenowego ($C_{18}H_{30}O_2$) oraz 0,2% kwasu erukowego ($C_{22}H_{42}O_2$). Olej rycynowy składa się z: 4% kwasu palmitynowego ($C_{16}H_{32}O_2$) i kwasu stearynowego ($C_{18}H_{36}O_2$), 4-5% kwasu oleinowego ($C_{18}H_{34}O_2$), kwasu linolowego ($C_{18}H_{32}C_2$) i kwasu linolenowego ($C_{18}H_{30}O_2$) oraz nie zawiera kwasu erukowego ($C_{22}H_{42}O_2$). W rzeczywistości liczba kwasów tłuszczowych, których zawartość w trójglicerydach określonego tłuszczu jest na tyle duża, by decydować o jego właściwościach (Szczyńska i Golimowski, 2018).

Surowce, które mogą wchodzić w skład środków smarnych cechują się właściwościami fizykochemicznymi charakterystycznymi dla olejów roślinnych. Krótkołańcuchowe kwasy nasycone w temperaturze pokojowej są cieciami, a kwasy nasycone o liczbie atomów większej niż 8 mają konsystencję stałą. Wynika to z faktu, że im krótszy jest łańcuch węglowy kwasu tłuszczowego, tym niższa jest jego temperatura topnienia. Większe znaczenie ma obecność w cząstkach wiązań podwójnych, które powodując załamanie łańcucha węglowego. Dlatego przy tej samej długości łańcucha jednonienasycony kwas elaidynowy o wiązaniu trans jest w temperaturze pokojowej w stanie stałym, podczas gdy izomer cis, czyli kwas oleinowy, jest w stanie ciekłym. Zawierające więcej wiązań podwójnych kwas linolowy i linolenowy niż kwas elaidynowy zachowują postać cieczy nawet podczas przechowywania w lodówce (Gawęcki, 1997).

Należy zaznaczyć, że źle przechowywane, nadmiernie ogrzewanie lub przemysłowe przetwarzanie tłuszczu prowadzi do pojawienia się niepożądanych pochodnych kwasów tłuszczowych o zmienionej strukturze chemicznej. Skutkiem wymienionych powyżej działań jest m.in. powstanie izomerów położeniowych oraz wiązania w konfiguracji trans, a także licznych produktów utleniania (aldehidów, nadtlenków), rozpadu (hydrolitycznego) lub polimeryzacji. Niewłaściwe przechowywanie środków smarnych, które przez długi czas narażone są na czynniki atmosferyczne powoduje powstanie rozwarstwienia charakteryzującego się powstaniem na powierzchni cieczy lepkiej lub twardej warstwy przyczyniającej się do powstawania niepożądanych oporów tarcia (Hoffmann i in., 2016). Do określenia negatywnego wpływu czasu przechowywania na oleje może posłużyć liczba kwasowa, która jest istotnym parametrem określającym zawartość pierwotnych produktów utleniania lipidów, w tym ilość wolnych kwasów tłuszczowych powstających podczas hydrolizy badanych tłuszczów. Za pomocą oznaczenia liczby kwasowej możliwe jest zbadanie jakości tłuszczu (Wroniak i in., 2006). Liczba kwasowa jest więc parametrem, na podstawie którego można określić prawdopodobieństwo prawidłowej pracy układu eksploatacyjnego, w którym występują siły tarcia (Kałdoński i Król, 2010).

Gęstość jest jedną z podstawowych cech materii, definiowana jako masa jednostki objętości ciała lub stosunek masy ciała do jego objętości. Parametr ten służy do określenia przydatności danego oleju do smarowania układu. Dla produktów olejowych, a w szczególności naftowych gęstość podawana jest w temperaturze $15^{\circ}C$. Należy nadmienić, że gęstość zależna jest od temperatury i wraz z jej wzrostem maleje (Kałdoński i Król, 2010). Gęstość jest istotnym parametrem, gdyż wpływa na system wtryskiwania. Jej wzrost spowodowany zmianą wielkości cząsteczek przyczynia się do spadku efektywności mieszania paliwa z powietrzem, w konsekwencji obniżona zostaje skuteczność wtryskiwania (Myczko i Golimowska, 2011). W Polsce oleje hydrauliczne stanowią 40% zużycia olejów przemysłowych. Znalazły one szerokie zastosowanie w maszynach i urządzeniach przemysłowych oraz pojazdach maszynowych. Badania wykazały, że alternatywą dla bazy naftowej mogą być oleje roślinne oraz produkty syntetyczne (Rogoś i Urbański, 2014). Jeden z kolejnych parametrów charakterystyki reologicznej dla cieczy eksploatacyjnych, poza gęstością, są lepkość dynamiczną, względną oraz lepkość kinematyczna. Lepkość jest parametrem za pomocą którego określa się opory przepływu, jakie stawia płyn (gaz lub ciecz) podczas przemieszczania się. Dla olejów smarnych oraz cieczy eksploatacyjnych istotnym jest fakt, że lepkość, tak jak i gęstość

niniejszych cieczy jest funkcją temperatury, co oznacza, że wraz ze wzrostem temperatury ich lepkość maleje. Każdy układ eksploatacyjny ma charakterystyczny, optymalny zakres lepkości stosowanych cieczy smarujących, eksploatacyjnych, czy hydraulicznych. W ekstremalnych warunkach zwiększenie lepkości może przyczynić się do zniszczenia, niektórych elementów maszyny lub uniemożliwić jej dalszą pracę. Wiąże się to w konsekwencji z kosztami ekonomicznymi dla firm, dlatego też należy kontrolować zarówno gęstość, jak i lepkość stosowanych olejów smarnych (Hoffmann i in., 2016).

4. Podsumowanie

Oleje roślinne stanowią bogate źródło wielonienasyconych niezbędnych kwasów tłuszczowych. Prozdrowotne działanie olejów roślinnych znalazło szerokie zastosowanie w medycynie, kosmetologii, technologii żywności, diecie, jako paliwa oraz w tribologii. Czynniki determinującymi jakość olejów jadanych są kwasy tłuszczowe oraz zawarte w nich związki przeciwutleniające, jak również witaminy, składniki mineralne oraz karotenoidy.

Właściwości fizyczne oraz chemiczne olejów roślinnych tj. profil kwasów tłuszczowych, liczba kwasowa, gęstość, lepkość kinematyczna, a także właściwości smarne wpływają na wybranie danego oleju jako środka smarnego. Badania smarnościowe wykazały, że zarówno oleje roślinne, jak i kompozycje smarne mogą być stosowane jako środki smarne. Polityka proekologiczna nakłania do poszukiwania alternatywnych źródeł surowców do olejów mineralnych. Niewątpliwie oleje roślinne oraz tłuszcze zwierzęce są bardziej proekologiczne, w porównaniu do olejów mineralnych. Oleje te można stosować jako środki smarne, jednak ze względu na ich strukturę chemiczną, w tym znaczny stopień nienasyconienia kwasów tłuszczowych, szybciej ulegają utlenianiu, co niekorzystnie wpływa na ich trwałość oraz właściwości smarne.

Przeprowadzona analiza możliwości wykorzystania olejów roślinnych w medycynie, kosmetologii, technologii żywności, diecie niemowląt, tribologii czy jako paliwa wykazała, że szerokie zastosowanie niniejszych olejów przyczyniło się do powszechnego ich wykorzystania, powodując, że surowiec ten jest istotnym produktem wykorzystywanym w codziennym funkcjonowaniu społeczeństwa rozwijającego się. Biorąc pod uwagę, że oleje roślinne używane są w wielu dziedzinach życia, można stwierdzić, że są one cennymi produktami pozyskiwanym z roślin.

5. Literatura

- Beran E (2008) Wpływ budowy chemicznej bazowych olejów smarowych na ich biodegradowalność i wybrane właściwości eksploatacyjne, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Boelsma E, Hendriks H., Roza L. (2001) Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids, *American Journal of Clinical Nutrition*: 5 (73), 853-864.
- de Souza C, Leite M, Lasekan J, Baggs G, Pinho L, Druzian J, Ribeiro T, Mattos A, Menezes-Filho J (2017) Milk protein-based formulas containing different oils affect fatty acids balance in term infants: A randomized blinded crossover clinical trial. *Lipids in Health and Disease*: 16(78), 1-11.
- Ferenc Z, Pikoń K (2005) Przegląd rodzajów i ilości odpadów tłuszczowych i olejowych w Polsce. *Archiwum Gospodarki Odpadami i Ochrony Środowiska* 2: 69-80.
- Gawęcki J (1997) Prawda o tłuszczach. Instytut Danone - Fundacja Promocji Zdrowego Żywienia, Warszawa.
- Górski K, Przedlacki M, Longwic R (2015) Wpływ eteru dietylowego na właściwości fizykochemiczne oleju rzepakowego. *Badania*: 12, 581-584.
- Hoffmann JF, Henry JF, Vaitilingom G, Olives R, Chirtoc M, Caron D, Py X (2016) Temperature dependence of thermal conductivity of vegetable oils for use in concentrated solar power plants, measured by 3omega hot wire method. *International Journal of Thermal Sciences*: 107, 105-110.
- Kałdoński T, Król A (2010) Badanie procesów starzenia olejów eksploatowanych w łożyskach porowatych. *Wojskowa Akademia Techniczna*: 1(59), 265-296.

- Lawrowski Z (2008) Tribologia. Tarcie, zużywanie i smarowanie. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Myczko A, Golimowska R (2011) Porównanie właściwości estrów metylowych w zależności od pochodzenia surowca. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*: 2(56), 111-117.
- Pettersson A (2007) High-performance base fluids for environmentally adapted lubricants. *Tribology International*: 4(40), 638-645.
- Rogoś E, Urbański A (2014) Wpływ epoksydowanych olejów sojowych na właściwości smarne i fizykochemiczne olejów roślinnych. *Tribologia* 6: 139-150.
- Szczyńska M, Golimowski W (2018) Properties comparison of vegetable oils as lubricants. *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*: 63(2), 121-125.
- Thapa R, Carrero-Colon M, Addo-Quaye C, Held J, Dilkes B, Hudson KA (2018) New Alleles of FAD3A Lower the Linolenic Acid Content of Soybean Seeds. *Crop Science*: 2(58), 713-718.
- Wojdalski J, Klimkiewicz M, Drózd B, Mruk R, Słoma J (2013) Wybrane właściwości mieszanin oleju rzepakowego z benzyną lotniczą. *Inżynieria Rolnicza*: 2(143), 349-358.
- Wroniak M, Kwiatkowska M, Krygier K (2006) Charakterystyka wybranych olejów tłoczonych na zimno. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*: 2(47), 46-58.
- Zhang Q, Flach C, Mendelsohn R, Mao G, Pappas A, Mack MC, Walters R, Southall M (2015) Topically applied ceramide accumulates in skin glymphs. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*: 8, 329-337.

12. Metody genomowe w identyfikacji mikroorganizmów

The genomic methods in the identification of microorganisms

Włodarczyk Karolina

Katedra Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Opiekun naukowy: dr Monika Marek-Kozaczuk; dr hab. Jerzy Wielbo, prof. UMCS

Włodarczyk Karolina: k.włodarczyk06@gmail.com

Słowa kluczowe: hybrydyzacja, reakcja łańcuchowa polimerazy, zawartość par C+G, MLSA

Streszczenie

Środowisko naturalne jest siedliskiem życia dla ogromnej ilości różnorodnych mikroorganizmów. Stopień ich poznania jest uzależniony od wybranych technik badawczych. Odpowiednio dobrana metoda badawcza umożliwia poprawne przeprowadzenie eksperymentu, mającego na celu odzwierciedlenie rzeczywistości. Obecnie, klasyfikacja drobnoustrojów opiera się na taksonomii wielokierunkowej. Wykorzystuje ona dane pochodzące z analiz filogenetycznych i fenotypowych. Różnicowana rozdzielczość metod molekularnych umożliwia sklasyfikowanie badanych izolatów na wielu poziomach taksonomicznych, tj. począwszy od szczepu, gatunku, rodzaju, skończywszy na rodzinie. W niniejszej pracy został przedstawiony przekrój molekularnych metod badawczych w wykorzystywanych w analizach genomowych opartych na DNA.

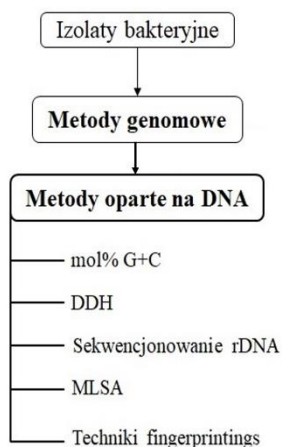
1. Wstęp

Cząsteczki kwasów nukleinowych, tj. kwas deoksyrybonukleinowy (DNA, *ang. deoxyribonucleic acid*) i kwas rybonukleinowy (RNA, *ang. ribonucleic acid*), kodują liczne informacje genetyczne niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów. Metody genomowe stosowane w identyfikacji mikroorganizmów, opierają się na pozyskiwaniu informacji zawartej w cząsteczkach DNA i RNA (Mousavi 2016). Obecnie, techniki te niewątpliwie stanowią dominującą rolę w taksonomii drobnoustrojów. Wynika to z faktu powszechnie panującego przekonania wśród taksonomistów, iż informacje na temat bakterii znajdują się w sekwencji nukleotydowej przechowywanej w genomie, jak również z ogromnego rozwoju technik molekularnych (Goris i in. 2007). Dane uzyskane z metod genomowych stanowią nadrzędne źródło informacji koniecznych do identyfikacji nowych mikroorganizmów. Jednakże, wymagają one uzupełnienia poprzez przeprowadzenie badań fenotypowych, tj. analiz morfologicznych, fizjologicznych, biochemicznych czy chemotaksonomicznych (Łyszcz i Gałązka 2016; Freiwald i Sauer 2009; Rossello-Mora i Amann 2001; Vandamme i in 1996). Do badań genotypowych zalicza się m.in. hybrydyzację kwasów nukleinowych (DNA-DNA; RNA-DNA), określenie procentowej zawartości par G+C, analizę sekwencji konserwatywnego genu 16S rRNA, jak również wielolokusową analizę sekwencji DNA (MLSA, *ang. multilocus sequence analysis*) (Łyszcz i Gałązka 2016; Mousavi 2016) (Rys. 1). Techniki stosowane w analizach genomowych charakteryzują się dużym zróżnicowaniem rozdzielczości, która umożliwia klasyfikacje badanych mikroorganizmów na różnym poziomie taksonomicznym, począwszy od szczepu, przez gatunek, rodzaj, aż do rodziny (Vandamme i in. 1996).

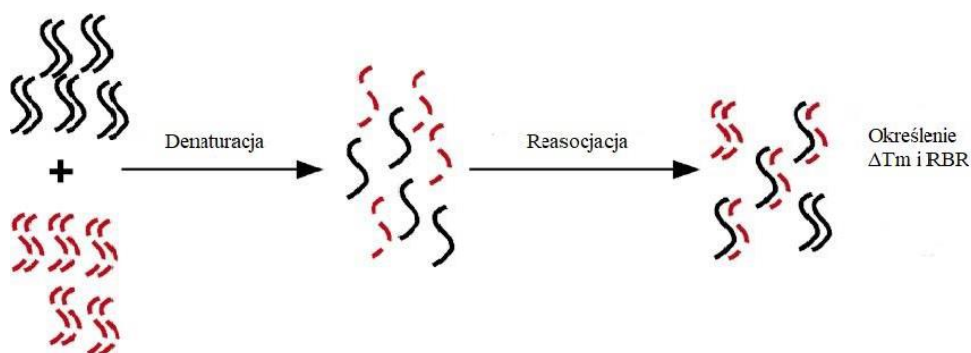
2. Metoda hybrydyzacji kwasów nukleinowych

Proces, podczas którego następuje połączenie dwóch pojedynczych nici kwasów nukleinowych (DNA-DNA, RNA-RNA, jak również RNA-DNA, w zależności od zastosowanego rodzaju techniki), na podstawie komplementarności zasad azotowych nukleotydów, nazywa się hybrydyzacją kwasów nukleinowych (DDH, *ang. DNA-DNA hybridization*) lub techniką ponownego powiązania (DDR, *ang. DNA-DNA reassociation*). Metodę DDH wykorzystuje się w celu ustalenia

pokrewieństwa między gatunkami bakterii, która opiera się na próbie surowego porównania całych genomów badanych izolatów (Goris i in. 2007). Na tej podstawie dokonuje się ogólnego szacunku podobieństwa genetycznego między badanymi genomami (Łyszcz i Gałązka 2016; Mousavi 2016; Prakash i in. 2007; Rossello-Mora 2006). DDH pomimo upływu lat nadal uznawana jest za najważniejsze kryterium określenia gatunków mikroorganizmów (Ramamamy i in. 2014).



Rys. 1. Metody genomowe stosowane w identyfikacji prokariotów (na podstawie Raina i in. 2019).



Rys. 2. Schemat hybrydyzacji kwasów nukleinowych (na podstawie Rossello-Mora i Amann 2001).

Opracowanie techniki DDH w latach sześćdziesiątych ubiegłego wieku możliwe było, dzięki wykorzystaniu fizykochemicznych cech kwasów nukleinowych, u których pod wpływem warunków denaturujących, m.in. wysokiej temperatury, alkalicznego pH, dochodzi do rozerwania wiązań wodorowych występujących pomiędzy ich antyrównoległe biegnącymi niciami. Jednakże, w odpowiednich uwarunkowaniach środowiskowych, tj. w optymalnej temperaturze, reakcja jest odwracalna. Możliwa jest reasocjacja (ponowne połączenie) jednoniciowych fragmentów kwasów nukleinowych na podstawie reguły komplementarności zasad azotowych. W wyniku reasocjacji może powstać stabilna cząsteczka hybrydowa, pod warunkiem, że identyczność sekwencji nukleotydowych jednoniciowych odcinków DNA i RNA jest nie mniejsza niż 80% (Rys. 2) (Łyszcz i Gałązka 2016; Prakash i in. 2007). W doświadczeniach opartych na DDH, jedna z dwóch hybrydyzowanych nici poddawana jest znakowaniu:

a) radioaktywnemu:

- izotopem - do znakowanego kwasu nukleinowego włączany jest nukleotyd wyznakowany izotopem ^{32}P , ^3H , czy ^{35}S . Detekcja odbywa się poprzez autoradiograf, który rejestruje energię emitowaną przez izotopy promieniotwórcze.

b) nieradioaktywnemu:

- związkami fluorescencyjnymi – następuje emisja światła o określonej długości fali, którego detekcja odbywa się przy pomocy urządzeń optycznych, tj. kamery/mikroskopu fluorescencyjnego (fluoresceina, rodamina);
- związkami immunocytochemicznymi – włączenie do wyznakowanego kwasu nukleinowego nukleotydu występującego w sprzężeniu z haptentem (digoskygenina, biotylna), którego detekcja odbywa się za pomocą specyficznych do haptentu przeciwciał;
- przeciwciała występujące w sprzężeniu z enzymami – katalizują reakcję enzymatyczną, w której powstają barwne produkty, umożliwiające ich uwidocznienie (alkaliczna peroksydaza) (Brown 2009).

Wyznakowany fragment DNA/RNA stanowi sondę molekularną, służącą do zidentyfikowania sekwencji komplementarnych w genomie badanego materiału genetycznego. Największą czułością detekcji sekwencji docelowych charakteryzują się sondy wyznakowane związkami radioaktywnymi. Im wyższy stopień podobieństwa, tym większa liczba powstałych cząstek hybrydowych. Porównanie otrzymanych heterodupleksów z homodupleksami, stanowi wyznacznik stopnia podobieństwa między badanymi kwasami nukleinowymi (Łyszcz i Gałązka 2016).

Do oznaczenia stopnia podobieństwa między badanymi drobnoustrojami stosowane są dwa główne parametry:

- względny współczynnik wiązania (RBR, *ang. relative binding ratio*);
- różnica w temperaturze denaturacji homodupleksów i heterodupleksów (ΔT_m , *ang. difference in thermal denaturation midpoint*).

RBR opisuje względny stosunek heterodupleksów do homodupleksów stanowiących wzorzec 100% reasocjacji. Natomiast ΔT_m stanowi wskaźnik stabilności termicznej dla dwuniciowych fragmentów kwasów nukleinowych. Parametr ten uzależniony jest od kilku parametrów: procentowej zawartości par G+C, siły jonowej i temperatury roztworu, w którym przeprowadzana jest hybrydyzacja. Wartość ΔT_m sugeruje taką temperaturę, przy której kwas nukleinowy w 50% uległ zdenaturowaniu (Raina i in. 2019; Łyszcz i Gałązka 2016; Ramasamy i in. 2014; Rossello-Mora 2006).

DDH stanowi podstawową metodę w klasyfikacji mikroorganizmów (szczególnie do rangi gatunku). Za jeden gatunek, pod względem genomowym, uznaje się organizm, który wykazuje następujące standardy:

- wartość współczynnika RBR wynoszącą 70% i więcej;
- różnicę w temperaturze denaturacji (ΔT_m) nie większą niż 5 °C.

Obecnie, stosowanych jest kilka rodzajów metod hybrydyzacji, m.in. hybrydyzacja Southerna, hybrydyzacja northern, hybrydyzacja *in situ* (ISH, *ang. in situ hybridization*), czy fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH, *ang. fluorescent in situ hybridization*) (Łyszcz i Gałązka 2016; Brown 2009; Prakash i in. 2007; Rossello-Mora i Amann 2001).

3. Analiza procentowej zawartości par G+C

Powszechną wiedzą jest to, że na DNA składają się zasady purynowe (adenina (A), guanina (G)) oraz pirymidynowe (cytozyna (C), tymina (T)), a od kolejności ich występowania uzależniona jest informacja genetyczna przechowywana w genomie organizmu. Pierwszą właściwością DNA wykorzystywaną przy identyfikacji mikroorganizmów, była analiza zawartości par G+C (Rys. 3), wyrażana w procentach molowych (mol%). W przypadku bakterii, wartość ta plasuje się w granicach od 25 mol% do 75 mol%, przy czym dla określonego organizmu jest stała. Mikroorganizmy wykazujące bliskie pokrewieństwo oraz należące do tego samego gatunku charakteryzują się podobnym profilem G+C, a maksymalna różnica między nimi może oscylować od 3 mol% do 5 mol%. Natomiast drobnoustroje charakteryzujące się znaczną różnicą w procentowej zawartości par G+C (na poziomie ≥ 10 mol%) zwykle należą do różnych, oddalonych od siebie, gatunków, nie

wykazując przy tym bliskiego pokrewieństwa (Łyszcz i Gałązka 2016; Fakruddin i Mannan 2013; Prakash i in. 2007; Małek i in. 2005).

$$\text{mol}\%G+C = \frac{\text{mol}(G+C)}{\text{mol}(A+T+G+C)} \times 100\%$$

Rys. 3. Wzór zawartości guaniny i cytozyny w analizowanym DNA, wyrażony w procentach molowych. Objasnienia: mol(G+C) – zawartość molowa guaniny i cytozyny; mol(A+T+G+C) – zawartość molowa adeniny, tyminy, guaniny i cytozyny (na podstawie Rossello-Mora i Amann 2001).

Należy mieć na uwadze, że metoda ta niekoniecznie potwierdza pokrewieństwo mikroorganizmów na podstawie mol% G+C, gdyż nie jest brana pod uwagę sekwencja liniowa cząsteczek badanego DNA (Łyszcz i Gałązka 2016). Z drugiej strony jest to analiza niezależna od techniki łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *ang. polymerase chain reaction*) oraz uwzględnia całe wyizolowane DNA. Zaliczana jest do metod ilościowych, dzięki którym możliwe jest wykrycie rzadkich gatunków prokariotycznych. Jednakże, warunkiem koniecznym jest użycie dużych ilości materiału genetycznego (50 µg wyizolowanego DNA). Dlatego też, w dzisiejszych badaniach, analiza mol% G+C nie jest bezwzględnie wymagana w identyfikacji nowych gatunków mikroorganizmów (Łyszcz i Gałązka 2016; Fakruddin i Mannan 2013; Prakash i in. 2007; Małek i in. 2005; Rossello-Mora i Amann 2001).

4. Analiza sekwencji genu 16S rRNA

Taksonomia i identyfikacja mikroorganizmów została zrewolucjonizowana w latach 70. ubiegłego wieku przez Carla Woese'a. Wykorzystanie przez niego analizy porównawczej sekwencji nukleotydowych genów kodujących rybosomalne RNA (rRNA, *ang. ribosomal RNA*), 16S rRNA w analizach filogenetycznych wywarło duży wpływ na systematykę bakterii (Mousavi 2016; Rossello-Mora i Amann 2001). Umożliwiło to przełom w badaniach nad określeniem relacji między mikroorganizmami, które nie wykazują bliskiego pokrewieństwa (Mousavi 2016; Małek i in. 2005). Odzwierciedlenie rzeczywistych powiązań między mikroorganizmami za pomocą 16S rRNA jest możliwe, ponieważ:

- występuje we wszystkich organizmach
- posiada domeny wysoce konserwowane i zmienne, które są mało podatne na poziomy transfer genów (HGT, *ang. horizontal gene transfer*)
- wykazuje stabilność funkcjonalną (jest jedną ze składowych rybosomu, którego nadrzędną funkcją jest synteza białek)
- charakteryzuje się odpowiednią wielkością, umożliwiającą przeprowadzenie analiz (Raina i in. 2019; Łyszcz i Gałązka 2016; Ramasamy 2014; Prakash i in. 2007).

Organizmy prokariotyczne posiadają trzy rodzaje rRNA, tj. 5S rRNA, 16S rRNA i 23S rRNA, które sklasyfikowano przy zastosowaniu współczynnika sedymentacji podczas ultrawierowania (S, *ang. the sedimentation coefficient*). Pomimo początkowego wykorzystywania cząsteczki 5S rRNA w analizach filogenetycznych, poprzestano jego użycia ze względu na fakt zbyt niskiej zawartości przenoszonej informacji genetycznej (120 nukleotydów). Również fakt kodowania zbyt dużej ilości informacji przez cząsteczkę 23S rRNA (3300 nt), zdyskredytował ją jako molekułę mającą zastosowanie w badaniach filogenetycznych. Spośród tych trzech cząsteczek, sekwencjonowanie genu 16S rDNA (1650 nt) stało się standardem wśród badaczy, a rosnąca ilość zsekwencjonowanych sekwencji 16S rDNA w bazach danych, tj. Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) i GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), przyczyniła się do powszechnego używania tego markera molekularnego w badaniach pokrewieństwa drobnoustrojów (Raina i in. 2019; Łyszcz i Gałązka 2016; Rossello-Mora i Amann 2001). Jednakże, należy mieć na uwadze istniejące ograniczenia wynikające z metody, tj.:

- wszystkie dostępne sekwencje nie mają dobrej jakości;

- poziom podobieństwa dla genu 16S rRNA nie może być stosowany jako standardowa wytyczna dla gatunku, ponieważ w przypadku *Bradyrhizobium* i *Mykoplazm*, geny 16S rRNA wykazują niewielką zmienność;
- genom mikroorganizmu może posiadać od 1 do 8 kopii genów 16S rRNA, które sporadycznie mogą ulec HGT, w konsekwencji prowadząc do nieprawidłowości w odzwierciedleniu filogenezy bakterii;
- zbyt niski poziom polimorfizmu 16S rRNA nie pozwala na rozdzielenie blisko spokrewnionych gatunków w obrębie rodzaju (Raina i in. 2019; Mousavi 2016; Małek i in. 2005).

W wyniku analizy sekwencji genu kodującego 16S rDNA otrzymuje się numeryczną wartość podobieństwa 16S rRNA, którą można wykorzystać jako limity ograniczające dla poszczególnych taksonów (Rossello-Mora i Amann 2001). Doświadczalnie wykazano, że jeśli badane dwa mikroorganizmy wykazują 95% stopień podobieństwa sekwencji 16S rDNA, zaliczane są do tego samego rodzaju. Zaobserwowano, że organizmy z podobieństwem genomowym powyżej 70%, zwykle charakteryzują się identycznością sekwencji 16S rDNA na poziomie $\geq 97\%$. Wartość ta wykorzystywana jest jako wartość absolutna do klasyfikacji badanych izolatów bakteryjnych na poziomie gatunku. W 2006 roku Stackebrandt i Ebers wykazali, że poprzednia wartość podobieństwa sekwencji jest zbyt niska i zaproponowali podniesienie zakresu progu podobieństwa sekwencji 16S rDNA do 98,7-99%, jako punktu, który koresponduje z DDH na poziomie 70% (Łyszcz i Gałązka 2016; Ramasamy i in. 2014; Prakash i in. 2007; Stackebrandt i Eberg 2006; Małek i in. 2005; Rossello-Mora i Amann 2001).

5. MLST – wielolokusowa analiza sekwencji genów

Wielolokusowa analiza sekwencji genów (MLST, *ang. multilocus sequence typing*) polega na analizie od pięciu do siedmiu sekwencji genów metabolizmu podstawowego (*ang. housekeeping genes*) oraz wewnętrznych fragmentów genów określanych allelami i stosuje się ją w celu ustalenia tożsamości gatunków drobnoustrojów (Raina i in. 2019; Łyszcz i Gałązka 2016; Glaeser i Kampfer 2015). Metoda ta cechuje się wysoką powtarzalnością, gdyż bierze pod uwagę mutacje punktowe występujące w genach metabolizmu podstawowego, które ewoluują szybciej niż gen rRNA. Zsekwencjonowane fragmenty genów porównuje się z genami ortologicznymi, wcześniej zidentyfikowanymi allelami w tym samym *locus*, dla tego samego rodzaju. Każda nowa zmienność sekwencji nukleotydowej alleli, oparta na pojedynczej wymianie nukleotydów, prowadzi do przypisania nowego, unikalnego allelu dla określonego genu. Powstała liczba alleli, uzyskanych dla różnych genów tworzy unikalny profil alleliczny, a kolejno typ sekwencyjny (ST, *ang. sequence type*). Technika ta jest szeroko stosowana do identyfikacji i katalogowania m.in. patogennych szczepów *Neisseria*, *Bacillus* sp. MLST pozwoliło na utworzenie dwóch międzynarodowych baz danych, w Oxford University (<http://www.pubmlst.org/>) oraz w Imperial College London (<http://www3.imperial.ac.uk/portal/page/portal/live/B13CE9C018131910E040C69B47395E1C>) (Raina i in. 2019; Łyszcz i Gałązka 2016; Glaeser i Kampfer 2015).

6. MLSA – wielolokusowa analiza sekwencji

Geny konserwatywne stanowią specyficzne markery genotypowe, które wzbogacają mikroorganizmy w specyficzny genetyczny odcisk palca (*ang. genetic fingerprinting*). Wielolokusowa analiza sekwencji tych genów (MLSA, *ang. multilocus sequence analysis*) wraz z analizą genu 16S rRNA, stanowi szybką metodę ustalania pozycji filogenetycznej i pokrewieństwa badanych drobnoustrojów. Przykładami genów wykorzystywanych do identyfikacji drobnoustrojów w MLSA są, m.in. gen kodujący 16S rRNA, geny kodujące podjednostki bakteryjnej polimerazy RNA (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC*, *rpoD*), geny kodujące podjednostki metabolicznego enzymu topoizomerazy - gyrazy (*gyrA*, *gyrB*), geny kodujące podjednostki rekombinazy (*recA*, *recB*) (Raina 2019; Glaeser i Kampfer 2015).

MLSA charakteryzuje się wysoką rozdzielczością, powtarzalnością otrzymywanych wyników oraz pracochłonnością wykonania. Dzięki tej technice możliwe jest przypisanie

analizowanego mikroorganizmu zarówno do określonego rodzaju, jak również gatunku (Mousavi 2016; Glaeser i Kampfer 2015).

7. Fingerprintings

Polimorfizmy sekwencji występujące w bakteryjnych genomach, mogą posłużyć do identyfikacji badanych izolatów. Techniki te obejmują m.in. polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, elektroforezę pulsacyjną, rybotypowanie. Istnieją także metody fingerprintings oparte na technice PCR, tj. powtarzalne sekwencje BOX – BOX-PCR, zidentyfikowane w chromosomie *Streptococcus pneumoniae* - BOX-PCR, międzygenowe konsensusowe sekwencje powtórzone enterobakterii ERIC (*ang. enterobacterial repetitive intragenic consensus*) - ERIC-PCR, pozagenowe powtórzone elementy palindromowe REP (*ang. repetitive extragenic palindromic*) – REP-PCR (Raina i in. 2019; Łyszcz i Gałązka 2017).

8. Podsumowanie

Niniejsza praca przedstawia jedynie część z ogromnej puli metod genomowych, powszechnie wykorzystywanych w badaniach naukowych. Za rozpowszechnieniem tych technik genomowych przemawiają ich liczne zalety w odniesieniu do klasycznych metod fenotypowych. Są to m.in. ich powszechna dostępność, wygoda w ich przeprowadzeniu, większa dokładność otrzymywanych wyników oraz mniejsza pracochłonność, niższe koszty ich stosowania, jak także niezależność od warunków hodowli. Wykorzystywanie tych metod w znaczący sposób ułatwiło klasyfikowanie nowo wyizolowanych drobnoustrojów. Dzięki DDH oraz mol% G+C możliwe jest sklasyfikowanie szczepów w obrębie gatunku. Analiza sekwencji konserwatywnego genu 16S rRNA, umożliwiła przyporządkowanie danego mikroorganizmu do konkretnego gatunku, a także rodzaju. Natomiast sekwencjonowanie DNA pozwala na zaklasyfikowanie badanych szczepów na poziomie gatunku, rodzaju i rodziny. Szeroki wachlarz właściwości metod genomowych, stał się zachętą do ich powszechnego stosowania w badaniach taksonomicznych oraz dążenia do ich doskonalenia.

9. Literatura

- Brown TA (2009) Genomy. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Fakruddin MD, Mannan KSB (2013) Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. Ceylon Journal of Science 42(1): 19-33.
- Glaeser SP, Kampfer P (2015) Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. Systematic and Applied Microbiology 38(4): 237-245.
- Freiwald A, Sauer S (2009) Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. Nature Protocols 4(5): 732-742.
- Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA i in. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 81-91.
- Łyszcz M, Gałązka A (2016) Wybrane metody molekularne wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. Postępy Mikrobiologii 55(3): 309-319.
- Łyszcz M, Gałązka A (2017) Metody oparte o amplifikację DNA techniką PCR wykorzystane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. KOSMOS 66(2): 193-206.
- bacterial systematics. Microbiological Reviews 60: 407-438.
- Małek W, Wdowiak-Wróbel S, Kalita M i in. (2005) W poszukiwaniu koncepcji gatunku bakteryjnego. Postępy Mikrobiologii 44(4): 323-328.
- Mousavi SA (2016) Revised taxonomy of the family Rhizobiaceae, and phylogeny of mesorhizobia nodulating *Glycyrrhiza* spp. Dissertationes Schola Doctoralis Scientiae Circumiectalis, Alimentaryriae, Biologicae, 11-21.
- Prakash O, Verma M, Sharma P i in. (2007) Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. Indian Journal of Microbiology 47: 98-108.

- Raina V, Nayak T, Ray L i in. (2019) A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species: 137-152. *Microbial Diversity in the Genomic Era*. Academic Press. An imprint of Elsevier.
- Ramasamy D, Mishra AK, Lagier JC i in. (2014) A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 384-391.
- Rossello-Mora R, Amann R (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 39-67.
- Rossello-Mora R (2006) DNA-DNA Reassociation Methods Applied to Microbial Taxonomy and Their Critical Evaluation. *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*: 23-50. Springer, Berlin.
- Thompson CC, Chimetto L, Edwards RA i in. (2013) Microbial genomic taxonomy. *BioMed Central Genomics* 14(913): 1-8.
- Stackebrandt E, Ebers J (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33(4): 152-155.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M i in. (1996) Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews* 60(2): 407-438.

13. Motyle dzienne (Lepidoptera: Papilionoidea i Hesperioidea) rezerwatu „Las Wagramski” i okolic

Butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea i Hesperioidea) of the Las Wagramski reserve and surroundings

Artur Baranowski

Wydział Biologii i Nauk o Środowisku, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie

Artur Baranowski: a.baranowski@uksw.edu.pl

Słowa kluczowe: fauna motyli, Wschodnia Polska, bioróżnorodność

Streszczenie

Badania faunistyczne motyli dziennych prowadzono w latach 1999-2001 oraz w 2004-2005 roku na terenie rezerwatu Las Wagramski i jego otulinie oraz na terenie nieczynnego już toru kolejowego. W sumie zaobserwowano 60 gatunków motyli dziennych, które stanowią 37 % fauny tej grupy wykazanych gatunków w Polsce, a 51% gatunków wykazanych na terenie województwa Lubelskiego. Na terenie samego rezerwatu zaobserwowano tylko 35 gatunków, natomiast wszystkie wykazane 60 gatunków notowano na terenach otwartych, głównie na torze kolejowym. Najciekawszymi zaobserwowanymi gatunkami ze względu na ich lokalne występowanie w regionie: *Leptidea reali* (Reisgr.), *Lycaena dispar* (Haw.), *Lycaena alciphron* (Rott.), *Satyrrium w-album* (Knoch), *Cupido argiades* (Pall.) *Polyommatus daphnis* (Den. & Schiff.).

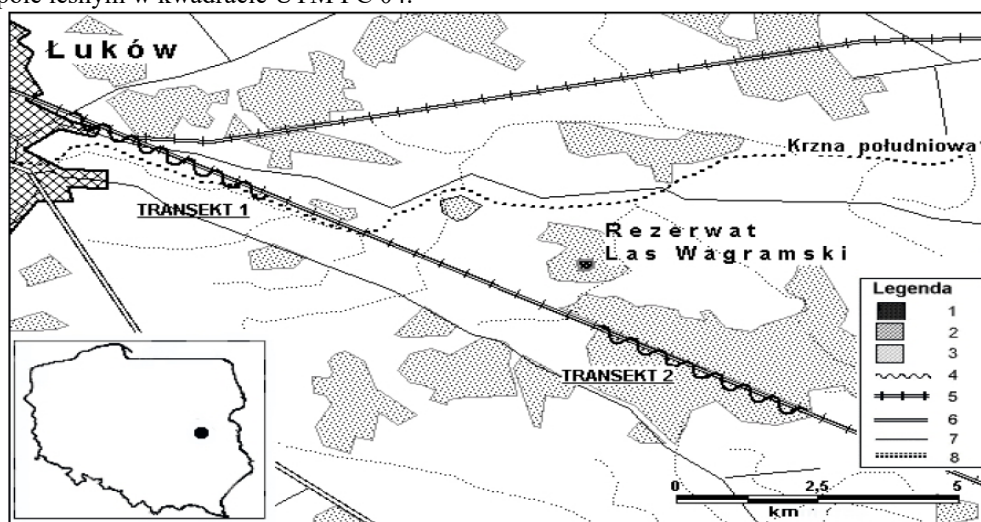
1. Wstęp

Badania motyli dziennych na terenie północnej Lubelszczyzny nie mają swojej tradycji jak również w tym zakresie dostatecznej dokumentacji, co też stało się powodem do podjęcia tego typu badań. Wyjątkiem stanowią badania autora (Baranowski 2006, 2019). Celem ich jest stwierdzenie występowania gatunków *Rhopalocera* w cennym przyrodniczo rezerwacie Las Wagramski oraz jego okolicach, znajdujących się na terenie Radzyńskiego Obszaru Chronionego Krajobrazu. Ponieważ motyle dzienne są dobrym wskaźnikiem bioróżnorodności, przeprowadzona inwentaryzacja posłuży do oceny przyrodniczej obiektu oraz okolic na tle kraju oraz regionu, a w przyszłości także do szacowania zmian w faunie motyli tego obszaru. Podobne badania w regionie zostały przeprowadzone w ostatnich latach w rezerwacie Jata (Baranowski 2000). Ponadto wiele danych fragmentarycznych zostało zebranych i opublikowanych w ramach programu Atlasu rozmieszczenia motyli dziennych w Polsce (Buszko 1997). Inne dane historyczne można odnaleźć także w opracowaniu zbiorczym (Romaniszyn 1929).

2. Materiał i Metody

Rezerwat florystyczny Las Wagramski został ustanowiony 15 grudnia 1980 roku, w celu ochrony wawrzynka główkowatego (*Daphne cneorum*) na powierzchni 5,37 ha. Znajduje się on w dużym zespole leśnym Leśnictwa Kownatki w gminie Łuków w kwadracie UTM FC 05, co pokazano na Rys. nr 1. Dominującym typem lasu jest bór mieszany wysoki (*Pino-Quercetum serratuletosum*) z dużym udziałem gatunków ciepłolubnych w runie. Poza tym występuje tu również bór mieszany typowy (*Pino-Quercetum typicum*) i subkontynentalny bór świeży (*Peucedano-Pinetum*) (Ciosek 1986). W sąsiedztwie rezerwatu w większym kompleksie leśnym znajdują się liczne płaty grądu (*Tilio-Carpinetum*) oraz przylegające do niego środowiska ekotonowe łąk i upraw rolnych z klas *Secalinetea*, *Chenopodietea*, *Artemisietea*. Poza rezerwatem gdzie również prowadzono waloryzację na dwóch 3,5 km transektach, znajdują się liczne środowiska kserotermiczne na nieczynnym już nasypie kolejowym oraz niewielkie fragmenty łąk z kalsy *Molinio* – *Arrhenatheretea* oraz turzycowisk z welnianką wąskolistną z klasy *Phragmitetea*. Pierwszy transekt

znajduje się w pobliżu Łukowa w kwadracie UTM EC 95, drugi transekt na torowisku w zwartym zespole leśnym w kwadracie UTM FC 04.



Rys.1. Mapa terenu badań (1 – rezerwat, 2 – miasto, 3 – lasy, 4 – transekty, 5 – kolej, 6 – drogi główne, 7 – drogi drugorzędne, 8 – rzeki).

Waloryzacja fauny motyli dziennych (Rhopalocera) rezerwatu Las Wągramski opiera się głównie na materiale zebranym w latach 1999-2001 oraz w sezonie 2004-2005. Obserwacje i odłowcy prowadzone były od początku maja do końca sierpnia z częstotliwością 1-2 wizyt na dekadę. Osobniki trudne do oznaczenia w terenie zostały nabijane na szpilki i etykietowane, stając się jednocześnie dokumentacją badań. Odłowcy prowadzono na trzech stanowiskach, co pokazano na Ryc.1, a wyniki zamieszczono w Tab.1. Pierwszym stanowiskiem był rezerwat Las Wągramski wraz z przylegającą do niego otuliną innych środowisk leśnych, łąkowych oraz rolnych. Drugim stanowiskiem był 3,5 km transekt wzdłuż toru kolejowego w otoczeniu przede wszystkim środowisk otwartych. Trzecim stanowiskiem był również 3,5 km transekt znajdujący się w pobliżu rezerwatu Las Wągramski w otoczeniu zwartego zespołu leśnego.

3. Wyniki i dyskusja

Niżej przedstawiona Tab.1 zawiera wyniki badań z trzech stanowisk: rezerwatu Las Wągramski oraz dwóch transektów znajdujących się na nasypie kolejowym. Nazewnictwo oraz układ systematyczny taksonów na szczeblu rodzin i rodzajów, przyjęto według wykazu motyli Polski (Buszko, Nowacki 2000).

Dla każdego gatunku wykazanego z badanego obszaru liczbami rzymskimi oznaczono liczebność w przyjętej umownie czterostopniowej skali: (I) 1-5 osobników pojedynczy, (II) 6-10 nieliczny, (III) 11-20 liczny, (IV) ponad 21 bardzo liczny. Gatunek nie wykazany ze stanowiska zaznaczono minusem.

Niżej omówiono kilka gatunków, których charakter występowania w regionie jest lokalny. *Pyrgus malvae* (L.) – W Polsce znany z niemal całego obszaru. W regionie spotykany sporadycznie i zawsze pojedynczo. W trakcie badań wykazany z jednego stanowiska w środowisku ekotonowym lasu i toru kolejowego na drugim transekcie.

Leptidea reali (Reisgr.) – Gatunek znany obecnie z kilku województw w południowej i wschodniej części kraju. Gatunek bardzo podobny do *Leptidea sinapis* (L.), stąd też jego rozmieszczenie w kraju nie jest dokładnie poznane. Należy się spodziewać szerszego rozmieszczenia tego gatunku w kraju, choć w Europie zachodniej gatunek ten wymarł w wielu regionach (SKALSKI 1995). W okolicy oraz na badanych stanowiskach oba gatunki *Leptidea* występują na terenach

otwartych, choć często w pobliżu zadrzewień. W regionie *Leptidea sinapis* (L.) znany z rezerwatu Jata EC 85; *Leptidea reali* (Reisgr.) znany również z rez. Jata, ponadto z Gózd EC 85.

Tab. 1. Wykaz gatunków na trzech stanowiskach.

Gatunek	Stanowisko I Rezerwat L. Wagramski	Stanowisko II Tor kolejowy transekt 1	Stanowisko III Tor kolejowy transekt 2
HESPERIOIDEA/HESPERIIDAE			
1. <i>Erynnis tages</i> (L.)	I	I	II
2. <i>Pyrgus malvae</i> (L.)	-	-	I
3. <i>Thymelicus lineola</i> (Ochs.)	I	III	IV
4. <i>Thymelicus sylvestris</i> (Poda)	I	III	II
5. <i>Ochlodes faunus</i> (Turati)	-	I	II
PAPILIONOIDEA/PAPILIONIDAE			
1. <i>Papilio machaon</i> (L.)	-	I	I
PIERIDAE			
1. <i>Leptidea sinapis</i> (L.)	-	I	I
2. <i>Leptidea reali</i> (Reisgr.)	I	I	I
3. <i>Anthocharis cardamines</i> (L.)	II	II	III
4. <i>Pieris brassicae</i> (L.)	I	III	II
5. <i>Pieris rapae</i> (L.)	I	II	II
6. <i>Pieris napi</i> (L.)	II	IV	IV
7. <i>Pontia daplidice</i> (L.)	-	I	I
8. <i>Colias hyale</i> (L.)	-	I	III
9. <i>Gonepteryx rhamni</i> (L.)	III	II	IV
LYCAENIDAE			
1. <i>Lycaena phlaeas</i> (L.)	I	II	IV
2. <i>Lycaena dispar</i> (Haw.)	-	I	-
3. <i>Lycaena virgaureae</i> (L.)	-	I	I
4. <i>Lycaena tityrus</i> (Poda)	I	IV	III

Gatunek	Stanowisko I Rezerwat L. Wagramski	Stanowisko II Tor kolejowy transekt 1	Stanowisko III Tor kolejowy transekt 2
5. <i>Lycaena alciphron</i> (Rott.)	-	I	I
6. <i>Callophrys rubi</i> (L.)	III	II	II
7. <i>Thecla betulae</i> (L.)	-	I	-
8. <i>Satyrrium w-album</i> (Knoch)	I	-	I
9. <i>Satyrrium ilicis</i> (Esp.)	II	-	IV
10. <i>Cupido argiades</i> (Pall.)	I	IV	II
11. <i>Celastrina argiolus</i> (L.)	II	II	II
12. <i>Plebeius argus</i> (L.)	-	I	-
13. <i>Plebeius idas</i> (L.)	-	I	I
14. <i>Polyommatus amandus</i> (Schn.)	-	II	I
15. <i>Polyommatus icarus</i> (Rott.)	III	IV	IV
16. <i>Polyommatus daphnis</i> (Den. & Schiff.)	-	IV	I
17. <i>Polyommatus coridon</i> Poda	-	IV	I
NYMPHALIDAE			
1. <i>Argynnis paphia</i> (L.)	II	II	II
2. <i>Argynnis aglaja</i> (L.)	-	I	I
3. <i>Argynnis adippe</i> (Den. & Schiff.)	-	I	I
4. <i>Issoria lathonia</i> (L.)	II	IV	IV
5. <i>Brenthis ino</i> (Rott.)	I	II	I
6. <i>Boloria euphrosyne</i> (L.)	-	I	I
7. <i>Boloria selene</i> (Den. & Schiff.)	I	I	II
8. <i>Boloria dia</i> (L.)	I	II	III
9. <i>Vanessa atalanta</i> (L.)	I	I	II
10. <i>Vanessa cardui</i> (L.)	-	I	I
11. <i>Inachis io</i> (L.)	II	II	III

Gatunek	Stanowisko I Rezerwat L. Wagramski	Stanowisko II Tor kolejowy transekt 1	Stanowisko III Tor kolejowy transekt 2
12. <i>Aglais urticae</i> (L.)	I	II	II
13. <i>Polygonia c-album</i> (L.)	II	I	II
14. <i>Araschnia levana</i> (L.)	I	IV	III
15. <i>Nymphalis polychloros</i> (L.)	-	I	I
16. <i>Nymphalis antiopa</i> (L.)	II	I	I
17. <i>Melitaea cinxia</i> (L.)	-	I	II
18. <i>Melitaea athalia</i> (Rott)	-	I	II
19. <i>Limenitis populi</i> (L.)	I	-	I
20. <i>Apatura iris</i> (L.)	I	-	I
21. <i>Apatura ilia</i> (Den. & Schiff.)	-	I	I
22. <i>Pararge aegeria</i> (L.)	III	I	II
23. <i>Lasiommata megera</i> (L.)	-	I	I
24. <i>Coenonympha arcania</i> (L.)	I	III	II
25. <i>Coenonympha glycerion</i> (Borkh.)	-	III	I
26. <i>Coenonympha pamphilus</i> (L.)	II	IV	IV
27. <i>Aphantopus hyperantus</i> (L.)	III	IV	IV
28. <i>Maniola jurtina</i> (L.)	II	IV	IV

Lycaena dispar (Haw.) – Gatunek w Polsce występuje głównie we wschodniej i w północnej części kraju. Znajduje się w Polskiej Czerwonej Księdze Zwierząt w randze niskiego zagrożenia ekstynkcji (Buszko 2004). W regionie znany z nielicznych stanowisk (rez. Jata oraz Tuchowicz EC 84), gdzie spotykany jest zawsze pojedynczo.

Lycaena alciphron (Rott.) – W Polsce występuje lokalnie na terenie całego kraju. Na terenie badań spotykany na wilgotnych łąkach przylegających do rezerwatu oraz toru kolejowego. W regionie znany ponadto z rezerwatu Jata.

Satyrium w-album (Knoch) – W Polsce znany z rozproszonych stanowisk na niżu i pogórzu, wszędzie spotykany pojedynczo. Związany z lasami liściastymi i występujący w ich pobliżu. W regionie występuje ponadto w rezerwacie Jata, poza tym nie spotykany.

Cupido argiades (Pall.) – W latach siedemdziesiątych występował na terenie całego kraju. W ostatnich dziesięcioleciach wymarł zupełnie na większości stanowisk w dzielnicach zachodnich kraju. W Europie gatunek posiada status umiarkowanie zagrożonego wyginięciem. Przez Europejską Czerwoną Księgę motyli dziennych gatunek uznany za umiarkowanie zagrożony wyginięciem (Swaay, Warren, 1999). Obecnie gatunek wykazany ze wschodniej i południowej Polski. W miejscach występowania zwykle nieliczny. W granicach rezerwatu, toru kolejowego oraz

w regionie występuje dość licznie na terenach otwartych w pobliżu lasów; na śródleśnych polanach, łąkach i leśnych drogach. Na terenie rezerwatu sporadyczny, częściej spotykany na torze kolejowym. Poza tym w regionie występuje na wszystkich badanych stanowiskach. Populacja tego gatunku w regionie posiada tendencję wzrostową i jest licznie reprezentowana.

Polyommatus coridon (Poda) – W Polsce spotykany na obszarze całego kraju, lokalnie na północy i południu. Gatunek termofilny. W rezerwacie obserwowano zalatujące osobniki z toru kolejowego gdzie występuje, a w niektóre lata jest nawet bardzo liczny. Znany tylko z kilku stanowisk w regionie.

Polyommatus daphnis (Den. & Sschiff.) – Występuje w południowo-wschodniej Polsce. W regionie znany ze stanowisk w okolicach Łukowa i Siedlec. Na badanym terenie występuje tylko w środowiskach toru kolejowego, gdzie jest liczny. Do roku 2000 był liczny również na obszarze lokomotywni w Łukowie, jednak po zastosowaniu herbicydów populacja tego gatunku wyginęła na tym terenie. Obecnie populacje lęgowe gatunku występują tylko na obszarze transektu 1.

Boloria euphrosyne (L.) – W Polsce występuje lokalnie na rozproszonych stanowiskach, częściej spotykany we wschodniej części kraju. Preferuje otwarte tereny w pobliżu lasów. W regionie nierzadki choć nieliczny.

Melitaea cinxia (L.) – W Polsce znany z rozproszonych stanowisk zarówno na nizinie jak i pogórzu. Występuje zarówno na terenach podmokłych jak i suchych. W regionie znany z kilku stanowisk. Obserwowany nielicznie na nasypie kolejowym każdego lata.

W sumie na terenie rezerwatu Las Wagramski oraz dwóch transektach znajdujących się na torze kolejowym odłowiono 60 gatunków motyli dziennych, co stanowi 51 % z 117 gatunków znanych z województwa Lubelskiego. Na tle 163 gatunków motyli dziennych wykazanych z Polski (BUSZKO, NOWACKI 2000) procentowy udział gatunków z badanego terenu wynosi 37. Podczas prowadzonych obserwacji w pięciu sezonach wegetacyjnych nie zaobserwowano zmian w strukturze gatunkowej populacji *Rhopalocera*. Odnotowywane zmiany dotyczyły jedynie liczebności pojawiających się gatunków oraz gatunków zalatujących z innych środowisk tj. gatunków przypadkowych (=akcesorycznych). Należy stwierdzić, iż liczba 60 gatunków jest wysoką zarówno na tle kraju jak i województwa i świadczy o istniejącej dużej bioróżnorodności badanego terenu. Motyleienne można bowiem traktować jako bioindykatory środowiska. Duża liczba motyli dziennych badanych środowisk jest wynikiem:

- znacznego zróżnicowania florystycznego siedlisk – duża liczba gatunków roślin zielnych, krzewów i drzew,
- zróżnicowania strukturalnego terenu zapewniającego odpowiednie warunki wilgotnościowe – las liściasty, bór, środowisko kserotermiczne na torze kolejowym, przylegające wilgotne łąki, turzycowiska,
- różnych warunków świetlnych oraz termicznych, uniemożliwiających powstawanie enklaw dla gatunków stenotopowych,
- obecności antropogenicznego kserotermicznego środowiska toru kolejowego będącego zarówno doskonałą drogą do migracji gatunków ciepłolubnych jak i tymczasowego bądź stałego ich bytowania,
- małej ingerencji człowieka w okoliczne środowisko znajdujące się w strefie Obszaru Chronionego Krajobrazu, ograniczającej się zabiegów służb leśnych oraz ekstensywnej gospodarki rolnej.

Na stanowisku 1 tj. na terenie rezerwatu i w jego otulinie, odnotowano tylko 35 gatunków, co stanowi 58 % gatunków wykazanych z badanego terenu. Ponadto znaczna ich część to gatunki zalatujące ze środowisk lęgowych terenów otwartych występujących w pobliżu rezerwatu. Podobną liczbę, mianowicie 28 gatunków odnotowano w rezerwacie leśnym Las Piwnicki (Buszko 1991). Mniejsza liczba motyli dziennych w środowiskach leśnych jest naturalną konsekwencją preferencji grupy motyli dziennych w kierunku terenów dobrze naświetlonych, ciepłych, a więc środowisk otwartych. Do gatunków charakterystycznych dla rezerwatu Las Wagramski zaliczono gatunki rozwijające się jako stadia preimaginalne na roślinności występującej w rezerwacie i jego otulinie, a należą do nich m.in.: *Gonepteryx rhamni* (L.), *Callophrys rubi* (L.), *Celastrina argiolus* (L.), *Satyrion w-album* (Knoch), *Satyrion ilicis* (Esp.), *Polyommatus icarus* (Rott.), *Polygonia c-album*

(L.), *Aglais urticae* (L.), *Nymphalis antiopa* (L.), *Argynnis paphia* (L.), *Inachis io* (L.), *Limenitis populi* (L.), *Apatura iris* (L.), *Apatura ilia* (Den. & Schiff.), *Pararge aegeria* (L.). Pozostałe gatunki nie znajdujące w rezerwacie roślin pokarmowych dla rozwoju gąsienic pojawiają się na terenie rezerwatu w trakcie: dyspersji z terenów przyległych, poszukiwania pokarmu, partnerów do rozrodu lub roślin pokarmowych do złożenia jaj.

Na stanowisku 2 zaobserwowano 55 gatunków motyli dziennych. Na uwagę zasługują gatunki rzadkie w skali lokalnej: *Polyommatus daphnis* (Den. & Schiff.) i *Polyommatus coridon* Poda, które na tym terenie są lęgowe i licznie reprezentowane. Otoczenie podmokłych łąk sprzyja obecności również gatunków higrofilnych *Lycaena dispar* (Haw.) i *Lycaena alciphron* (ROTT.). Spotkać też tu można *Thecla betulae* (L.) oraz *Plebeius argus* (L.), który nie był notowany dotychczas w regionie.

Na stanowisku 3 - torze kolejowym zaobserwowano 57 gatunków. Wysoka liczba zaobserwowanych gatunków jest wynikiem obecności dwóch środowisk toru kolejowego z kserotermiczną roślinnością w otoczeniu różnych typów lasu. W większości są to gatunki znajdujące na badanym obszarze dobre warunki do rozrodu. Inne gatunki zalatujące również często odwiedzają te środowiska. Na uwagę zasługuje obecność *Satyrium w-album* (KNOCH), *Pyrgus malvae* (L.) oraz bardzo liczny *Satyrium ilicis* (ESP.) obserwowany w liczbie ponad 200 osobników w roku 2001 i 2005.

4. Wnioski

Choć fauna motyli dziennych tego terenu nie jest tak bogata jak innych badanych znacznie większych obszarów: Puszcza Białowieska (Buszko i in. 1996); Biebrzański PN (Frąckiel 1999); Równina Opolska (Blaik 1999), Puszcza Romincka (Sielezniew, Sachanowcz 2003), to zasługuje na uwagę, gdyż obok rezerwatu Jata jest to drugi z najcenniejszych pod względem różnorodności gatunkowej obiektów przyrodniczych w regionie.

Ze względu na mały obszar badań, a także łatwy do obserwacji obiekt badań – motyle dzienne oraz częste obserwacje, wykazaną liczbę 60 gatunków należy uznać za pełną. W szczególności dotyczy to gatunków lęgowych badanych środowisk. Ewentualne obserwacje nowych gatunków mogą dotyczyć gatunków akcesorycznych. Obserwacje nowych gatunków należy uznać jako za gatunki akcesoryczne. Obserwacja nowych zasiedleń badanego terenu przez gatunki motyli dziennych wcześniej nie wykazywanych z danego terenu oraz ich późniejsza obserwacja w kolejnych latach będzie traktowana jako skuteczne zasiedlenie. Natomiast brak występowania wykazanych gatunków jako ich ekstynkcję. Biorąc pod uwagę fakt, iż motyle dzienne można traktować jako swoiste bioindykatory, należy sądzić, iż w granicach rezerwatu oraz w jego okolicach znajduje się najwyższa regionalna bioróżnorodność. Stąd dalsze badania innych grup organizmów tego terenu są jak najbardziej celowe.

Badania te mogą służyć w przyszłości jako punkt odniesienia do badania zmian zachodzących w środowisku i przyczynią się do lepszego poznania mechanizmów i przyczyn wymierania bądź zasiedlania, a także wskażą gatunki podatne na te procesy. Tak więc fauna motyli może być wskaźnikiem przekształceń środowiska i być wykorzystana nie tylko w stosunku do motyli dziennych ale i innych grup organizmów (Machnikowski 1999).

Bardzo ważną funkcję jako ostoja bioróżnorodności spełnia również strefa ochronna wokół rezerwatu będąca w istocie środowiskiem ekotonowym. Taką rolę pełnią również inne środowiska otwarte w tym nasyp kolejowy. Pełni on dodatkowo istotną rolę jako kanał migracji gatunków ciepłolubnych w regionie oraz w środowiskach leśnych, które to zasilają populacje motyli występujące na leśnych drogach i polanach. Mozaikowość środowiska jak wynika z wielu badań jest głównym czynnikiem utrzymania dużej lokalnej bioróżnorodności i fakt ten powinien być brany pod uwagę przy tworzeniu kolejnych form ochrony przyrody w regionie.

5. Literatura

Baranowski A (2000) Ciekawsze motyle rezerwatu „Jata”. [W:] Materiały IV Przeglądu Działalności Kół Naukowych Przyrodników, Z. Sobisz (red.). Słupsk, 113-117.

- Baranowski A (2006) Motyle (Lepidoptera) rezerwatu „Jata”. Część 1. Motyle dzienne (Lepidoptera: Papilionoidea i Hesperioidea). Parki Narodowe i Rezerwaty Przyrody 25 (3): 27-37.
- Baranowski A (2019) Skład gatunkowy motyli większych (Lepidoptera, Macrolepidoptera) rezerwatu Jata. [W:] red. Baran M., Nyćkowiak J. Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze Część II - Fauna. Poznań. 8-18.
- Blaik T (1999) Motyle dzienne (Lepidoptera: Papilionoidea, Hesperioidea) wybranych zbiorowisk roślinnych zachodniej części Równiny Opolskiej. Wiadomości entomologiczne 18 (3): 153-167.
- Buszko J (1991) Motyle (Lepidoptera) rezerwatu Las Piwnicki. Parki Narodowe i Rezerwaty Przyrody. 10: 5-60.
- Buszko J. (1997) Atlas rozmieszczenia motyli dziennych w Polsce (Lepidoptera: Papilionoidea, Hesperioidea) w latach 1986-1995. Oficyna Wydawnicza Turpress, Toruń, 170.
- Buszko J, Kokot A Palik E i inni (1996) Motyle większe (Macrolepidoptera) Puszczy Białowieskiej. Parki Narodowe i Rezerwaty Przyrody 15 (4): 3-46.
- Buszko J, Nowacki J (2000) The Lepidoptera of Poland. A Distributional Checklist. Polish Entomological Monographs. Vol. 1.
- Buszko J (2004) Czerwończyk nieparek, *Lycena dispar* (Haworth 1802). [W:] Polska Czerwona Księga Zwierząt. Bezkręgowce., Z. Glowaciński, J. Nowcki (red.) Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków, 245-246.
- Ciosek M (1986) Rezerwaty przyrody województwa siedleckiego. WOIT, Siedlce.
- Frąckiel K (1999) Motyle dzienne (Lepidoptera: Papilionoidea, Hesperioidea) Biebrzańskiego Parku Narodowego. Wiadomości Entomologiczne 18 (2): 85-98.
- Machnikowski M (1999) Zmiany w faunie motyli dziennych (Lepidoptera: Rhopalocera) w zachodniej części Bydgoszczy w latach 1975-1998. Wiadomości Entomologiczne 18 (2): 103-109.
- Romaniszyn J (1929) [W:] Romaniszyn J., Schille F., Fauna Motyli Polski (Fauna Lepidopterorum Poloniae). Tom I, Prace Monogr. Kom. Fizjogr. PAU, Kraków, Nr 6, 1- 563.
- Sielezniew M, Sachanowicz K (2003) Motyle dzienne (Lepidoptera: Papilionoidea, Hesperioidea) Puszczy Rominckiej – wyniki badań wstępnych. Parki Narodowe i Rezerwaty Przyrody 22 (4): 581-592.
- Skalski W.A. 1995. Rodzaj *Leptidea* Billberd, 1820 w Polsce (Lepidoptera: Pieridae). Acta Entomologica Silesiana, 3 (1-2).
- Swaay CAM., Warren MS (1999) Red Data Book of European butterflies (Rhopalocera). Nature and Environment, No 99. Council of Europe Publishing, Strasbourg.

14. Fauna motyli (Lepidoptera) rezerwatu „Las Piwnicki”, dynamika zmian oraz obserwacje nowych gatunków

Changes in fauna of butterflies and moths (Lepidoptera) of Las Piwnicki reserve and observations of new species

Artur Baranowski

Wydział Biologii i Nauk o Środowisku, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie

Artur Baranowski: a.baranowski@uksw.edu.pl

Słowa kluczowe: fauna motyli, bioróżnorodność, nowe gatunki,

Streszczenie

Fauna Lepidoptera położonego niedaleko Torunia rezerwatu Las Piwnicki była szczegółowo badana w latach 70. i 80. XX wieku. Niniejsza praca zawiera wykaz nowych dla rezerwatu gatunków wykazanych w trakcie dwuletnich badań przeprowadzonych tu w latach 2002-2003. W trakcie badań stosowano standardowe metody połowu na przynęty świetlne i pokarmowe. W sumie zebrano 1493 próby z samolówek, ponad 420 prób z odłowów na ekran entomologiczny oraz kilkadziesiąt dziennych obserwacji. W sumie w trakcie badań odnotowano 854 gatunki, z czego 163 nie były wcześniej na tym terenie rejestrowane. Łącznie z 1216 gatunkami wcześniej wykazanymi liczba gatunków Lepidoptera rezerwatu Las Piwnicki wynosi obecnie 1378. Fauna motyli rezerwatu ma charakter dynamiczny, z czego 70% to gatunki stale pojawiające się w rezerwacie. Wiele gatunków przypadkowo trafiających do rezerwatu znajduje tu doskonałe miejsca do rozrodu, aklimatyzuje się i staje jego rezydentami. Odnotowanie wielu gatunków migrujących w koronach drzew może sugerować sposób ich przemieszczenia w środowiskach leśnych.

1. Wstęp

Motyle rezerwatu Las Piwnicki były już przedmiotem bardzo szczegółowych badań faunistycznych w latach 1973-74 (Buszko 1977) oraz później od 1976 do 1987 (Buszko 1991) obejmujących wszystkie rodziny rzędu motyli (Lepidoptera). W trakcie tych badań odłowiono 1216 gatunków motyli (Lepidoptera). Niniejsza praca jest uzupełnieniem wcześniejszych badań Buszki (1977, 1991), aktualizującym listę gatunków z grup: motyli dziennych (Rhopalocera), motyli nocnych większych (Heterocera) oraz trzech rodzin motyli mniejszych (Microlepidoptera: Tortricidae, Pyralidae, Roeslerstammiidae). Doniesienia o migracji oraz obserwacje rzadkich nowych gatunków z tego terenu były już publikowane (Baranowski i in. 2004a, 2004b, 2006).

Głównym celem w tej pracy, poza wykazaniem nowych gatunków dla rezerwatu Las Piwnicki, jest określenie stopnia dynamiki obserwacji nowych gatunków w stosunku do gatunków stale pojawiających się w rezerwacie.

2. Materiał i Metody

Terenem badań był rezerwat Las Piwnicki, który został utworzony w 1956 roku dla ochrony starych, funkcjonalnie zbliżonych do naturalnych drzewostanów liściastych i mieszanych o wielowarstwowej strukturze oraz dużym bogactwie florystycznym. Leży on administracyjnie w leśnictwie Olek, w nadleśnictwie Dobrzejewice w północnej części kotliny toruńsko-bydgoskiej. Powierzchnia rezerwatu wynosi 37,27 ha.

Badania prowadzono w latach 2002-2003 używając standardowych metod połowu za pomocą samolówek, a źródłem wabienia było światło i przynęta pokarmowa. Dwie samolówki świetlne z żarówką rtęciowo-żarówką o mocy 250W umieszczone były w podszycie 1.5m nad ziemią oraz w koronach drzew (18m). Trzy samolówki pokarmowe umieszczone były: jedna w podszycie (1.5 m) i dwie w koronach drzew na wysokości 18 i 16 m. Źródłem wabienia w samolówkach

z przynętą pokarmową była gąbka nasączona winem produkcji krajowej. Dodatkowo prowadzono odłowy na ekran entomologiczny oraz wizualne obserwacje motyli dziennych. W sumie zebrano 639 prób nocnych z samoówek świetlnych i 854 z samoówek pokarmowych (łącznie 1493 próby). Ponadto prowadzono odłowy gatunków przy ekranie entomologicznym w ponad 420 nocnych próbach.

3. Wyniki

W tabeli (Tab. 1) zestawiono liczby gatunków z poszczególnych rodzin Lepidoptera stwierdzonych w rezerwacie Las Lipnicki w ramach niniejszych badań oraz badań Buszko (1991), a także liczby gatunków wykazanych dla całego województwa Kujawsko-Pomorskiego.

Układ systematyczny przedstawionych niżej taksonów przyjęto za wykazem fauny motyli Polski (Buszko, Nowacki 2000). Materiał dokumentacyjny znajduje się w zbiorze autora.

Tab. 1. Zestawienie liczby gatunków stwierdzonych w poszczególnych rodzinach Lepidoptera: A – wyniki badań z lat 2002-2003, B – wyniki badań Buszko (1991) z lat 1973-1974 oraz 1976-1987, C – suma gatunków wykazanych z rezerwatu Las Piwnicki i D – liczba gatunków wykazanych z terenu województwa Kujawsko-Pomorskiego.

Lp.	Rodzina	A	B	C	D
1.	Hepialidae	3	2	3	2
2.	Roeslerstammiidae	2	2	2	2
3.	Limacodidae	2	2	2	2
4.	Cossidae	2	3	3	3
5.	Tortricidae	197	169	225	236
6.	Pyralidae	125	91	135	132
7.	Lasiocampidae	7	9	9	12
8.	Endromididae	1	1	1	1
9.	Sphingidae	10	8	10	13
10.	Hesperidae	3	4	5	12
11.	Pieridae	6	5	6	11
12.	Lycaenidae	5	5	6	27
13.	Nymphalidae	12	14	15	43
14.	Drepanidae	12	13	13	14
15.	Geometridae	179	198	214	222
16.	Notodontidae	23	26	27	30
17.	Noctuidae	224	231	261	255
18.	Pantheidae	2	2	2	2
19.	Lymantridae	6	6	6	9
20.	Nolidae	8	5	9	10
21.	Arctiidae	25	24	29	31
	suma	854	820	983	1057

WYKAZ SYSTEMATYCZNY GATUNKÓW NOWYCH DLA OMAWIANEGO TERENU

Hepialidae

Pharmacis fusconebulosa (DeGeer, 1778)

Tortricidae

Aethes rutilana (Hübner, 1817)

Acleris sheperdana (Stephens, 1852)

Acleris hastiana (Linnaeus, 1758)

Acleris literana (Linnaeus, 1758)

Archips crataegana (Hübner, 1799)

Argyrotaenia ljungiana (Thunberg, 1797)
Pandemis cinnamomeana (Treitschke, 1830)
Pandemis cerasana (Hübner, 1786)
Olindia schumacherana (Fabricius, 1787)
Entothenia marginana (Haworth, 1811)
Apotomis semifasciana (Haworth, 1811)
Celypha striana (Denis et Schiffermüller, 1775)
Celypha woodiana (Barrett, 1882)
Phiaris metallicana (Hübner, 1799)
Phiaris micana (Denis et Schiffermüller, 1775)
Phiaris bipunctana (Fabricius, 1794)
Cymolomia hartigiana (Saxesen, 1840)
Pseudohermenias abietana (Fabricius, 1787)
Lobesia abscisana (Doubleday, 1849)
Thiodia citrana (Hübner, 1799)
Gibberifera simplana (Fischer v. Röslerstamm, 1836)
Epinotia abbreviana (Fabricius, 1794)
Epinotia nanana (Treitschke, 1835)
Epinotia subocellana (Donovan, 1806)
Epinotia tedella (Clerck, 1759)
Pelochrista infidana (Hübner, 1824)
Eucosma obumbratana (Lienig et Zeller, 1846)
Eucosma lacteana (Treitschke, 1835)
Eucosma albidulana (Herrich-Schäffer, 1851)
Eucosma metzneriana (Treitschke, 1830)
Eucosma conterminana (Guenée, 1845)
Eucosma pupillana (Clerck, 1759)
Gypsonoma minutana (Hübner, 1799)
Gypsonoma oppressana (Treitschke, 1835)
Gypsonoma sociana (Haworth, 1811)
Epiblema sticticana (Fabricius, 1794)
Rhyacionia pinicolana (Doubleday, 1849)
Enarmonia formosana (Scopoli, 1763)
Ancyliis uncella (Denis et Schiffermüller, 1775)
Ancyliis obtusana (Haworth, 1811)
Ancyliis diminutana (Haworth, 1811)
Cydia funebrana (Treitschke, 1835)
Cydia tenebrosana (Duponchel, 1843)
Cydia nigricana (Fabricius, 1794)
Cydia succedana (Denis et Schiffermüller, 1775)
Cydia strobilella (Linnaeus, 1758)
Cydia fagiglandana (Zeller, 1841)
Cydia amplana (Hübner, 1800)
Cydia inquinatana (Hübner, 1800)
Pammene inquilina T. Fletcher, 1938
Pammene regiana (Zeller, 1849)
Pammene germmana (Hübner, 1799)
Dichrorampha plumbana (Scopoli, 1763)
Dichrorampha simpliciana (Haworth, 1811)

Dichrorampha gueneana Obraztsov, 1953
Dichrorampha plumbagana (Treitschke, 1830)

Pyralidae

Pyralis regalis (Denis et Schiffermüller, 1775)
Cryptoblabes bistriga (Haworth, 1811)
Salebriopsis albicilla (Herrich-Schäffer, 1849)
Elegia similella (Zincken, 1818)
Pempeliella dilutella (Denis et Schiffermüller, 1775)
Sciota hostilis (Stephens, 1834)
Selagia argyrella (Denis et Schiffermüller, 1775)
Oncocera semirubella (Scopoli, 1763)
Oncocera faecella (Zeller, 1839)
Dioryctria sylvestrella (Ratzeburg, 1840)
Nephopterix angustella (Hübner, 1796)
Conobathra repandana (Fabricius, 1789)
Acrobasis consociella (Hübner, 1813)
Episcythrastis tetricella (Denis et Schiffermüller, 1775)
Euzophera pinguis (Haworth, 1811)
Euzophera bigella (Zeller, 1848)
Euzophera cinerosella (Zeller, 1839)
Plodia interpunctella (Hübner, 1813)
Scoparia ancipitella (La Harpe, 1855)
Eudonia mercurella (Linnaeus, 1758)
Euchromius ocella (Haworth, 1811)
Agriphila deliella (Hübner, 1813)
Agriphila aeneociliella (Eversmann, 1844)
Catoptria permutatellus (Herrich-Schäffer, 1848)
Catoptria falsella (Denis et Schiffermüller, 1775)
Pediasia luteella (Denis et Schiffermüller, 1775)
Pediasia contaminella (Hübner, 1796)
Schoenobius gigantella (Denis et Schiffermüller, 1775)
Nymphula nitidulata (Hufnagel, 1767)
Aporodes floralis (Hübner, 1809)
Evergestis aenealis (Denis et Schiffermüller, 1775)
Loxostege turbidalis (Treitschke, 1829)
Loxostege sticticalis (Linnaeus, 1761)
Ecpyrrhorhoe rubiginalis (Hübner, 1796)
Pyrausta porphyralis (Denis et Schiffermüller, 1775)
Pyrausta aurata (Scopoli, 1763)
Pyrausta ostrinalis (Hübner, 1796)
Nascia ciliaris (Hübner, 1796)
Sitochroa palealis (Denis et Schiffermüller, 1775)
Phlyctaenia stachydalis (Germar, 1821)
Anania verbascalis (Denis et Schiffermüller, 1775)
Pleuroptya ruralis (Scopoli, 1763)
Mecyna flavalis (Denis et Schiffermüller, 1775)
Nomophila noctuella (Denis et Schiffermüller, 1775)

Sphingidae

Agrius convolvuli (Linnaeus, 1758)

Hyles euphorbiae (Linnaeus, 1758)

Hesperiidae

Carcharodus alceae (Esper, 1780)

Pieridae

Pontia daplidice (Linnaeus, 1758)

Lycaenidae

Thecla betulae (Linnaeus, 1758)

Nymphalidae

Vanessa atalanta (Linnaeus, 1758)

Coenonympha pamphilus (Linnaeus, 1758)

Geometridae

Peribatodes rhomboidaria (Denis et Schiffermüller, 1775)

Paradarisa consonaria (Hübner, 1799)

Scopula virgulata (Denis et Schiffermüller, 1775)

Scopula marginepunctata (Goeze, 1781)

Lythria cruentaria (Hufnagel, 1767)

Pennithera firmata (Hübner, 1822)

Thera juniperata (Linnaeus, 1758)

Eupithecia expallidata Doubleday, 1856

Eupithecia subumbrata (Denis et Schiffermüller, 1775)

Eupithecia millefoliata Rössler, 1866

Eupithecia ochridata Schütze et Pinker, 1968

Eupithecia lariciata (Freyer, 1841)

Gymnoscelis rufifasciata (Haworth, 1809)

Chesias legatella (Denis et Schiffermüller, 1775)

Aplocera eformata (Guenée, 1857)

Minoa murinata (Scopoli, 1763)

Notodontidae

Drymonia velitaris (Hufnagel, 1766)

Noctuidae

Acronicta alni (Linnaeus, 1767)

Simyra albovenosa (Goeze, 1781)

Cryphia algae (Fabricius, 1775)

Polypogon tentacularia (Linnaeus, 1758)

Lygephila viciae (Hübner, 1822)

Tyta luctuosa (Denis et Schiffermüller, 1775)

Callistege mi (Clerck, 1759)

Euclidia glyphica (Linnaeus, 1758)

Phytometra viridaria (Clerck, 1759)

Plusia putnami (Grote, 1873)

Eublemma minutata (Fabricius, 1794)

Heliothis viriplaca (Hufnagel, 1766)

Helicoverpa armigera (Hübner, 1808)

Paradrina clavipalpis (Scopoli, 1763)

Charanyca trigrammica (Hufnagel, 1766)

Thalpophila matura (Hufnagel, 1766)

Eucarta virgo (Treitschke, 1835)

Cosmia affinis (Linnaeus, 1767)

Xanthia gilvago (Denis et Schiffermüller, 1775)

Agrochola laevis (Hübner, 1803)
Mesapamea didyma (Esper, 1788)
Archanara dissoluta (Treitschke, 1825)
Lacanobia aliena (Hübner, 1808)
Lacanobia splendens (Hübner, 1808)
Hada plebeja (Linnaeus, 1761)
Sideridis albicolon (Hübner, 1813)
Polia bombycina (Hufnagel, 1766)
Polia hepatica (Clerck, 1759)
Mythimna straminea (Treitschke, 1825)
Noctua janthe (Borkhausen, 1792)
Euxoa obelisca (Denis et Schiffermüller, 1775)
Agrotis clavis (Hufnagel, 1766)

Nolidae

Bena bicolorana (Fuessly, 1775)
Pseudoips prasinana (Linnaeus, 1758)

Arctiidae

Eilema lurideola (Zincken, 1817)
Eilema pygmaeola (Doubleday, 1847)
Amata phegea (Linnaeus, 1758)
Spiris striata (Linnaeus, 1758)
Tyria jacobaeae (Linnaeus, 1758)

4. Dyskusja

W trakcie badań odnotowano 854 gatunki motyli, z czego 163 to gatunki nowe dla rezerwatu. Suma wszystkich gatunków z rodzin uwzględnionych w niniejszych badaniach wzrosła z 820 do 983. Biorąc natomiast pod uwagę wykazaną przez Buszko (1991) liczbę 1216 gatunków z wszystkich rodzin Lepidoptera, na terenie rezerwatu odnotowano łącznie 1378 gatunków, co stanowi 44% fauny motyli Polski. Liczba ta jest bliska całkowitej liczbie gatunków możliwych do wykazania z tego obszaru i zbliżona do wartości osiąganych w innych badaniach, co szczegółowo dyskutuje w swej pracy Buszko (1991). Niestety z terenu rezerwatu nie udało się wykazać aż 129 gatunków (z 820) wcześniej obserwowanych. Większość gatunków odnotowanych po raz pierwszy w rezerwacie oraz gatunki niezaobserwowane ponownie to te, które zalatują z okolicznych środowisk w regionie w poszukiwaniu pokarmu, partnera bądź będąc w stadium dyspersji i tym samym nie są jego fauną lęgową (Buszko 1991). Są również i takie, które migrują z odległych regionów Europy środkowej i południowej – *Euchromius ocella* (Baranowski i in. 2004a), *Aporodes floralis* (Baranowski i in. 2006), *Helicoverpa armigera*, pojawiając się zwykle na północ od Karpat jedynie w ciepłe, długie lata, więc obserwowane są bardzo rzadko. Obserwacja tych gatunków miała miejsce w samołowce umieszczonej w konarach drzew, co może sugerować, iż migracja w środowisku leśnym odbywa się nad szczytem lasu lub koronach drzew. Ponadto nocne obserwacje motyli dziennych, które w trakcie nocy podejmują migracje, również miały miejsce w koronach drzew, co może potwierdzać tę hipotezę. Do tych gatunków należą: *Pontia daplidice*, *Vanessa atalanta*, *Thecla betulae*, *Neozephyrus quercus*, *Pararge aegeria*. Trzy z tych gatunków *P. daplidice*, *V. atalanta*, *T. betulae* nie były wcześniej z rezerwatu wykazywane. Wcześniej była już wykazywana incydentalna aktywność nocna *N. quercus* i *N. polychloros* (Buszko 1991) oraz innych gatunków motyli dziennych (Adamczewski 1966, 1992; Heintze 1978; Reichholf 1993; obserwacje własne). Z grupy motyli dziennych *Rhopalocera* wykazano jeszcze dwa nowe gatunki: *C. pamphilus* i prawdopodobnie *Carcharodus alceae*. Identyfikacja jest prawdopodobna, ponieważ osobnik nie został złapany i dokładnie zidentyfikowany, ale dane o rozszedzeniu gatunku w kraju oraz oddalone o kilkanaście kilometrów znane jego stanowisko, wskazują obecność tego właśnie gatunku (Buszko 1997).

Niektóre z incydentalnie pojawiających się gatunków w ostatnich kilkudziesięciu latach nie tylko pojawiły się po raz pierwszy w Polsce, ale również zaaklimatyzowały się i dalej rozprzestrzeniają się na terenie kraju (Blaik 2004). Gatunki te pojawiły się również w rezerwacie: *Eucarta virgo* w liczbie 45 osobników i *Gymnoscelis rufifasciata* w liczbie 14 osobników.

Interesującym jest również gatunek *Endotricha flammealis*, który co prawda został wykazany przez Buszko (1991) ale tylko na podstawie jednego zaobserwowanego osobnika. W trakcie bieżących badań był on typowym eudominantem i dominantem, a odłowiony został w liczbie 3932 osobników. W pierwszym roku badań zaobserwowano 3253 osobniki, a w następnym 679. Przykład ten pokazuje, iż skład gatunkowy motyli rezerwatu jest bardzo dynamiczny. Wiele gatunków pojawia się i przez wiele lat nie jest ponownie obserwowana. Wskazuje również, iż stan wiedzy o czynnikach kształtujących regionalną różnorodność gatunkową oraz jej przewidywalność nie jest pełny.

Pomimo wielu różnic i dużej zmienności fauny Lepidoptera rezerwatu zdecydowana większość gatunków to stali jego rezydenci. Liczba gatunków wspólnych zaobserwowanych w latach siedemdziesiątych i na początku lat osiemdziesiątych oraz w latach 2002-2003 wynosi 691. Liczba ta stanowi 70 % wszystkich wykazanych gatunków (983).

5. Wnioski

Wyniki przeprowadzonych powtórnych badań faunistycznych rezerwatu Las Piwnicki skłaniają do wysnucia kilku wniosków:

- Udział gatunków incydentalnie pojawiających się w rezerwacie i nie wykazywanych pomiędzy badaniami wynosi 16% (129 gatunków) dla pierwszego okresu badań, a dla drugiego 19% (163 gatunki). Porównanie obecnych badań (2002-2003) z dawniejszymi badaniami (1973-74; 1976-87) wskazuje na brak potwierdzenia dawniej wykazywanych gatunków, a liczba ta wynosi aż 292 gatunki, co stanowi 30%.

- Liczba gatunków stale pojawiających się w rezerwacie wynosi 691, co stanowi - 70 % wszystkich odnotowanych gatunków.

- Fauna motyli rezerwatu ma charakter dynamiczny. Gatunki wcześniej nie wykazywane zasiedlają go i odbywają lęgi lub też przypadkowo zalatują.

- Migracja gatunków w środowiskach leśnych może odbywać się ponad koronami drzew.

- W trakcie intensywnych dwuletnich badań zaobserwowano podobną liczbę gatunków jak w trakcie mniej intensywnych 15 letnich badań (Buszko 1991). Na wielkość liczby wykazanych gatunków może wpływać intensywność oraz długość prowadzonych badań.

6. Literatura

- Adamczewski SF (1966) Materiały do poznania wędrówek motyli w Polsce. III. Fragmenta Faunistyka Musei Zoologici Polonici 12: 415-427.
- Adamczewski SF (1992) Zagadnienia migratyzmu u motyli. Filogenetyczne i ekologiczne uwarunkowania wędrówek motyli i ich ukształtowanie w środowisku różnych biomów. TEXT, Warszawa.
- Baranowski A, Mocarski Z, Płocica J, Wasiluk D (2006) Records of *Aporodes floralis* Hübner, 1809 (Lepidoptera: Pyralidae) from Poland. Polskie Pismo Entomologiczne 75: 83-88
- Baranowski A, Wasiluk D, Baran T (2004a) Nowe dane o *Euchromius ocella* (Haworth, 1811) (Lepidoptera: Pyralidae) w Polsce. Wiadomości Entomologiczne 23: 248.
- Baranowski A, Wasiluk D, Baran T (2004b) Nowe stanowiska *Celypha woodiana* (Barrett, 1882) (Lepidoptera: Tortricidae) w Polsce. Wiadomości Entomologiczne 23: 175.
- Blaik T (2004) Charakterystyka fauny i zgrupowań Macroheterocera (Lepidoptera) równiny Opolskiej Chełmu. Praca doktorska. Zakład Ekologii Zwierząt. UMK w Toruniu.
- Buszko J (1977) Rozmieszczenie motyli w zespołach leśnych rezerwatu „Las Piwnicki” koło Torunia. Acta UNC. Biologia 19: 149-157.
- Buszko J. 1991. Motyle (Lepidoptera) rezerwatu Las Piwnicki. Parki nar. Rez. przyr. 10: 5-60.
- Buszko J (1997) Atlas rozmieszczenia motyli dziennych w Polsce (Lepidoptera: Papilionoidea, Hesperioidea) 1986-1995. Turpress, Toruń.

- Buszko J, Nowacki J (2000) The Lepidoptera of Poland. A Distributional Checklist. Pol. Entomol. Monogr. 1: 1-176.
- Heintze J (1978) Motyle Polski. Atlas. Część I. WSiP, Warszawa.
- Reichholf J (1993) Obserwujemy motyle. Jak – gdzie – kiedy? PWRiL, Warszawa.

15. Świnia domowa jako zwierzę modelowe w badaniach biomedycznych

Domestic pig as an animal model for biomedical research

Kuriga Anna

Katedra Fizjologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski W Olsztynie

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Jarosław Całka

Kuriga Anna: anna.kuriga@gmail.com

Słowa kluczowe: inżynieria genetyczna, postęp, schorzenia, ksenotransplantacja.

Streszczenie

Organizm świni domowej coraz chętniej jest wykorzystywany do badań biomedycznych. Potencjał tego gatunku w badaniach naukowych wykryto podczas analizy budowy anatomicznej oraz funkcjonowania narządów świni domowej i organów ludzkich. Wszystkie badania powinny być przeprowadzone w sposób ograniczający ilość zwierząt wykorzystanych do badań oraz zminimalizowanie ich cierpienia. Postęp inżynierii genetycznej umożliwił odtworzenie w organizmie świni procesów zachodzących podczas występowania chorób u ludzi. Do metod umożliwiających stworzenie transgenicznych linii świń zalicza się mikroiniekcję DNA do przedjądra zygoty, transfer genów przy pomocy plemników (sperm-mediate gene transfer- SMGT), docytoplazmatyczna iniekcję plemnika (intracytoplasmic sperm injection- ICSI) oraz przenoszenie jądra komórki somatycznej (somatic cell nuclear transfer SCNT). Powyższe metody przyczyniły się do odtworzenia przebiegu wielu patomechanizmów zachodzących podczas wielu schorzeń występujących u ludzi, co przyczyniło się do rozpoczęcia badań nad opracowywaniem terapii wielu chorób, poznania mechanizmów molekularnych mających miejsce w komórkach chorego człowieka oraz wczesnego diagnozowania chorób. Kolejnym ważnym aspektem jest ksenotransplantacja, która niesie za sobą nadzieję na zwiększenie liczby przyjętych przeszczepów i zwiększyłaby rezerwę organów dla oczekujących na przeszczep pacjentów.

1. Wstęp

Postęp w badaniach w badaniach biologicznych, a przede wszystkim w inżynierii genetycznej, która umożliwiła dzisiaj dowolne modyfikowanie DNA czy RNA, pozwolił na wykorzystanie wielu gatunków zwierząt do lepszego zrozumienia mechanizmów zachodzących podczas chorób u ludzi. Dzięki temu istnieje możliwość, by w kontrolowanych warunkach zbadać procesy patofizjologiczne mające miejsce w przebiegu schorzeń u ludzi, wykorzystując do tego odpowiednie modele zwierzęce. Do opracowania bezpiecznych protokołów przedklinicznych w badaniach biomedycznych ukierunkowanych na człowieka, istotnym jest dysponowanie odpowiednimi modelami zwierzęcymi. Jest to warunek konieczny, który umożliwia weryfikację oraz uzyskanie nowych, adekwatnych dla ludzkiego organizmu informacji badawczych. Wybór odpowiedniego organizmu modelowego związany jest z rozpatrzeniem wielu czynników, rozpoczynając od podobieństwa genetycznego, a kończąc na czynnikach ekonomicznych (Wierzbicki 2014).

2. Opis zagadnienia

2.1 Warunki przeprowadzania badań naukowo-badawczych wykorzystujących zwierzęta

Prowadzenie badań za zwierzętami, wymaga dogłębnego przeanalizowania dostępnej literatury i metodyki. Praca naukowo-badawcza wykorzystująca zwierzęta obwarowana jest licznymi obostrzeniami prawnymi, które mają zapewnić nie tylko odpowiednie przetrzymywanie zwierząt, ale również humanitarne prowadzenie doświadczeń czy stosunkowo bezbolesne przeprowadzenie eutanazji. Od 1956 roku kontrolę w tym aspekcie sprawuje Międzynarodowy Komitet ds. Zwierząt

Labolatoryjnych (ICLA). Od 1972 roku, ICLA utrzymuje kontakt ze Światową Organizacją Zdrowia (WHO). (Turlejski 2011) Podstawową zasadą, której trzeba przestrzegać w trakcie pracy ze zwierzętami jest zasada 3R. Tworząc projekt badań przeprowadzanych na zwierzętach, bezwzględnie należy przestrzegać wymienionych zasad- przede wszystkim, w celu możliwego ograniczenia liczby używanych zwierząt czy ograniczenia materiału badawczego, który nie będzie nam potrzebny w naszych analizach. Zasada 3R wprowadzona została w 1959 roku przez Williama Russela i Rexa Burcha. Jej trzema filarami są:

- a) REPLECMENT- zastąpienie doświadczeń na zwierzętach metodami in vitro (hodowle komórkowe, tkankowe), zastąpienie zwierzętami o niższym stopniu rozwoju ewolucyjnego;
- b) REDUCTION- zmniejszenie liczby zwierząt poprzez lepsze wykorzystanie metod statystycznych;
- c) REFINEMENT- zmiana procedury eksperymentalnej na przysparzającą zwierzętom mniej cierpień (Turlejski 2011)

2.2 Świnia jako zwierzę modelowe w badaniach biomedycznych

Świnia zajmuje szczególne miejsce jako zwierzę modelowe w badaniach biomedycznych. Głównym czynnikiem wpływającym na takie zjawisko jest fakt, że genom świni domowej jest prawie w 94% zbieżny z genomem człowieka. Po poznaniu genomu świni, okazało się, że świnie podobnie jak człowiek, mają identyczne zaburzenia i dysfunkcje białek, które wywołują w ten sam sposób choroby takie jak otyłość, choroba Parkinsona czy Alzheimer. Cenna jest również analogia w budowie i funkcjonowaniu narządów wewnętrznych świni i człowieka, co stanowi podstawę do wykorzystania tego gatunku do ksenotransplantacji. Kolejnym istotnym aspektem jest łatwość przeprowadzenia modyfikacji genowej u świni domowej w porównaniu z innymi dużymi zwierzętami. Gatunek ten charakteryzuje się również wysoką płodnością i plennością oraz łatwością utrzymania i szybkim wzrostem, a organy w stosunkowo krótkim czasie osiągają pełną wielkość i wydolność fizjologiczną. (Wierzbicki 2014)

Wyróżnia się cztery główne kierunki wykorzystania zwierząt transgenicznych. Pierwszym z nich jest ksenotransplantacja, w której dawcami tkanek i narządów dla ludzi są genetycznie zmodyfikowane świnie domowe. Drugi, to tworzenie i wykorzystanie transgenicznych zwierząt modelowych naśladujących ludzkie choroby do multidyscyplinarnych badań, mających na celu poznanie przyczyn, przebiegu danej jednostki chorobowej i jej skutków. Trzecim kierunkiem jest użycie świń w roli bioreaktorów lub molekularnych farm, do produkcji różnego rodzaju białek lub biopolimerów, istotnych w medycynie. Ostatni nurt dotyczy badań nad poprawą cech użytkowych zwierząt hodowlanych. (Wiater 2018)

2.3 Metody uzyskiwania świń transgenicznych

Jedną z najstarszych metod wykorzystywaną w modyfikacji genetycznej w celu uzyskania transgenicznych świń jest mikroiniekcja DNA do przedjądrza zygoty. Technika ta umożliwia uzyskanie zwierząt z ekspresją określonego genu oraz pozwala na wprowadzanie do genomu stosunkowo długich odcinków DNA w postaci konstruktów genowych. Kolejną metodą jest klonowanie somatyczne, czyli klonowanie z wykorzystaniem jąder komórek somatycznych (SCNT). Pomimo ogromnej roli, jaką odegrała ta technika w embriologii eksperymentalnej, wywołuje ona daleko idące zmiany w funkcjonowaniu kodu epigenetycznego, co zmniejsza efektywność procesu. Ograniczenie te zostało zastąpione przez inną metodę bioinżynierii genetycznej, kiedy opracowano technologię „hand made cloning-HMC”, która zredukowała wiele złożonych manipulacji. Pozyskiwanie świń transgenicznych zostało również osiągnięte przez użycie metody, w której nośnikami określonej modyfikacji genetycznej są oplaszczony DNA plemniki, wprowadzone do cytoplazmy oocyty. Metoda ta nosi nazwę doocytoplazmatycznej iniekcji plemnika (intracytoplasmic sperm injection- ICSI). Wymienione wyżej ruchliwe komórki zostały również użyte jako wektory do przenoszenia genów w metodzie SMGT(sperm-mediate gene transfer), czyli transferze genów przy pomocy plemników (Skrzyszowska i Samiec 2006)

Mikroiniekcja DNA do przedjądrza zygoty

Metoda ta opiera się na mikroiniekcji DNA do jednego z przedjądrzy jednokomórkowego zarodka-zygoty- przy użyciu mikrochirurgicznej szklanej pipety. Przedjądrze męskie pobierane jest z plemnika, a żeńskie z komórki jajowej. Następnie do dowolnie wybranego przedjądrza wstrzykiwany jest roztwór DNA, po czym nastrzyknięte zygoty hoduje się *in vitro* aż do osiągnięcia stadium dwukomórkowego. Wadą tego etapu jest brak możliwości dokładnego kontrolowania objętości wstrzykiwanego roztworu DNA. Metoda mikroiniekcji polega na przypadkowej integracji wstrzykniętego transgenu z genomem gospodarza i nie można wybrać lokalizacji takiej integracji. Ponadto nie ma możliwości kontroli liczby kopii trans genu wbudowanego w genom, które często układają się tandemowo. Uzyskany transgeniczny osobnik może posiadać badany trans gen we wszystkich komórkach swojego organizmu. (Knecht 2013)

Transfer genów przy pomocy plemników (sperm-mediate gene transfer- SMGT)

Używanie plemników jako wektorów do przenoszenia zamierzonych genów lub określonych sekwencji DNA do oocyty w wyniku zapłodnienia stanowi jedną z metod uzyskiwania transgenicznych świń, a częstotliwość uzyskiwania potomstwa tą metodą waha się w szerokich granicach od 5-60%. Opiera się to na rzeczywistej zdolności plemników do wiązania i internalizacji egzogenego DNA. Następnie przenosi się je do oocyty w trakcie zapłodnienia. Inkubowane plemniki pochodzące z ejakulacji mają zdolność włączenia DNA do ich jąder w ciągu 1-2 h, chociaż wartość ta zależy od cech osobniczych, stąd istotna jest selekcja knurów jako dawców nasienia. Stosunek między DNA a liczbą plemników na optymalnym poziomie wynosi 40 ug DNA/10⁸plemników/ml. Do największych zalet tej techniki zalicza się wysoką wydajność, niski koszt i łatwość użycia w porównaniu do innych metod. Dodatkowo nie wymaga ona obsługi zarodków ani zbyt kosztownego sprzętu. (Knecht 2013)

Docytoplazmatyczna iniekcja plemnika (intracytoplasmic sperm injection- ICSI)

Technologia ta polega na zapłodnieniu oocyty w stadium metafazy II poprzez iniekcję plemnika do komórki jajowej lub przestrzeni pomiędzy osłonką przejrzystą a komórką jajową wraz z akrosomem i nienaruszoną błoną plemnika. Zaletą tej metody jest uzyskanie liczego potomstwa z bardzo małej koncentracji plemników lub nawet z jednego plemnika. Ponadto wstrzyknięte plemniki nie muszą się poruszać ani posiadać witki. (Knecht 2013)

Przenoszenie jądra komórki somatycznej (somatic cell nuclear transfer SCNT)

Metoda ta polega na wprowadzaniu genów do linii zarodkowej dla świń, zwanej klonowaniem, czyli przenoszeniem jądra komórki somatycznej. Wyróżnia się dwa etapy procesu, obejmujące transfekcję transgenu do komórek somatycznych (głównie fibroblastów) w trakcie hodowli *in vitro*, a następnie wstawienie jądra transgenicznych komórek do oocyty poprzez transfer jądra. Zaletą jest selekcyonowanie genotypu w trakcie hodowli *in vitro*, a w miejscu wprowadzenia transgenu następuje wkomponowanie poprzez rekombinację homologiczną. (Knecht 2013)

Dzięki użyciu powyższych metod wytworzono linie świń transgenicznych, które z powodzeniem mogą być wykorzystywane w badaniach dotyczących poznawania mechanizmów procesów chorobotwórczych, jak i opracowania skutecznych metod terapeutycznych. Do tej pory udało się uzyskać modele chorób układu naczyniowego- miażdżycy, chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, płasawica Huntingtona, chorób o podłożu metabolicznym, w tym dla cukrzycy oraz chorób nowotworowych i wielu innych. (Wiater 2018)

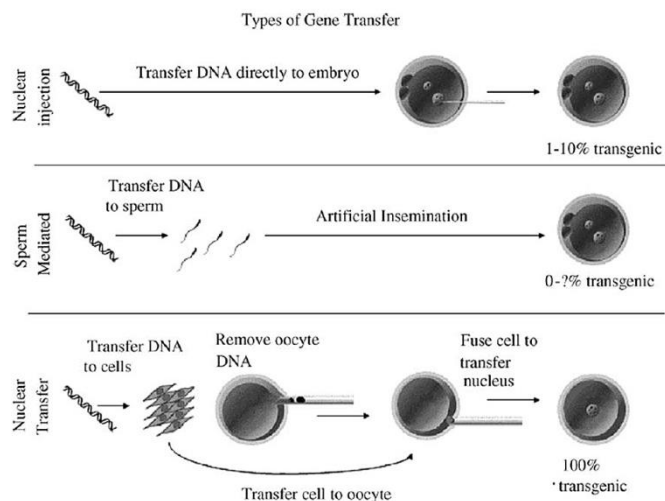
2.4 Transgeniczne świny jako modele w badaniach biomedycznych

Cukrzyca

Cukrzyca i często związany z nią zespół metaboliczny należą do chorób człowieka określanym mianem „chorób cywilizacyjnych”. Ze względu na wzrost częstości występowania tych jednostek, stworzono odpowiedni model zwierzęcy. Testowanie nowych metod leczniczych umożliwiło odtworzenie w organizmie świni procesów patofizjologicznych zachodzących w organach człowieka podczas przebiegu cukrzycy. Wykorzystano anatomiczne podobieństwa trzustek tych dwóch gatunków, polegających na podobnej wielkości, umiejscowieniu, kształtu,

unaczynieniu, czy rozmieszczeniu i typu komórek endokrywnych oraz metabolizmie glukozy. Z tego względu model świński wydał się być najbardziej odpowiedni. (Aigner 2010)

Cukrzyca u świń występuje niezwykle rzadko, gdyż zwierzęta te wykształciły naturalną zdolność do regulacji anaboliczno-lipogennej, a mechanizm ten został dodatkowo wzmocniony przez udomowienie świń i ich selektywną hodowlę w kierunku zwiększonego kumulowania tkanki tłuszczowej. W wyniku tego komórki beta trzustki odpowiedzialne za produkcję insuliny są odporne na czynniki diabetogenne. W celu uzyskania odpowiedniego modelu cukrzycowego eksperymentalnie inicjuje się chorobę, co uzyskuje się najczęściej przez odpowiednie manipulacje farmakologiczne, dietetyczne lub chirurgiczne. (Aigner 2010)



Rys. 1. Metody transferu genów (Knecht 2013).

Wrzody

Do uszkodzenia przewodu pokarmowego u ludzi przyczynia się wiele czynników, wśród których możemy wyróżnić przyczyny jatrogenne, takie jak wielokrotne stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), niekorzystna dieta czy operacje mające na celu chirurgiczne usunięcie guzów nowotworowych. W wyniku tych działań dochodzi do powstawania wrzodów trawiennych, najczęściej na terenie żołądka, które są przyczyną krwawień z górnego odcinka przewodu pokarmowego. Pomimo stosowania skutecznej terapii tego schorzenia metodą hemostazy endoskopowej, nie u wszystkich pacjentów przebiega ona pomyślnie. Transgeniczne świny stanowią w tym przypadku świetny model do testowania skuteczności i bezpieczeństwa nowego sprzętu endoskopowego przed badaniami klinicznymi. (Gürl 2014)

Choroba Alzheimera (AD) jest najczęstszą przyczyną otępienia w starszej populacji.

Choroba zwykle objawia się podstępny początkiem upośledzenia wyższych funkcji intelektualnych, zmianami w nastroju i zachowaniu się. Później rozwijają się dezorientacja, utrata pamięci i afazja, czyli objawy świadczące o ciężkim zaburzeniu czynności kory. W ciągu 5-10 lat pacjent staje się głęboko niepełnosprawny, niemy i nieruchomy. Śmierć pojawia się zwykle z powodu powikłań zasadniczej choroby, zapalenia płuc lub innej choroby. Istotnym czynnikiem ryzyka AD jest wiek. Występuje ona u około 3% osób w wieku od 65 do 74 lat, u 19% w wieku między 75 a 84. rokiem życia i u 47% starszych niż 84 lata. Badania nad rodzinnymi formami AD podtrzymują założenia modelu, w którym peptyd- β -amyloid odkłada się z czasem mózgu. Peptyd ten powstaje, gdy białko prekursorowi amyloidu (amyloid precursor protein, APP), jest kolejno rozcinane przez

enzym konwertujący β -amyloid (β -amyloid converting enzyme, BACE) i γ -sekretazę. Mutacje w APP albo w składowych γ -sekretazy (presenilin-1 lub preseniliny-2, PSEN-1 i PSEN-2) prowadzą do rodzinnej AD poprzez podwyższenie tempa wytwarzania β -amyloidu. (Robins 2013) Ostatnio udało się uzyskać model świni z mutacją genu PSEN1M1146, dzięki czemu istnieje szansa na opracowanie wczesnej diagnostyki choroby. (Danek i in. 2017)

2.5 Transgeniczne świnię i ksenotransplantacja

Ograniczona liczba dawców narządów i tkanek do przeszczepów stanowi obecnie poważny problem w transplantologii. Wielu pacjentów co roku umiera niedoczekawszy przeszczepu. Wykorzystanie zwierząt jako dawców komórek, tkanek i narządów zmniejsza skalę problemu i otwiera drzwi do bardziej dynamicznego postępu w dziedzinie transplantologii. Świnia jako gatunek fizjologicznie i genetycznie podobny do człowieka wydaje się być dawcą optymalnym. Istnieje jednak bariera immunologiczna, wynikająca z większego dystansu filogenetycznego między swinia a człowiekiem. Współczesna inżynieria genetyczna stara się rozwiązać ten problem. Możliwe jest uzyskanie świń transgenicznych, które posiadają w swoim genomie ludzkie geny obniżające ryzyko niezgodności tkankowej i immunologicznej (Wiater 2018).

Elementem stanowiącym barierę immunologiczną jest struktura cukrowa występująca na powierzchni większości komórek świni- Gala(1,3)Gal β (1,4)ClcNA-r, nazywana popularnie epitopem α -gal, lub epitopem gal i jest syntetyzowana przez enzym α -1,3-galaktozylotransferazę. Epitop α -gal występuje również u innych ssaków, a także bakterii i pierwotniaków. Z kolei człowiek i małpy człekokształtne, w wyniku ewolucji utraciły ten epitop i wytwarzają naturalne przeciwciała skierowane przeciwko tej strukturze. Dowiedziono również, że obecność u człowieka przeciwciał skierowanych przeciwko α -gal jest konsekwencją immunizacji antygenami bakterii naturalnie zasiedlających ludzki przewód pokarmowy. Przeciwciała te występują w dwóch klasach immunoglobulin: IgG i IgM, a ich interakcja z epitopem α -gal prowadzi do reakcji nadostrego odrzucenia przeszczepu. W wyniku połączenia przeciwciał z α -gal, w organizmie biorcy następuje uruchomienie tzw. enzymatycznej kaskady dopełniacza, w wyniku czego dochodzi do lizy komórek w przeszczepionym narządzie i tym samym do zniszczenia przeszczepu. (Dzięgiel i in. 2018)

Obecnie prowadzi się badania nad modyfikacją genetyczną świni, by jej serce i narządy były pokryte na powierzchni ludzkimi białkami, dzięki czemu wyeliminowano by podstawową przeszkodę, czyli reakcję nadostrego odrzucenia przeszczepu. Może ona wystąpić już po kilkunastu minutach od wykonania przeszczepu. Aby zapobiec temu niepożądanemu zjawisku niezbędne są modyfikacje zmierzające do wyeliminowania występującego u świni genu α -1, 3-galaktozylotransferazy oraz wprowadzenie do genomu świni genów odpowiedzialnych za ekspresję ludzkiego układu dopełniacza. Manipulacje takie stworzyły by szansę na wykorzystanie wszczepionego narządu jako tymczasowego organu zastępczego do czasu znalezienia stosownego narządu ludzkiego. Kolejnym etapem jest eliminacja reakcji ostrego i przewlekłego odrzucenia przeszczepu, które związane są z procesami krzepnięcia krwi. Przedłużenie okresu funkcjonowania ksenoorganu po przeszczepie możliwe jest dzięki obecności genów ograniczających reakcje ostrego i przewlekłego odrzucenia przeszczepu. (Dzięgiel i in 2018, Wiater 2018)

Prace nad uzyskiwaniem transgenicznych świń pod kątem wykorzystania ich organów do ksenotransplantacji, muszą uwzględnić ryzyko przeniesienia na człowieka wirusów odzwierzęcych. Zagrożeniem takim w przypadku narządów pochodzących od świni są występujące u tego gatunku endogenne retrowirusy- PERV (porcine endogenous retrovirus). Zdolność do infekcji ludzkich komórek przez PERV potwierdzono do tej pory w badaniach in vitro, jednak zjawisko to nie było obserwowane in vivo. Nie wyjaśnione są również konsekwencje takiej infekcji dla człowieka. Podejrzuje się, że mogą one prowadzić do spontanicznych mutacji w genomie. (Mazurek 2014)

3. Podsumowanie

Zwierzęta modelowe naśladujące daną chorobę człowieka stwarza możliwości sprawdzenia skuteczności zastosowanej terapii, przetestowania różnych wariantów terapeutycznych, przebadania ewentualnych działań niepożądanych, jakie mogą wystąpić podczas, bądź po jakimś czasie od

przeprowadzenia leczenia. Dzięki rozwojowi technik biologii molekularnej oraz inżynierii komórkowej, wzrasta nasza wiedza o możliwościach wykorzystania na potrzeby ksenotransplantacji komórek, tkanek, czy nawet całych narządów pochodzących od świń transgenicznych. (Wiater 2018)

4. Literatura

- Aigner B, Renner S, Kessler B et al (2010) Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med* 88: 653-664.
- Danek M, Danek J, Araszkiewicz A (2017) Duże zwierzęta jako potencjalne modele zaburzeń psychicznych i zachowania człowieka. *Psychiatr. Pol.*(online) 51:6; 1009-1027. Dzięgiel N, Szczurek P, Jura J i in. (2018) Świnia jako zwierzę modelowe w translacyjnych badaniach biomedycznych. *Postępy Hig Med Dosw* (online) 72: 1032-1042.
- Gürl G, Kues W (2014) Current Progress of genetically engineered pig models for biomedical research. *BioResearch Open Access* 3:6: 255-264.
- Knecht D, Duziński K (2013) Nowe kierunki w inseminacji trzody chlewnej. *Przegląd hodowlany* 1: 4-6.
- Litten-Brown JC, Corson AM, Clarke L (2010) Porcine models for metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *Animal* 4:6: 899-920.
- Robbins (2013) Choroby neurodegeneracyjne: Alzheimer. *Patologia Robbinsa* :894-895
- Skrzyszowska M, Samiec M (2006) Wykorzystanie nowych kierunków badań w klonowaniu somatycznym świń. *Biotechnologia* 1:72:68-81.
- Turlejski K (2011) Zwierzęta w badaniach naukowych- perspektywa z kilku punktów widzenia. *Animal Science* 48: 7-8.
- Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S (2011) Recent advances in use of *Sus Scrofa* (pig) as a model system for proteomic studies. *Proteomic* 11: 776-793.
- Wiater J (2018) Czy dzięki metodom inżynierii genetycznej ksenotransplantacja stanie się faktem? Transgeniczne świny jako potencjalni dawcy narządów dla człowieka. *Kosmos* 67:3:541-553.
- Wierzbicki M (2014) Modele zwierzęce w badaniach medycznych, biologicznych i zootechnicznych. *Przegląd hodowlany* 6: 26-28.

16. Kanibalizm świń- przyczyny i zapobieganie

Cannibalism in pigs- causes and prevention

Kuriga Anna

Katedra Fizjologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski W Olsztynie.

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Jarosław Całka

Kuriga Anna: anna.kuriga@gmail.com

Słowa klucze: odchylenia behawioralne, czynniki środowiskowe, urazy, profilaktyka

Streszczenie

Kanibalizm u świń to zjawisko występujące przede wszystkim w zmasowanej i intensywnej produkcji zwierzęcej, nie zawsze prowadzonej w warunkach dobrostanu. Jedną z głównych przyczyn występowania tej patologii behawiorystycznej jest niedobór składników odżywczych, co skłania zwierzęta do konkurencji o dostęp do pokarmu. Najczęstszymi przyczynami zachowań kanibalistycznych w intensywnym chowie trzody chlewnej są nieodpowiednie warunki środowiskowe, wśród których na szczególną uwagę zasługuje brak ściółki uniemożliwiający wyrażanie przez świnię naturalnych zachowań, prowadząc do dyskomfortu psychicznego zwierząt oraz do nudy. W konsekwencji wystąpienia wszystkich wyżej opisanych niesprzyjających czynników dochodzi do aktów kanibalizmu, które przyczyniają się do cierpienia zwierząt oraz strat ekonomicznych w produkcji. W celu zapobieżenia przykrym skutkom tego zjawiska należy wdrożyć odpowiedni program prewencyjny uwzględniający spełnienie zapotrzebowania bytowego zwierząt i musi on dotyczyć budynków inwentarskich, jakości paszy, jak i higieny jej magazynowania oraz odpowiednio dobranego personelu obsługującego fermę.

1. Wstęp

Zachowania kanibalistyczne, z których najbardziej powszechne jest obgryzanie ogonów, należą do poważnych zaburzeń stojących u podstaw dobrostanu zwierząt na fermach trzody chlewnej oraz istotnie wpływają na względy ekonomiczne produkcji trzody chlewnej. Straty wynikają z ograniczenia przyrostów, zwiększenia liczby zabiegów weterynaryjnych, brakowania zwierząt i dyskwalifikacji tusz w zakładach rzeźnych. (Temple i in. 2014)

Kanibalizm u świń wywołany jest wieloma czynnikami, wśród których wymienia się bezściełowe systemy utrzymania zwierząt na podłogach rusztowych, błędy żywieniowe, nieodpowiednie warunki klimatyczne środowiska, nieadekwatne i ubogie środowisko nie dające możliwości zaspokajania takich potrzeb behawioralnych jak ruch, zabawa, rycie, pasienie, żucie. Częstość występowania tej patologii są także rasa, wiek, płeć i stan zdrowia. Konsekwencją wyżej wymienionych elementów jest pojawienie się napięcia w sferze psychicznej zwierząt, która ściśle skorelowana jest z funkcjami systemów fizjologicznych. Wywołanie zmian czynnościowych ośrodków nerwowych rzutuje na funkcje mózgu oraz autonomicznego układu nerwowego, co z kolei prowadzi do dewiacji behawioralnych, zmian patomorfologicznych narządów, zaburzeń metabolizmu, immunosupresji i obniżenia zdolności rozrodczej. (Kołaczkowski i Cwynar 2012)

Kanibalizm u świń pojawia się najczęściej na wielkotowarowych fermach wśród warchlaków i tuczników, prowadząc zarówno do pogorszenia zdrowotności zwierząt, jak i zysków hodowcy. Może stanowić poważny problem, jeśli nie zwalczy się symptomów u pojedynczych osobników, ponieważ zwierzęta w grupie naśladując się wzajemnie, rozprzestrzeniają niepożądane zachowania na resztę stada. W kolejnych kojcach zwierzęta, podpatrując zachowanie starszych osobników, zaczynają zachowywać się tak samo, w efekcie czego schorzenie rozchodzi się po całej fermie. (Kołaczkowski i Cwynar 2012)

Kanibalizm występuje w dwóch odmianach- jako kanibalizm dotyczący innych atakowanych osobników oraz autokanibalizm, który obserwowany jest u zwierząt samookaleczających

się- obgryzanie (często do krwi) własnych kończyn. Kanibalizm świń opisywany jest najczęściej pod postacią obgryzania ogonów, obgryzania uszu, wygryzania boków i sromu lub zagryzania przez maciory własnego potomstwa. (Kołaczkiewicz i Cwynar 2012)

2. Przegląd literary

2.1 Obgryzanie ogonów

Obgryzanie ogonów definiowane jest jako manipulacja ogonem w obrębie jamy gębowej zwierzęcia, która powoduje rany i klasyfikowane jest jako zachowanie „anormalne”, gdyż rzadko obserwowane jest w warunkach chowu ekstensywnego lub w półnaturalnych systemach utrzymania. Literatura podaje trzy główne typy obgryzania ogonów wśród świń, przy czym różnice wynikają z odmiennych motywów zachowań zwierząt. (Temple i in. 2014)

Zjawisko to może przebiegać w dwóch etapach. Pierwszym jest etap przedurazowy, zwany inaczej fazą wstępną polegającą na ssaniu lub żuciu ogona, który w swej końcówce jest słabo unerwiony, więc nie powoduje znacznego bólu u zwierzęcia, a tym samym osłabiona jest reakcja obronna osobnika. Okres traktowany jest jako przedłużenie normalnego nawyku poznawczego. Drugim etapem jest etap urazowy, czyli faza destrukcyjna, w której dochodzi do odgryzienia końcówki ogona, który krwawiąc wywołuje u osobników atakujących dodatkowe podniecenie zarówno widokiem jak i zapachem krwi. Okres ten nie jest jednak podyktowany agresją zwierząt. (EFSA 2007)

Kolejnym rodzajem jest „nagle i wymuszone” obgryzanie, podczas którego dochodzi do pochwycenia i ugryzienia ogona bez wyraźnie zaznaczonej delikatnej manipulacji. Sytuacja taka zachodzi powszechnie w wyniku konkurencji zwierząt o dostęp do zasobu, np. paszy. (Temple i in. 2014)

Występuje również trzecia forma obgryzania ogonów, którą skategoryzowano jako „obsesyjną” i polega na obgryzaniu ogonów przez zwierzęta przez dłuższy czas niż robią to inne osobniki. Może to wynikać z różnic w dojrzewaniu organizmu we wczesnej fazie rozwoju i osobniki wykazujące takie zachowanie jest niższe od pozostałych zwierząt w stadzie. (Temple i in. 2014)

2.2 Czynniki ryzyka wystąpienia obgryzania ogonów u świń

Błędy żywieniowe

Wśród błędów żywieniowych wymienia się ograniczony dostęp do paszy powodując głód fizyczny polegający na niedoborze składników pokarmowych, głównie energetycznych (cukry rozpuszczalne w wodzie i cukry strukturalne, tłuszcze), jak i związków azotowych (białko surowe). W takich sytuacjach zwierzęta stają się agresywne w wyniku konkurencji o dostęp do pokarmu, czego objawem jest kanibalizm. Przykładem takiej sytuacji może być niedostateczna liczba karmideł w kojcu. Do tego zaburzenia może również prowadzić głód fizjologiczny, polegający na niedoborze niektórych składników pokarmowych w przypadku stosowania pasz o niezbilansowanych składnikach, takich jak aminokwasy egzogenne, witaminy czy makroelementy. Pobudza to zwierzęta do poszukiwania pokarmu i zwiększa ryzyko wystąpienia obgryzania „dwustopniowego”. Zaburzenia w składzie aminokwasowym paszy są często związane z kanibalizmem prosiąt. Również deficyt soli w mieszance oraz niski poziom tryptofanu zwiększają preferencję w stosunku do krwi i sprzyjają pojawieniu się obgryzania. (EFSA 2007;Grela 2016)

Kolejnym czynnikiem żywieniowym powodującym występowanie aktów kanibalizmu w stadzie trzody chlewnej jest nieodpowiedni skład pasz. Odnotowano niekorzystny wpływ na zachowanie świń w przypadku stosowania pasz zawierających mączki mięsno-kostne, pszenżyto, odpady gorzelniane lub w sytuacji, gdzie zadawany pokarm uległ zanieczyszczeniu mykotoksynami. (Kołaczkiewicz i Cwynar 2012; Grela 2015)

Należy również pamiętać o odpowiedniej formie zadawanej paszy. Wykazano, że zarówno skarmianie wyłącznie paszą suchą jak i o nieodpowiednim rozdrobieniu, poniżej 0,5 mm oraz nieodpowiedni poziom włókna surowego wpływa za obgryzanie ogonów. (Temple i in. 2014)

Za pojawienie się „nagle” obgryzania winne są czynniki wywołujące konkurencje i frustrację, między innymi opisany wyżej głód fizyczny, jak i ograniczony dostęp do wody, w tym niedostateczna liczba poidel, opóźnienie dostarczenia paszy jak i nieprzewidziane jej zadanie.

Wszystkie powyższe czynniki odpowiedzialne są za wystąpienie stresu, który predysponuje do odchyłań behawioralnych. (Grela 2016)

Dużą rolę w przyswajaniu i w trawieniu składników pokarmowych odgrywa ośrodkowy układ nerwowy. Czynniki psychiczne są niezmiernie ważne w pobudzaniu wydzielania soku żołądkowego. Ból, spleśniała pasza lub jej nieodpowiedni smak może osłabić pobieranie pokarmu, a tym samym pogarsza się przyswajanie i wykorzystanie składników odżywczych przez zahamowanie wydzielania soków trawiennych. W konsekwencji prowadzić to może do wystąpienia odchyłań w zachowaniu zwierząt, między innymi do kanibalizmu. (Grela 2016; Taylor et al 2010)

System utrzymania świń

Najważniejszym czynnikiem prowadzącym do pojawienia się kanibalizmu wśród trzody chlewnej jest beżściolowy system chowu lub brak innego materiału wzbogacającego środowisko materiału. Intensywny chów świń na podłogach rusztowych odbiera możliwość spełniania naturalnych zachowań m.in. do rycia, zabawy słomą, czy budowania gniazda przez lochy przed porodem. Niedostateczna liczba legowiska, nadmierne zagęszczenie świń lub zróżnicowanie wagowe i wiekowe zwierząt w kojcu powoduje zaburzenia w budowaniu hierarchii wśród osobników w kojcu, a tym samym naraża zwierzęta na stres i zmiany w psychice, predysponując tym samym do patologicznych zachowań. (Kołaczkowski i Cwynar 2012; EFSA 2007; Temple i in. 2014)

Nieodpowiednie warunki mikroklimatyczne w budynkach

Czynniki ryzyka wpływającymi na częstość występowania kanibalizmu u świń są także nieodpowiednie warunki mikroklimatyczne w pomieszczeniach inwentarskich. Wykazano wzrost gryzienia wśród świń poddanych stresowi gorąca i w przypadku zbyt wysokiej wilgotności, gdyż warunki takie prowadziły do zwiększenia zachowań agresywnych wśród zwierząt. Niezapewnienie odpowiedniej wentylacji, zwłaszcza w okresie zimowym, prowadzi do podwyższenia wilgotności stężenia amoniaku oraz dwutlenku węgla w pomieszczeniach, co predysponuje do zwiększenia liczby aktów kanibalizmu w stadzie. Do powyższej grupy czynników należałoby również dodać nadmierne, jaskrawe oświetlenie w chlewni, przy czym największa intensywność ekspozycji świń na światło występuje w okresie wiosenny-lętnym. Warto również zwrócić uwagę na znaczenie zapylenia w budynku, częstą zmienność dobową temperatury powietrza oraz przeciągi. (EFSA 2007; Wallgren 2019)

Czynniki indywidualne

Niektórzy autorzy zwracają uwagę na predyspozycje rasowe do występowania większej skłonności obgryzania ogonów. Stwierdzono, że świnię rasy Landrace i Duroc są bardziej niż inne rasy podatne na wykazywanie zachowań kanibalistycznych. Płeć osobników również ma wpływ na zróżnicowanie nasilenia gryzienia ogonów. Wykazano, że gryzienie ogonów występuje 2 razy częściej i kastrowanych knurków niż u loszek oraz kojcach ujednoczonych pod względem płci, niż w grupach mieszanych. (Kołaczkowski i Cwynar 2012; Smulders et al 2008).

Kanibalizm w postaci obgryzania ogonów ujawnia się najczęściej w grupach warchlaków w wieku 12-16 tygodniu życia. (Pejsak, 2007). Wykazano również, że symptomy kanibalizmu obserwowano już u osobników, których masa ciała przekraczała 30 kg, natomiast najczęściej obserwowano to zjawisko u świń o masie większej niż 60 kg (Edwards 2011)

Stan zdrowia świń w stadzie także może przyczynić się do wystąpienia odchyłań behawioralnych w postaci aktów kanibalistycznych. Schorzenia takie jak kulawizny, urazy mechaniczne oraz choroby układu oddechowego, zakażenia bakteryjne i wirusowe (TGE, PRRS) są przykładem zależności kondycji zdrowotnej zwierząt i gryzienia ogonów. (Kołaczkowski i Cwynar 2012)

2.3 Obgryzanie uszu i boków

Zjawiska obgryzania uszu i nadgryzania boków ma podobną etiologię do gryzienia ogonów, jednakże jest ono rzadziej spotykane. Uszy, jako dobrze unerwione i bardzo wrażliwe części ciała, przez co nie stają się one często przedmiotem zabawy lub gryzienia. Najczęściej występują u świń w wieku 10-12 tygodni życia, w przypadku obgryzania uszu, natomiast nadgryzanie boków pojawia się u świń w wieku między 6 i 20 tygodniem życia. Początkowe objawy rozpoczynającego się

kanibalizmu w grupie, które powinny zacząć niepokoić hodowcę, obejmują przede wszystkim walki hierarchiczne. U prosiąt walki często mylone są z zabawą, jednak po wczesnym odsadzeniu należy zwracać uwagę na młode zachowujące się nienaturalnie, np. ssące uszy lub ogony innych prosiąt, co może w późniejszym etapie prowadzić do gryzienia. Czasami hodowcy nad ranem znajdują martwego osobnika z licznymi obrażeniami na ciele. Agresja rozpoczyna się najczęściej od osobników dominujących, ustalających hierarchię, np. po przeniesieniu nowego tuczniaka do grupy. Kolejnym etapem choroby są martwicowe zmiany w miejscach częstego gryzienia. (Kołaczkiewicz i Cwynar 20xx; Wallgren 2019)

2.4 Zagryzanie prosiąt przez lochy

Fizjologicznym zachowaniem lochy po porodzie jest zjadanie błon płodowych, które dostarczają maciorze wielu substancji odżywczych i energetycznych, m.in. prolaktyna, kortykosterydy, estrogeny, progesteron. Wystąpić może także zjawisko zjadania przez maciorę martwych prosiąt w celu pozyskania pokarmu po porodzie. Akty kanibalizmu na żywych, ruchliwych prosiątach nie zostały jeszcze wytłumaczone naukowo i nie poznano dobrze mechanizmów tego zaburzenia. Podejrzewa się, że przyczyną mogą być niedobory substancji odżywczych, głównie białka i soli mineralnych, a także wapnia, zmiany chorobowe, takie jak zmiany zapalne gruczołów mlecznych czy uszkodzenia pochwy, czynniki stresowe porodowe lub środowiskowe lub bezściołowy system utrzymania loch uniemożliwiający ścielenie gniazda przez lochę tuż przed porodem. Do zagryzania prosiąt przez lochy dochodzi zwykle zaraz po porodzie lub podczas pierwszego karmienia i przebiega z przyduszeniem młodych a następnie ich zjadaniem. Objawem zwiastunowym zagryzania prosiąt przez lochy może nadpobudliwość ruchowa tuż przed porodem, bądź agresja wobec pracowników obsługi. Nie można ich jednak powiązać jednoznacznie z aktami kanibalizmu, gdyż okres okołoporodowy jest wyjątkowym czasem w życiu lochy i opisane wyżej objawy mogą być związane właśnie ze zbliżającym się porodem lub chęcią ochrony prosiąt. (Kołaczkiewicz i Cwynar 2012; Smulders et All 2008; Temple i in 2014)

2.5 Konsekwencje kanibalizmu

Kanibalizm w stadzie jest poważnym problemem powodującym straty ekonomiczne, które wynikają z obniżonych przyrostów dziennych, przedłużenia okresu tuczu do określonej ubojowej masy ciała oraz zwiększenia nakładów finansowych na żywienie. W wyniku powstania ran dochodzić może do wtórnych zakażeń rozprzestrzeniających się drogą limfy, krwi lub przez ciągłość tkanek. Taki ciąg zdarzeń doprowadza ostatecznie do tworzenia się ropni w mięśniach, a nawet osteomyelitis kręgosłupa odcinka lędźwiowego i piersiowego czy ropni kręgosłupa, które predysponują do zakażeń płuc, rzadziej nerek. Stan choroby kręgosłupa spowodować może paraliż tylnych nóg, a tym samym cierpienie zwierzęcia, które ma równych szans na pobieranie pokarmu i izoluje się w kącie kojca. Skutkuje to brakiem takich sztuk ze stada lub kończy się dyskwalifikacją tusz w zakładzie ubojowym. (Taylor et all 2010)

2.6 Zapobieganie

Kanibalizm jest poważnym zaburzeniem na tle żywieniowym, który należy zwalczać i zapobiegać jego powstawaniu przez odpowiednią profilaktykę. Podstawowym elementem zmniejszającym ryzyko wystąpienia kanibalizmu w stadzie lub umożliwiającym jego eliminację jest zapewnienie zwierzętom odpowiednich warunków środowiska, tak by mogły wykazywać swój naturalny behavior, a tym samym spełniony był ich dobrostan. Można to osiągnąć przez redukcję ilości zwierząt w kojcach, by uniknąć nadmiernego zagęszczenia i poprzez poprawę parametrów związanych z wentylacją, stężeniem gazów (amoniak, dwutlenek węgla), wilgotnością oraz odpowiednim dostosowaniem temperatury w pomieszczeniach inwentarskich. (Kołaczkiewicz i Cwynar, 2012)

Podkreślono wcześniej wpływ obecności słomy jako czynnika redukującego ryzyko wystąpienia kanibalizmu wśród świń, zatem należałoby zapewnić maciorom możliwość stworzenia gniazda ze słomy w okresie przedporodowym, co jest szczególnie ważne dla pierwiastek. (Taylor et All 2010)

Istnieje prawny obowiązek zapewnienia w utrzymaniu trzody chlewnej odpowiednio wzbogaconego otoczenia, jednakże przepisy zostawiają sporo swobody w definicji określenia „właściwej manipulacji wzbogaconym materiałem”. Najlepszym materiałem do wspomnianej manipulacji okazała się słoma, gdyż umożliwia ona rycie i utrzymuje zainteresowanie zwierząt przez dłuższy czas w porównaniu do wiszących łańcuchów, lin lub innych „zabawek”. (Temple i in. 2014)

Kolejnym istotnym aspektem jest dostarczenie i utrzymanie zbilansowanej diety dostosowanej odpowiednio do każdej grupy technologicznej. (Grela 2016)

Zapewnienie zwierzętom wszystkich wyżej wymienionych warunków bytowania nie jest jednak całkowicie skuteczne i mimo tego występują przypadki kanibalizmu w stadzie, niezależne od czynników środowiskowych. Osobniki wykazujące agresję w stosunku do innych należy usunąć ze stada, by odchylenia behawiorystyczne nie zostały przejmowane przez inne świnie i utrwalone w stadzie. Rozwiązaniem ograniczającym obgryzanie ogonów jest ich obcinanie możliwe tylko z przepisu lekarza weterynarii, kiedy zachowania kanibalistyczne pozostają nadal problemem po zastosowaniu wszystkich możliwych działań prewencyjnych. (Kończak i Cwynar, 2012) Mimo to obcinanie ogonów jest traktowane jako rutynowy zabieg, szczególnie na dużych fermach i wykonywany jest na prosiętach w pierwszych dniach życia. Jednakże ten środek zapobiegawczy nie eliminuje anormalnego zachowania zwierząt, a jego działanie polega na zmniejszeniu występowania obgryzania ogonów w stadzie. Zwierzęta nadal mogą wykazywać odchylenia behawiorystyczne, z tym, że zabrano im możliwość wykazywania ich właśnie poprzez gryzienie danych części ciała. Zauważono wzrost wrażliwości na ból u osobników, u których przeprowadzono zabieg amputacji ogona. Związane jest to z występowaniem na kikutach obciętych ogonów skupiska tzw. neuronów. Są to zwoje włókien nerwowych tworzące się w miejscach przerwania aksonów i powodujących wysoką wrażliwość na ból w miejscu amputacji. Optymalna ilość karmideł, poideł, jak również jakość wody i paszy oraz warunki jej przechowywania odgrywają ważną rolę w programie prewencyjnym dotyczącym zagadnienia kanibalizmu w produkcji trzody chlewnej. (Temple i in. 2014)

Niekiedy dozwolone jest stosowanie środków psychotropowych – są to sytuacje, gdy wykluczono ujemny wpływ czynników środowiskowych na zachowanie zwierząt, a przykładowymi preparatami są Elenium (chlordiazepoksyd), Relanium (diazepam), Ketanest (ketamina). W celu zabezpieczenia powstałych ran zaleca się miejscowe stosowanie substancji odkażających, które zmniejszą krwawienie, a tym samym zniwelują agresję u pozostałych zwierząt, dzięki czemu nie dojdzie do kolejnych prób gryzienia predystryngowanych miejsc. Istnieją również preparaty w sprayu do użycia bezpośrednio na zwierzęta lub do rozpylenia ogólnie w pomieszczeniach inwentarskich-ich gorzki smak zniechęca świnie do zachowań kanibalistycznych. (Pejsak 2007)

3. Podsumowanie

Utrzymanie prawidłowej kondycji i zdrowia świń podczas procesu produkcji zwierzęcej jest obowiązkiem hodowców oraz lekarzy weterynarii sprawujących opiekę nad stadem. Najwłaściwszym byłoby stworzenie indywidualnie dopasowanego do danej fermy programu prewencyjnego. Zapewnienie optymalnych warunków środowiskowych w pomieszczeniach inwentarskich, w tym dostępu do prawidłowo bilansowej paszy o spełniającej wymogi jakościowe wody oraz zagwarantowanie odpowiedniego mikroklimatu w chlewni, jest głównym czynnikiem warunkującym zachowanie zwierząt. Zaniechanie tych kryteriów składających się na dobrostan zwierząt, naraża je na niepotrzebne cierpienie i stres oraz doprowadza do obniżenia zysków z produkcji zwierzęcej.

4. Literatura

- Edwards S (2011) What do we know about tail biting today? The Pig Journal 66:81-86.
EFSA (2007) Scientific report on the risks associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need for tail docking considering the different housing and husbandry systems. The EFSA Journal, 611:1-13.
Grela ER (2016) Behavioral consequences of improper pig nutrition. Życie weterynaryjne 91:2: 93-96.

- Grela ER (2015) Optymalizacja żywienia rosnących świń w aspekcie fizjologicznym i ekonomicznym. *Magazyn Weterynaryjny* 6:42-49.
- Kończak R i Cwynar P (2012) Kanibalizm świń i inne zaburzenia behawioralne- przyczyny i zapobieganie. *PIWET . Konferencja- Świnie*.
- Pejsak Z (2007) Ochrona zdrowia świń. *Kanibalizm* 70-74.
- Smulders D, Hautekiet V, Verbeke G et al (2008) Tail and ear biting lesions in pigs: an epidemiological study. *Animal Welfare* 17:61-69.
- Taylor NR, Main DCJ, Mendl M et al (2010) Tail-biting: a new perspective. *The Veterinary Journal* 186: 137-147.
- Temple D, Mainau E, Manteca X (2014) Zachowania kanibalistyczne u trzody chlewnej. *Farm Animal Welfare Education Centre 8: Publikacja nt dobrostanu zwierząt hodowlanych*. Wallgren T (2019) A tale of tails. Prevention of tail biting by Early detection and straw management. *Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences* 17-31.

17. Testy behawioralne wykorzystywane w badaniu zaburzeń kognitywnych u zwierząt laboratoryjnych

Behavioral tests using to study cognitive disorders in laboratory animals

Małgorzata Łopatyńska-Mazurek⁽¹⁾, Karolina Kiełbik⁽²⁾, Joanna Stec⁽²⁾, Aleksandra Dymek⁽³⁾, Gabriela Bielecka-Papież⁽⁴⁾

⁽¹⁾Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Oddziałem Analityki Medycznej z Pracownią Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾Katedra i Zakład Farmakognozji, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej i Społecznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: prof. dr n. farm. Jolanta Kotlińska

Małgorzata Łopatyńska-Mazurek: gosia.lopатыnska@gmail.com

Słowa kluczowe: test laboratoryjne, zaburzenia poznawcze, procesy uczenia się i pamięci

Streszczenie

Zaburzenia funkcji poznawczych (kognitywnych) występują zarówno w naturalnych procesach starzenia jak również w przebiegu wielu poważnych chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. Termin ten określa stan kliniczny, w którym osłabieniu ulegają elementarne procesy poznawcze, takie jak pamięć, uwaga, myślenie, percepcja oraz kontrola poznawcza. Badania behawioralne przeprowadzane na zwierzętach laboratoryjnych są obecnie niezbędnym elementem w dalszym zgłębianiu wiedzy na temat samych zaburzeń funkcji kognitywnych jak również przedklinicznej farmakoterapii. Wykorzystywane w tym celu są liczne testy, które są w stanie ocenić zaburzenia uwagi, pamięci czy uczenia się. Do najczęściej stosowanych należą: test 5-CSRTT (ang. *5-choice serial reaction time task*) sprawdzający zdolność koncentracji i uwagi; test labiryntu T, labiryntu Y czy labiryntu ramion promienistych, które sprawdzają pamięć operacyjną czy test rozpoznawania nowego obiektu (ang. *novel object recognition test*) oceniający pamięć wzrokową. W doświadczeniach można wykorzystać również test oceniający pamięć społeczną zwierząt tzw. test rozpoznawania społecznego- (ang. *social recognition test* oraz test oceniający pamięć przestrzenną- test labiryntu kołowego Barnes'a (ang. *Barnes maze test*).

Celem tej pracy jest podsumowanie obecnego stanu wiedzy i przedstawienie różnorodnych testów behawioralnych stosowanych w neurofarmakologii podczas oceny zaburzeń procesów poznawczych.

1. Wstęp

Funkcje poznawcze, nazywane również kognitywnymi są podstawowymi procesami warunkującymi poznawanie rzeczywistości. Pozwalają na orientowanie się w przestrzeni, środowisku oraz na przyswajanie zdobytych informacji o otaczającym świecie, a następnie przetwarzanie ich i wywołanie odpowiedniej reakcji jaką jest odpowiednie zachowanie. Do podstawowych czynności kognitywnych zaliczamy: pamięć, uwagę, myślenie, mowę oraz postrzeganie. Są to więc wszystkie te procesy umysłowe, które umożliwiają gromadzenie, odbieranie, analizowanie, opracowywanie i przetwarzanie informacji zdobytych ze środowiska zewnętrznego. Dzięki nim, zarówno ludzie jak i zwierzęta są w stanie prawidłowo funkcjonować w otaczającym ich świecie i komunikować się z nim (Waszkiewicz 2012).

2. Opis zagadnienia

Zaburzenia funkcji poznawczych o różnym stopniu nasilenia występują w przebiegu szeregu chorób o podłożu neurodegeneracyjnym, ale również w naturalnym procesie starzenia się organizmu (Millan i in. 2012). Są one charakterystyczne dla chorób neurologicznych takich jak: choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne, udar, zespoły otępienne; chorób psychiatrycznych: depresja, choroba afektywna dwubiegunowa, schizofrenia, ale również innych zaburzeń takich jak: nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, urazy głowy, demencja czy zespoły abstynencyjne związane z zaprzestaniem przyjmowania alkoholu, leków czy substancji odurzających.

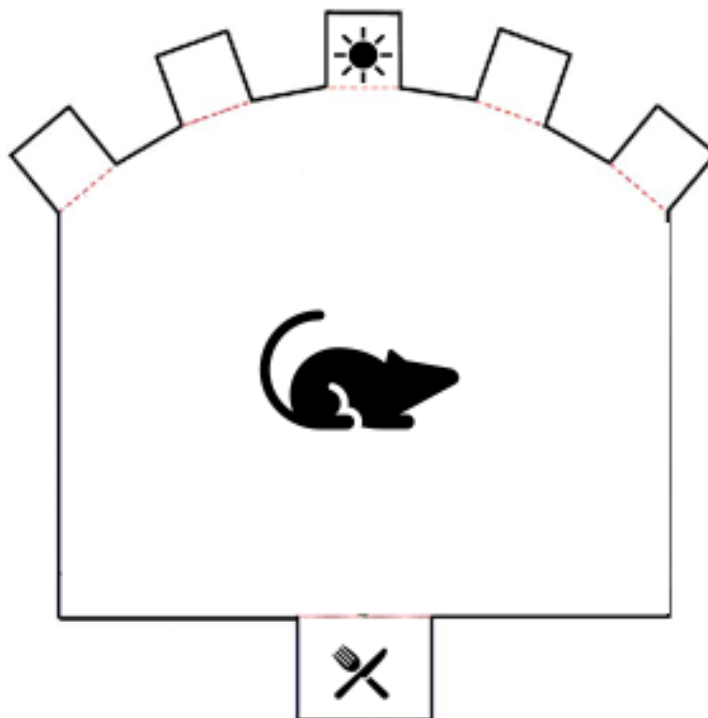
Zaburzenia funkcji pamięciowych dzielimy na zaburzenia ilościowe wśród których wymieniamy hipoamnezję (obniżenie funkcji pamięciowych) i amnezję (brak pamięci) oraz na zaburzenia jakościowe takie jak złudzenia pamięciowe czy konfabulacje. Z kolei zaburzenia uwagi dotyczą nadmiernego rozproszenia uwagi, utrudnionej koncentracji oraz nadmiernej przeczutności uwagi (sytuacji, gdy pacjent co chwilę skupia się na innej czynności) (Talarowska i in. 2009). Kolejnymi utrudniającymi codzienne funkcjonowanie zaburzeniami czynności poznawczych są zaburzenia myślenia. Dotyczą one zarówno uszkodzenia toku myślenia (tj. spowolnienia myślenia, utraty wątku, rozkojarzenia, inkoherencji myślenia- braku spójności pomiędzy myślami), treści myślenia (urojenia, obsesje) jak i upośledzenia logiki myślenia (myślenie magiczne, nielogiczne, ambiwalentne). Zaburzenia postrzegania z kolei dotyczą przede wszystkim pojawiających się objawów wytwórczych takich jak iluzje i omamy wzrokowe, węchowe, słuchowe czy czuciowe). Wszystkie wymienione wyżej uszkodzenia funkcji kognitywnych występują w różnym stopniu nasilenia oraz z różną częstotliwością w przebiegu wielu schorzeń i chorób neurodegeneracyjnych. Podstawą prawidłowego leczenia jest wykrycie pierwszych zmian już na początkowym etapie choroby. Pomiar deficytów poznawczych u ludzi dokonywane są za pomocą licznych narzędzi testowych, metod neuroobrazowych oraz badań dychotycznych (Mosiołek 2014). Z kolei postęp dalszej farmakoterapii jest możliwy dzięki przedklinicznym badaniom behawioralnym, które z powodzeniem wykonuje się na zwierzętach laboratoryjnych.

3. Przegląd literatury

Testy kognitywne prowadzone na gryzoniach laboratoryjnych dostarczają nieocenionych informacji o regulacji złożonych funkcji poznawczych. Stanowią one szeroką bazę wiedzy bardzo istotną z punktu widzenia farmakoterapii chorób z deficytami poznawczymi. Z pośród wszystkich zaburzeń kognitywnych w badaniach laboratoryjnych na całym świecie, najczęściej analizowane są zaburzenia procesów uwagi, uczenia się oraz pamięci. Uczenie postrzegane jest bowiem przez badaczy w kategorii zmiany zachowania, a zapamiętywane tych zmian jako pamięć (Bari 2008).

Bardzo dobrym testem służącym do pomiaru procesów uwagi wzrokowo-przestrzennej u gryzoni laboratoryjnych jest test 5-CSRTT (ang. *5-choice serial reaction time task*). Test ten przeprowadza się w specjalnych klatkach instrumentalnych wyposażonych w pięć otworów, które mogą zostać podświetlone oraz podajnika, na którym w odpowiednim momencie pojawia się nagroda w postaci pokarmu (Rys.1). Test polega na poprawnej identyfikacji oświetlonego otworu przy pomocy nosa w celu uzyskania nagrody pokarmowej. Badanie to wymaga od zwierzęcia ciągłej uwagi i koncentracji w trakcie trwania sesji. Podczas testu mierzona jest liczba prawidłowych odpowiedzi oraz liczba popełnionych błędów co pozwala na wyznaczenie tzw. poprawności odpowiedzi. Również mierzony jest czas potrzebny do udzielenia prawidłowej odpowiedzi po pojawieniu się bodźca świetlnego co uznawane jest za tzw. wskaźnik tempa procesów poznawczych. Podczas tego badania rejestrowane są dodatkowo odpowiedzi przedwczesne (zagładanie, szturchanie nosem odpowiedniego otworu przed pojawieniem się bodźca świetlnego), które są miarą impulsywności (Bari 2008).

Dzięki testowi 5-CSRTT badana jest selektywność uwagi (zdolność do koncentracji na jednym aspekcie otoczenia), podzielność uwagi (konieczność kontrolowania wszystkich otworów jednocześnie), impulsywność oraz czas reakcji. Z tej przyczyny test ten jest powszechnie wykorzystywany w badaniach przedklinicznych chorób z deficytami uwagi, nadpobudliwości oraz w badaniach z wykorzystaniem zwierzęcego modelu hazardu (Zeeb i in. 2014).

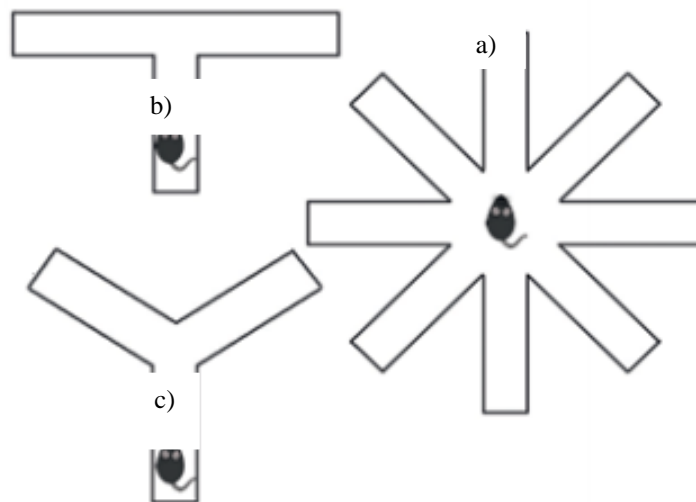


Rys. 1 Schemat testu 5-CSRTT.

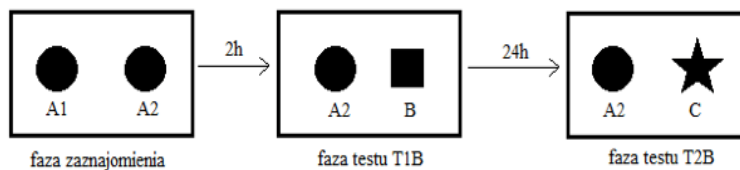
W celu zbadania pamięci operacyjnej (nazywanej również pamięcią roboczą lub krótkotrwałą) będącej podstawą takich procesów jak komunikowanie się, uczenie oraz wyciąganie wniosków (Szatkowska 1999) przeprowadza się testy z wykorzystaniem ośmioramiennego labiryntu promienistego, labiryntu T lub labiryntu Y (Rys. 2). Wszystkie te testy oparte są na naturalnej zdolności gryzoni do alternacji tj. zdolności do dokonywania alternatywnych wyborów. Test polega na umieszczeniu pożywienia na końcu wybranego ramienia. Zwierzę musi odnaleźć do niego drogę bez konieczności ponownego zaglądnienia do ramion pustych niezawierających pożywienia. Podczas testu rejestrowana jest liczba poprawnych wyborów tj. wejść do ramion z pożywieniem oraz liczba wyborów błędnych, a głównym wskaźnikiem jakości pamięci operacyjnej jest ich stosunek względem siebie.

Do badania procesów uczenia się i pamięci wzrokowej zarówno krótkotrwałej jak i długotrwałej powszechnie wykorzystywany jest test rozpoznawania nowego obiektu-test NOR (ang. *novel object recognition task*). Podstawą jego funkcjonowania jest wrodzona skłonność gryzoni do interesowania się nowymi obiektami w znanym środowisku. Test przeprowadza się w klatkach, w których umieszcza się różne przedmioty różniące się między sobą kształtem, teksturą, kolorem, wielkością oraz materiałem, z którego są wykonane. Jeden z przedmiotów powinien być gryzoniowi już dobrze znany, drugi zaś powinien stanowić dla niego zupełną nowość. Wykonanie testu rozpoczyna się od tzw. fazy zaznajomienia, podczas której zwierzę umieszcza się na środku klatki z dwoma identycznymi obiektami i pozostawia na kilka minut celem swobodnego zapoznania obiektów. Następnie po 2-godzinym (badanie pamięci krótkotrwałej) lub 24-godzinnym (badanie pamięci długotrwałej) okresie retencji przeprowadza się fazę testową, w której jeden ze znanych już obiektów zastępowany jest nowym (Ryc. 3). W obu badaniach rejestruje się czas eksploracji każdego z obiektów i na jego podstawie wyznacza się indeks preferencji (ze wzoru: $\text{Indeks} = \frac{tB \times 100}{tB + tA}$, gdzie tB- czas zainteresowania nowym obiektem, tA- czas zainteresowania znanym obiektem). Test rozpoznawania nowego obiektu jest szeroko stosowany do oceny zaburzeń kognitywnych u gryzoni,

gdyż zwierzęta wykazujące zaburzenia pamięci, zarówno krótkotrwałej jak i długotrwałej nie przyzwyczajają się do prezentowanych obiektów (Marszałek-Grabska i in. 2018).



Rys. 2 Schemat a) labiryntu promienistego b) T-labiryntu c) Y-labiryntu

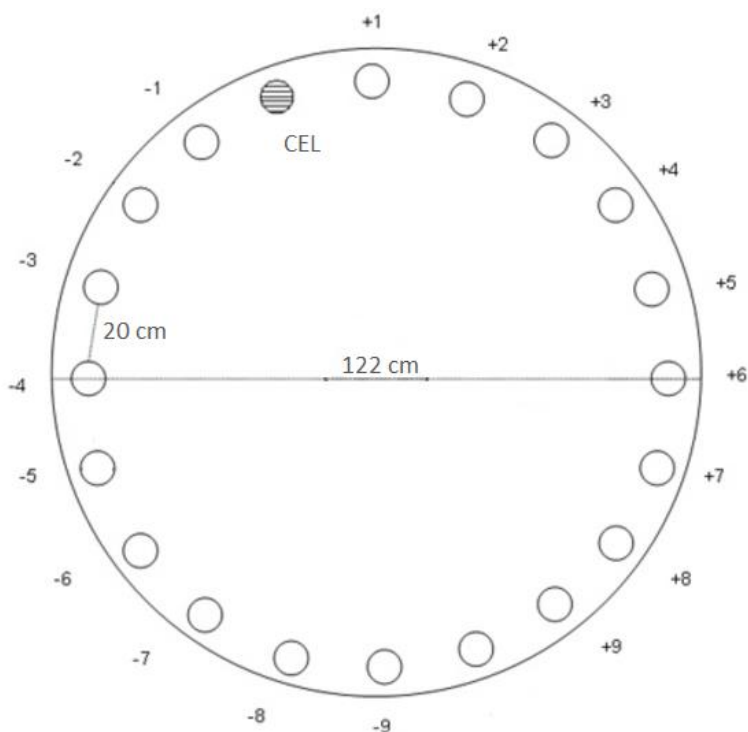


Rys. 3 Schemat testu rozpoznawania nowego obiektu.

Kolejnym testem służącym do oceny zaburzeń kognitywnych jest test labiryntu kołowego Barnes'a. Test ten wykorzystywany jest do badania pamięci przestrzennej gryzoni oraz procesów uczenia się i elastyczności pamięci. Zwierzę umieszcza się na powierzchni labiryntu, który stanowi platforma z licznymi otworami na obwodzie. Jeden z otworów zastąpiony jest skrzynką ewakuacyjną, która jest jednocześnie schronieniem i celem dla zwierzęcia. Na ścianach pomieszczenia badawczego umieszczone są liczne wskazówki wizualne w postaci dużych, kolorowych kształtów geometrycznych (ryc.4). Dzięki tym wskazówkom zwierzę zapamiętuje drogę do skrzynki ewakuacyjnej. W celu wywołania reakcji ucieczki labirynt jasno oświetla się za pomocą żarówki o mocy 500 W, a jako dodatkowy bodziec awersyjny stosuje się brzęczyk emitujący dźwięk o wartości 80 dB. Badanie rozpoczyna się od habituacji mającej na celu zaznajomienie się zwierząt z nowym środowiskiem. Po upływie 24 godzin przeprowadza się trwającą pięć kolejnych dni fazę nabywania, podczas której zwierzę uczy się drogi do schronienia. Następnego dnia, po zakończeniu procesu uczenia, przeprowadza się test właściwy, podczas którego mierzona jest ilość popełnionych błędów przez zwierzę (ilość odwiedzanych otworów przed wejściem do skrzynki ewakuacyjnej) oraz czas, po którym zwierzę zlokalizuje wejście do skrzynki. Faza testu właściwego służy do oceny pamięci przestrzennej u zwierząt. Kolejnym etapem badania jest test odwróconego uczenia, który

przeprowadza się godzinę po zakończeniu testu właściwego. Podczas tej części doświadczenia położenie skrzynki ewakuacyjnej zmienia się o 180°. Dzięki temu zwierzęta szukają skrzynki ewakuacyjnej używając tych samych sygnałów przestrzennych, jednocześnie ucząc się nowej lokalizacji otworu. Doświadczenie to służy do oceny tzw. elastyczności pamięci (Gawel i in. 2016).

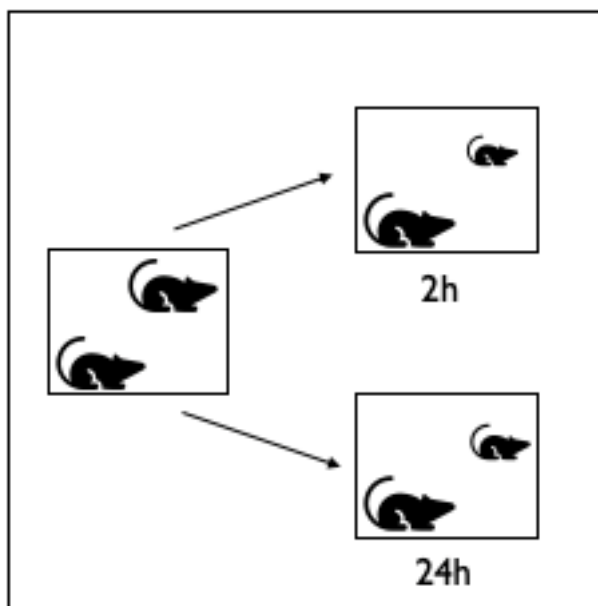
Test labiryntu kołowego Barnes'a jest z powodzeniem stosowany w celu obserwacji zaburzeń kognitywnych przez naukowców z różnych dziedzin. Jednym z bardziej powszechnych zastosowań jest jego użycie w zwierzęcych modelach choroby Alzheimera, gdyż u tych pacjentów występuje znaczna neurodegeneracja komórek hipokampu i kory śródwęczowej, co objawia się utratą pamięci o drodze do domu i orientacji w przestrzeni (Gawel i in. 2015).



Rys. 4 Schemat labiryntu kołowego Barnes'a.

Zaburzenia pamięci społecznej, nazywanej również pamięcią zbiorową mogą wystąpić w niektórych chorobach z deficytami kognitywnymi. Przez pamięć zbiorową rozumiemy wszystkie wrażenia pamięciowe dotyczące wydarzeń i osób z przeszłości, które mają za zadanie współtworzyć poczucie tożsamości zbiorowej (Szacka 2005). Zaburzenia społecznych funkcji poznawczych dotyczą m.in. pacjentów z chorobą Alzheimera czy demencją, co bardzo uprzykrza ich życie oraz osób z najbliższego otoczenia. Możliwe jest wykrywanie tego rodzaju zaburzeń już na wczesnym etapie u zwierząt laboratoryjnych za pomocą testu rozpoznawania socjalnego (ang. *social recognition test*). W teście tym badanemu szczurowi prezentowany jest nowy, nieznan wcześniej młody osobnik. Podczas badania zwierzę umieszczone jest w klatce z nowym towarzyszem i rejestruje się czas (T1) zainteresowania nim co rozumiane jest jako uważne śledzenie jego zachowania, lizanie czy wąchanie. Następnie test powtarza się po 2 godzinach i ponownie rejestruje czas zainteresowania tym samym nowym osobnikiem (T2) (Rys. 5). Test rozpoznawania społecznego umożliwia wyznaczenie wskaźnika rozpoznawania (T2/T1) i pozwala ocenić zarówno pamięć krótkotrwałą (po 2 godzinach) jak i pamięć długotrwałą, gdy kolejny pomiar przeprowadzimy po 24 godzinach (Lemaire 2003).

O prawidłowych społecznych funkcjach poznawczych świadczy znacznie zmniejszone zainteresowanie nowym osobnikiem po 2 lub 24 godzinach.



Rys. 5 Schemat testu rozpoznawania społecznego.

4. Podsumowanie

Zaburzenia poznawcze występują w przebiegu wielu różnych chorób o podłożu neurodegeneracyjnym. W szczególności deficyty pamięci roboczej, przestrzennej czy społecznej oraz zaburzenia uwagi są często obserwowanymi objawami. Pomimo wielu lat badań dokładne mechanizmy rozwoju tych zaburzeń wciąż nie są w pełni poznane. Przeprowadzanie testów behawioralnych u zwierząt laboratoryjnych umożliwia ciągle zgłębianie wiedzy, zarówno na temat samych chorób neurodegeneracyjnych, istoty zaburzeń i deficytów poznawczych jak i sposobów ich leczenia. Prowadzenie badań behawioralnych z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych z pewnością pomoże farmakologom, neurologom, psychologom i psychiatrom w rozwiązaniu problemów jakimi obarczona jest współczesna nauka.

5. Piśmiennictwo

- Bari A, Dalley J, Robbins T (2008). The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nature protocols* 3(5): 759.
- Gawel K, Labuz K, Gibula-Bruzda E i in. (2016) Cholinesterase inhibitors, donepezil and rivastigmine, attenuate spatial memory and cognitive flexibility impairment induced by acute ethanol in the Barnes maze task in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 389: 1059-1071.
- Gawel M, Potulska-Chromik A (2015) Choroby neurodegeneracyjne: choroba Alzheimera i Parkinsona. *Postępy Nauk Medycznych* 28.7: 468-476.
- Lemaire M (2003) Social recognition task in the rat. *Current protocols in pharmacology* 20.1: 5-30.
- Marszałek-Grabska M, Gibula-Bruzda E, Bodzon-Kulakowska A Suder i in. (2018) Effects of the positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 5, VU-29, on impairment of novel object recognition induced by acute ethanol and ethanol withdrawal in rats. *Neurotoxicity research* 33: 607-620.

- Millan M, Agid Y, Brüne M i in. (2012) Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. *Nature reviews Drug discovery* 11(2): 141.
- Mosiołek A (2014) Metody badań funkcji poznawczych. *Psychiatria* 11.4: 215-221.
- Nikiforuk A (2016) Od laboratorium do kliniki: ocena funkcji poznawczych w modelach zwierzęcych. *Wszechświat*, 117(01-03): 32-38.
- Szacka B (2005) Czas przeszły, pamięć, mit. Warszawa: 41.
- Szatkowska (1999) Pamięć operacyjna: integracyjna rola kory przedczołowej. *Przegląd psychologiczny* 42.1-2: 151-165.
- Talarowska M, Florkowski A, Gałęcki P i in. (2009) Funkcje poznawcze w depresji. *Psychiatria Polska* 43(1): 31–40.
- Waszkiewicz J, Wciórka J, Anczewska M i in. (2012). Zaburzenia językowe a inne wybrane funkcje poznawcze u osób chorujących na zaburzenia schizofreniczne. *Psychiatria Polska* 46(4): 553-570.
- Zeeb F, Trevor W, Catharine A (2009) Serotonergic and dopaminergic modulation of gambling behavior as assessed using a novel rat gambling task. *Neuropsychopharmacology* 34.10: 23-29.

18. Test wymuszonego pływania w badaniu stanów depresyjnych u zwierząt laboratoryjnych

Forced swimming test in the study of depressive states in laboratory animals

Małgorzata Łopatyńska-Mazurek⁽¹⁾, Karolina Kiełbik⁽²⁾, Joanna Stec⁽²⁾, Aleksandra Dymek⁽³⁾, Gabriela Bielecka-Papież⁽⁴⁾

⁽¹⁾Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Oddziałem Analityki Medycznej z Pracownią Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾Katedra i Zakład Farmakognozji, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej i Społecznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: prof. dr n. farm. Jolanta Kotlińska

Małgorzata Łopatyńska-Mazurek: gosia.lopатыnska@gmail.com

Słowa kluczowe: test laboratoryjny, depresja, stres, test Porsolta, szczur

Streszczenie

Test wymuszonego pływania, zwany również testem Porsolta jest jednym z najczęściej stosowanych testów behawioralnych, służącym do oceny zachowań depresyjnych u zwierząt laboratoryjnych. Opiera się na założeniu, że umieszczając zwierzę w pojemniku wypełnionym wodą, początkowo będzie próbowało uciec, ale ostatecznie wykaże bezruch, którą uznaje się za odzwierciedlenie rozpaczy behawioralnej. Jest testem, który mierzy strategię radzenia sobie ze stresem, jakim jest w tym przypadku zanurzenie w wodzie i brak możliwości wydostania się z naczynia badawczego. U ludzi to właśnie stres, szczególnie przewlekły jest jednym z głównych czynników rozwoju depresji, a z kolei dla depresji charakterystyczna jest upośledzona reakcja na stres. Test wymuszonego pływania jest szeroko stosowany, nie tylko w przedklinicznych badaniach dotyczących depresji, ale również zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD- ang *autism spectrum disorder*) czy stresu (Commons i in. 2017). Pomimo wielu zalet, takich jak prostota przeprowadzenia testu oraz niskie koszty, posiada on jednak wiele wad i stawia pod znakiem zapytania jego zastosowanie. Niniejsza praca ma na celu podsumować obecny stan wiedzy na temat testu Porsolta oraz przedstawić dowody na słuszność jego bardziej dokładnego i rozważnego wykonania oraz interpretacji wyników.

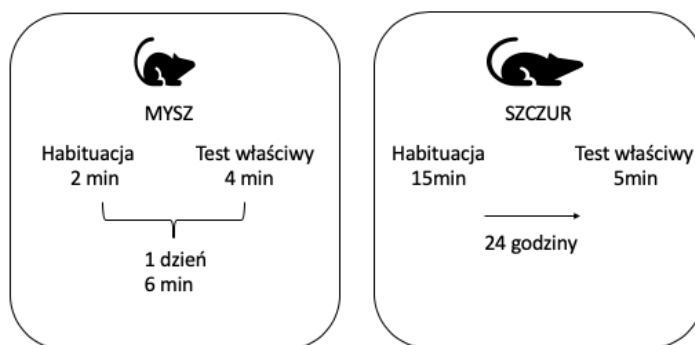
1. Wstęp

Test Porsolta, zwany również testem wymuszonego pływania (FST- ang. *forced swimming test*) lub testem zachowań rozpaczy został opracowany po raz pierwszy w 1977 roku przez nowozelandzkiego psychofarmakologa Rogera D. Porsolta (Porsolt i in. 1977). Działanie testu oparte jest na reakcji gryzoni, zarówno myszy jak i szczurów laboratoryjnych na zagrożenie utonięciem. Interpretowane jest to jako podatność na negatywny nastrój, czyli skłonność do zaburzeń depresyjnych. Pomimo ciągłego rozwoju nauki oraz powstawania coraz to nowszych metod badania zachowania depresyjnego, test wymuszonego pływania dalej z powodzeniem jest stosowany przez farmakologów, neurologów czy psychiatrów na całym świecie. Jego niebywałą zaletą jest ścisły związek ze stresem, który odgrywa kluczową rolę w tendencji do rozwoju depresji oraz prosta metoda przeprowadzenia całej procedury wraz z szybką analizą uzyskanych wyników (Yankelevitch-Yahav i in. 2015) Celem niniejszego artykułu jest podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat testu, a także jego potencjalnego wykorzystania przez badaczy.

2. Opis zagadnienia

Aparatura wykorzystywana w teście wymuszonego pływania nie jest skomplikowana. Stanowi ją bowiem jedynie szklany, przezroczysty cylinder o pojemności od 2 do 10 litrów, wypełniony wodą o temperaturze $23, 25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ oraz stoper. Prawdłowo wykonany test powinien być przeprowadzony jednocześnie w dwóch oddzielnych pomieszczeniach badawczych. Jedno z nich powinno służyć jako „poczekalnia” do trzymania zwierząt przed przystąpieniem do badania, drugie zaś do przeprowadzania procedury badawczej. W pokoju, gdzie będzie nieprzeprowadzane doświadczenie powinny znajdować się również czyste i suche klatki oraz lampy ciepłne i poduszki ciepłne dla zwierząt, które zakończyły procedurę badawczą, aby uniknąć hipotermii. Podczas przeprowadzania testu bardzo ważna jest ostrożność. Należy mieć na uwadze dobrobyt zwierząt i stale obserwować ich zachowanie. Gdy zwierzę będzie zbyt zmęczone lub nie będzie w stanie utrzymać się na powierzchni, natychmiast należy wyjąć je z wody i wyeliminować z doświadczenia. Przed przystąpieniem do badania, zwierzęta należy 30 minut wcześniej przetransportować do pomieszczenia „poczekalni” w celu zaznajomienia się z nowym środowiskiem (Yankelevitch-Yahav i in. 2015).

Prawdłowa procedura doświadczenia obejmuje fazę habituacji i fazę testu właściwego, które są różne dla szczurów i myszy (Rys.1).

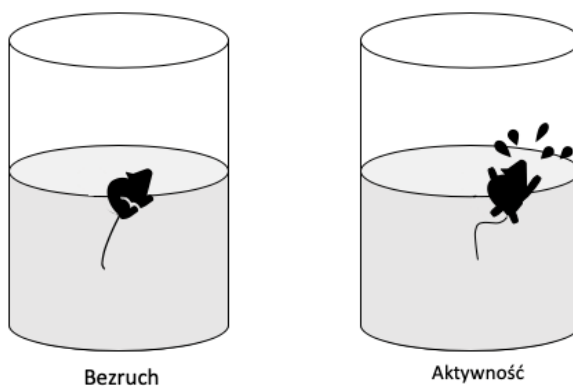


Rys. 1 Schemat przebiegu testu wymuszonego pływania u myszy i szczurów.

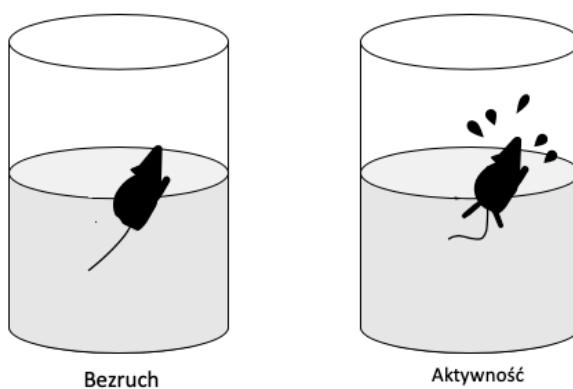
Dla myszy doświadczenie obejmuje jedną sesję, która trwa jedynie 6 minut i podzielona jest na fazę habituacji (pierwsze 2 minuty) oraz test właściwy (pozostałe 4 minuty). Doświadczenie rozpoczyna się od napełnienia szklanego cylindra o pojemności max 5 litrów wodą o temperaturze $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Naczynie powinno być wypełnione taką ilością wody, by zwierzę nie było w stanie dotknąć dna tylnymi łapami (Rys.2). W trakcie doświadczenia, za pomocą stoperów sumujących mierzy się łączny czas (w sekundach) bezruchu myszy. Za bezruch uznaje się stan zahamowania aktywności po wcześniejszych energicznych próbach wydostania się z naczynia, w którym zwierzę wykonuje tylko ruchy niezbędne do utrzymania się nad powierzchnią wody. Jest to tzw. pozycja semihoryzontalna. Czas bezruchu odpowiada poczuciu bezradności, które cechuje zachowania depresyjne. Im dłuższy czas bezruchu tym zwierzę wykazuje większe skłonności do zachowań depresyjnych w porównaniu do grupy kontrolnej (Porsolt i in. 1978). Po upływie 6 minut należy wyłączyć stoper, a mysz wyjąć z cylindra z wodą i przenieść do czystej suchej klatki, oświetlanej lampą oraz wyposażonej w poduszkę ciepłą. Należy pamiętać o zmianie wody po każdej, sesji celem eliminacji wrażeń węchowych (Yankelevitch-Yahav i in. 2015).

Dla szczurów procedura doświadczenia wygląda nieco inaczej. Badanie rozpoczyna się od fazy habituacji, trwającej 15 minut. Następnie, 24 godziny później przeprowadza się dopiero fazę testu właściwego, która trwa już tylko 5 minut. Aby szczury przyzwyczyły się do środowiska badawczego, należy je 30 minut przed rozpoczęciem fazy habituacji przenieść do pokoju

„poczekalni”. Szklane cylindry należy napełnić wodą o temperaturze 23 ± 1 °C w takiej ilości by badane zwierzę nie było w stanie sięgnąć dna tylnymi łapami. Podczas fazy habituacji zwierzę pozostawia się w cylindrze na 15 minut do swobodnego eksplorowania pojemnika, jednocześnie badacz nie rejestruje czasu bezruchu. Faza ta służy do zaznajomienia się zwierzęcia z nowymi warunkami i środowiskiem, co ma na celu wyeliminować zachowania lękowe podczas fazy testu właściwego. Po upływie 15 minut, szczura należy przenieść do suchej klatki z poduszką ciepłą, oświetlonej lampą. Następnego dnia, dokładnie 24 godziny później przeprowadza się fazę testu właściwego. Warunki przeprowadzania tej części doświadczenia są identyczne z występującymi podczas fazy habituacji poza czasem trwania. 30 minut przed rozpoczęciem testu należy pamiętać o przeniesieniu klatek macierzystych ze szczurami do pomieszczenia „poczekalni” i należy napełnić cylinder wodą o temperaturze 23 ± 1 °C w takiej ilości by badane zwierzę nie było w stanie sięgnąć dna tylnymi łapami (Rys. 3). Podczas trwania fazy testu właściwego, przez okres 5 minut należy prowadzić obserwacje badanych zwierząt i za pomocą stoperów sumujących mierzyć łączny czas bezruchu szczurów. Po zakończeniu testu należy wyłączyć stoper, a szczura wyjąć z cylindra z wodą i przenieść do czystej, suchej klatki wyposażonej w poduszkę ciepłą oraz oświetlonej lampą. Należy pamiętać o zmianie wody po każdej sesji, celem eliminacji wrażeń węchowych.



Rys. 2 Test wymuszonego pływania u myszy.



Rys. 3 Test wymuszonego pływania u szczurów.

Podczas fazy testu właściwego, zarówno w przypadku myszy jak i szczurów poza sumowaniem czasu bezruchu, mierzony może być dodatkowo: czas walki- czas wzmożonej aktywności zwierzęcia, szybkie ruchy kończyn przednich świadczące o chęci wydostania się z cylindra oraz czas pływania- gdy obserwowany jest czas ruchu zarówno kończyn przednich jak i tylnych w sposób zbliżony do wiosłowania (Yankelevitch-Yahav i in. 2015).

3. Przegląd literatury

Depresja jest poważną, zagrażającą życiu chorobą, która diagnozowana jest u coraz większej części społeczeństwa na całym świecie. Według światowej Organizacji Zdrowia (WHO- ang. *World Human Organization*) cierpi na nią obecnie ponad 264 milionów osób w każdym wieku. Depresja może spowodować, że osoba dotknięta chorobą bardzo cierpi i źle funkcjonuje w pracy, w szkole, w rodzinie i społeczeństwie, a w najgorszym przypadku może prowadzić do samobójstwa. Każdego roku umiera prawie 800 000 ludzi z powodu udanej próby samobójczej, a wśród 15-29-latków jest drugą najczęstszą przyczyną śmierci (James 2018). Depresja wiąże się z pewnego rodzaju niepełnosprawnością, obniżoną jakością życia, wzrostem kosztów zdrowotnych i jest uważana za główny czynnik ryzyka dla wielu chorób takich jak zaburzenia sercowo-naczyniowe, zaburzenia metaboliczne oraz neuropsychiatryczne (Cryan i in. 2005; Thase 2006). Obecne leczenie farmakologiczne ma ograniczoną skuteczność (Lam i Kennedy 2004; Dorfing i in. 2002) i związane jest z wieloma szkodliwymi skutkami ubocznymi. Dlatego kluczowe znaczenie ma lepsze zrozumienie patofizjologii tej choroby oraz opracowanie innowacyjnych i ulepszonych metod leczenia. Istnieje wiele modeli zwierzęcych służących do badania depresji takich jak: test preferencji sacharozy (ang. *sucrose preference test*) czy test zawieszenia ogona (ang. *tail suspension test*). Jednak jednym z najczęściej stosowanych obecnie testów przez badaczy na całym świecie jest test wymuszonego pływania.

Test Porsolta oparty jest na założeniu, że bezruch odzwierciedla rozpacz, bezgraniczną bezradność i porzucenie nadziei, które są charakterystycznymi i nieodłącznymi objawami depresji. Zwierzę świadomie poddaje się i przestaje walczyć o wydostanie się ze szklanego cylindra, jednocześnie akceptując i godząc się na utonięcie. Okres bezruchu następuje zawsze po okresie wzmożonej aktywności. Ma to bezsprzeczne odzwierciedlenie u ludzi cierpiących na depresję, którzy zmagając się z chorobą nie widzą szansy na wyleczenie i zmianę dotychczasowego życia (Cryan i in. 2005).

Pomimo wielu niebywałych zalet takich jak: łatwość wykonania testu, brak konieczności posiadania profesjonalnej, drogiej aparatury, proste dane do analizy i oceny statystycznej oraz wrażliwość na szeroki zakres stosowanych w teście leków przeciwdepresyjnych co czyni go dobrym testem przesiewowym, test wymuszonego pływania wciąż wzbudza wiele kontrowersji wśród badaczy i stawia pod znakiem zapytania słuszność jego użycia w porównaniu do pozostałych dostępnych testów behawioralnych.

Pierwszym problemem, z którym należy się zmierzyć podczas interpretacji wyników jest fakt, że stan bezruchu (unieruchomienia) obserwowany podczas testu może wynikać z rodzaju depresji, a mianowicie z tzw. depresji z upośledzeniem psychoruchowym (Dulawa i in. 2004), której cechą charakterystyczną jest obniżona aktywność i apatia. Jeżeli taki rodzaj depresji występuje u badanego zwierzęcia, interpretacja wyników jest utrudniona i nasuwa wiele pytań oraz wątpliwości, a analizowane wyniki nie mogą być przedstawiane w porównaniu do grup bez tego rodzaju depresji.

Kolejnym często dyskutowanym zagadnieniem jest dokładne zrozumienie i zauważenie stanu bezruchu przez obserwatora. Po trwającej kilka minut wzmożonej aktywności zwierzęcia zazwyczaj następuje unieruchomienie, jednak nie jest nigdy tak, że trwa ono już do końca sesji badawczej. Bowiem zwierzę wykonuje ciąg różnych ruchów naprzemiennie z chwilami bezruchu. Dla badacza niezbędne jest więc odróżnienie stanu unieruchomienia od zwykłej niechęci lub niezdolności gryzonia do utrzymania się na powierzchni wody lub zachowania pasywnego, oszczędzającego energię przed ponowną próbą ucieczki (Cryan i in. 2004). W przypadku badania szczurów należy mieć również na uwadze fakt, iż są one ponownie umieszczane w wodzie (pierwszy raz był podczas fazy habituacji), a pasywne zachowanie to swego rodzaju wyuczony proces, gdyż najlepszym rozwiązaniem jest pozostanie w bezruchu i spokojne czekanie na wyciągnięcie z wody

przez badacza. Istotna jest więc uważna obserwacja i sumienne, jednolite dla wszystkich badanych zwierząt zrozumienie i rozróżnienie stanu bezruchu lub użycie specjalistycznego oprogramowania, które w zupełności wyeliminuje błędy oraz stronniczość obserwatora (Gersner i in. 2009).

Na stan bezruchu w teście wymuszonego pływania mogą wpływać również dodatkowo występujące schorzenia, charakteryzujące się zwiększoną predyspozycją do depresji, takie jak wczesna ekspozycja na stres (Bielajew i in. 2003; Fujisaki 2003), kliniczna cukrzyca (Gomez i in. 2003) czy ostre odstawienie leku (Cryan i in. 2003).

Często pomijającym, a istotnym w interpretacji wyników jest również stan aktywności zwierzęcia, aktywność rozumiana zarówno jako walka jak i pływanie. Ma to niebywałe znaczenie, gdyż wiele leków przeciwdepresyjnych przez swój wpływ na przekąźnictwo serotonergiczne powoduje pobudzenie psychoruchowe i wydłuża czas pływania zwierząt. Ponadto zauważono, że leki zwiększające neurotransmisję katecholamin znacznie wydłużają czas bezruchu, przy jednoczesnym braku zwiększonej produkcji hormonów stresu. Potwierdza to teorię o wyuczonym bezruchu (Chaki i in. 2004). W związku z powyższym wskazane jest przeprowadzenie dodatkowo badań aktywności lokomotorycznej badanych zwierząt w celu ustalenia czy wrodzona aktywność nie jest czynnikiem decydującym w tym modelu (Hemby i in. 1997).

4. Podsumowanie

Test wymuszonego pływania jest powszechnie stosowanym testem przez licznych badaczy, ze względu na łatwe i niedrogi wykonanie. Jednak obarczony jest szeregiem możliwych błędów, a interpretacja wyników nie jest tak prosta jaka wydaje się być z pozoru. Stan emocjonalny umysłu oraz stan fizyczny są ze sobą ściśle powiązane. Szereg testów behawioralnych stosowanych w neurofarmakologii zależy od pomiarów aktywności fizycznej i ich odpowiedniej interpretacji. Staranna obserwacja i analiza są więc niezbędne. Niestety, podczas testu Porsolta bardzo łatwo nadinterpretować stan bezruchu i tym samym nadinterpretować stan depresyjny.

Pomimo wielu zalet test wymuszonego pływania nie jest samodzielnym testem schorzeń neurologicznych. Jest on raczej ciekawym i unikalnym testem, zapewniającym wgląd w sieci neuronowe, które to koordynują reakcję behawioralną na ostre nieuniknione wyzwanie, które mogą być uszkodzone zarówno w depresji, spektrum zaburzeń autystycznych jak i innych zaburzeniach. Mierzy on bowiem strategię radzenia sobie z ostrym stresem, a strategia ta jest niezbędna do zrozumienia depresji oraz mechanizmów działania leków przeciwdepresyjnych.

5. Piśmiennictwo

- Bielajew C, Konkle ATM, Kentner AC i in. (2003) Strain and gender specific effects in the forced swim test: effects of previous stress exposure. *Stress* 6(4): 269-280.
- Chaki S, Yoshikawa R, Hirota, S i in. (2004) MGS0039: a potent and selective group II metabotropic glutamate receptor antagonist with antidepressant-like activity. *Neuropharmacology* 46(4): 457-467.
- Commons KG, Cholanians AB, Babb JA i in (2017) The rodent forced swim test measures stress-coping strategy, not depression-like behavior. *ACS chemical neuroscience* 8(5): 955-960.
- Cryan JF, Holmes A (2005). Model organisms: the ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nature reviews Drug discovery* 4(9): 775.
- Cryan JF, Hoyer D, Markou A (2003) Withdrawal from chronic amphetamine induces depressive-like behavioral effects in rodents. *Biological psychiatry* 54(1): 49-58.
- Cryan JF, Mombereau C (2004) In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular psychiatry* 9(4): 326.
- Dording CM, Mischoulon D, Petersen TJ i in. (2002) The pharmacologic management of SSRI-induced side effects: a survey of psychiatrists. *Annals of Clinical Psychiatry* 14(3): 143-147.
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B i in. (2004) Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29(7): 1321.

- Fujisaki C, Utsuyama M, Kuroda Y i in. (2003) An immunosuppressive drug, cyclosporine-A acts like anti-depressant for rats under unpredictable chronic stress. *Journal of medical and dental sciences* 50(1): 93-100.
- Gersner R, Gordon-Kiwkowitz M, Zangen A (2009). Automated behavioral analysis of limbs' activity in the forced swim test. *Journal of neuroscience methods* 180(1): 82-86.
- Gomez R, Vargas CR, Wajner M i in (2003) Lower in vivo brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. *Brain research* 968(2): 281-284.
- Hemby SE, Lucki I, Gatto G i in. (1997) Potential antidepressant effects of novel tropane compounds, selective for serotonin or dopamine transporters. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 282(2): 727-733.
- James SL, Abate D, Abate KH i in. (2018) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392 (10159):1789-1858.
- Lam RW, Kennedy SH (2004) Evidence-based strategies for achieving and sustaining full remission in depression: focus on metaanalyses. *Canadian journal of psychiatry* 49(1): 17-26.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N i in. (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European journal of pharmacology*: 379-391.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre ML (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730.
- Thase ME (2006) Managing depressive and anxiety disorders with escitalopram. *Expert opinion on pharmacotherapy* 7(4): 429-440.
- Yankelevitch-Yahav R, Franko M, Huly A i in. (2015) The forced swim test as a model of depressive-like behavior. *Journal of Visualized Experiments* 97: 525-587.