

Wybrane zagadnienia z zakresu chemii, biologii i fizyki

Wybrane zagadnienia z zakresu chemii, biologii i fizyki

Redakcja:
Beata Zdunek
Monika Olszówka

Lublin 2016

Recenzenci:

- prof. zw. dr hab. Anna Goździcka-Józefiak
- prof. dr hab. Irena Malinowska
- prof. dr hab. Bożena Jasińska
- prof. Zbigniew Dąbrowski
- dr hab. Małgorzata Łobocka
- dr hab. Mirosława Chwil
- dr Beata Kołodziej
- dr Mariola Janiszewska
- dr Agata Bartyzel
- dr Agnieszka Bartoszek
- dr Maciej Małyk
- dr Wojciech Radzki

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Sandra Czarniecka

Projekt okładki:
Paulina Szymczyk

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o. o.

ISBN 978-83-65598-37-0

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o. o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

<i>Anna Kuźniar, Urszula Maciołek, Jan Kalembkiewicz, Małgorzata Kosińska</i> Synteza kwercetyno-5'-sulfonianu arsenu(III) jako potencjalnego produktu detoksykacji.....	7
<i>Barbara Laskowska, Marek Laskowski, Anna Lewandowska, Tomasz Ruman</i> Zasady Schiffa oparte o związki dendrymeryczne oraz ich zastosowanie.....	21
<i>Mateusz Koziel</i> Wykorzystanie pakietu Geant4 w szeroko pojętej fizyce jądrowej.....	32
<i>Katarzyna Giermasińska, Małgorzata Łobocka</i> Interakcje bakteriofaga P1 z komórkami wybranych patogenów roślin z rodzaju <i>Erwinia</i> i rodzajów pokrewnych.....	48
<i>Marcin Skowronek, Ewa Sajnaga, Waldemar Kazimierczak, Adrian Wiater</i> Charakterystyka bakterii z rodzaju <i>Xenorhabdus</i>	68
<i>Agnieszka Półtorak</i> Gospodarka wodno-ściekowa i odpadowa w gminie Łapy.....	84
<i>Renata Stanisławczyk, Marian Gil, Mariusz Rudy</i> Bioakumulacja metali ciężkich w rybach.....	92
<i>Izabela Podgórska</i> Identyfikacja grzybów z rodzaju <i>Fusarium</i> izolowanych z materiału roślinnego	111
<i>Kamil Myszczyński, Tomasz Molcan, Łukasz Paukšto, Jan Paweł Jastrzębski</i> Przegląd wybranych metod sekwencjonowania wysokoprzepustowego: przebieg analiz i zastosowań.....	122
<i>Beata Kocyan, Anna Knapik, Martyna Kozłowska</i> Zastosowanie metod chromatograficznych w analizie zawartości substancji psychoaktywnych w próbkach moczu, krwi i płynu z jamy ustnej.....	141
<i>Joanna Karpińska, Urszula Kotowska, Justyna Kapelewska</i> Pułapki ilościowego oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych	151
<i>Anika Szady, Sylwia Pasieczna-Patkowska</i> Ciecze jonowe – rozpuszczalniki XXI wieku.....	164
<i>Jakub Rupniewski</i> Optymalizacja warunków pracy pasa zębatego ze względu na parametry fizyczne elementu podatnego napinacza.....	175
<i>Klaudia Gustaw, Adam Waśko</i> Wykorzystanie metody DArT do identyfikacji sekwencji specyficznych rodzaju <i>Avena</i>	191
Indeks autorów.....	206

Anna Kuźniar¹, Urszula Maciołek², Jan Kalembkiewicz³,
Małgorzata Kosińska⁴

Synteza kwercetyno-5'-sulfonianu arsenu(III) jako potencjalnego produktu detoksykacji

1. Wstęp

Arsen jest pierwiastkiem szeroko rozpowszechnionym w środowisku człowieka. Dzielne wchłanianie tego pierwiastka przez organizm waha się w granicach 10-370 µg i związane jest z obecnością arsenu w wodzie pitnej oraz w żywności [1].

Związki arsenu były stosowane od dawna jako barwniki w kosmetyce i do barwienia tkanin. Obecnie znajdują one zastosowanie m. in. jako środki konserwujące drewno, w produkcji szkła, barwników i w procesach oczyszczania gazów przemysłowych. Arsen jest dodawany do stopów jako środek zwiększający twardość i żaroodporność. Pierwiastek ten wchodzi w skład środków owadobójczych i fungicydów używanych w ogrodnictwie i sadownictwie, co sprzyja jego wchłanianiu przez człowieka. Poza tym organiczne związki arsenu(III) były stosowane w medycynie w leczeniu kiły i chorób tropikalnych powodowanych przez ameby, pełzaki zimnicy i świdorowce [2].

Szacuje się, że trująca dawka arsenu dla człowieka w przeliczeniu na jednorazową ilość tlenku arsenu(III) – arseniku – wynosi 0,05 g, a dawka śmiertelna 0,2-0,3 g As₂O₃. Arsenik i inne trójwartościowe sole arsenu łączą się łatwo z grupami tiolowymi (-SH), tworząc nieczynne biologiczne połączenia z glutationem, cysteiną i innymi enzymami białkowymi, uniemożliwiając tym samym syntezę ważnych dla życia substancji. Arsen wchłaniany do organizmu może pobudzać rozrost tkanek, powodować ich przemiany patologiczne w tkankę nowotworową (rak płuc i skóry) oraz szybkie rogowacenie skóry i martwicę. Arsen wiąże się z hemoglobina powodując hemolizę i objawy niedokrwistości, a następnie porażenie

¹ akuzniar@prz.edu.pl, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, <http://chemia.prz.edu.pl/wydzial/jednostki-organizacyjne/zcnia/>

² umaciolek@prz.edu.pl, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, <http://chemia.prz.edu.pl/wydzial/jednostki-organizacyjne/zcnia/>

³ kalembic@prz.edu.pl, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, <http://chemia.prz.edu.pl/wydzial/jednostki-organizacyjne/zcnia/>

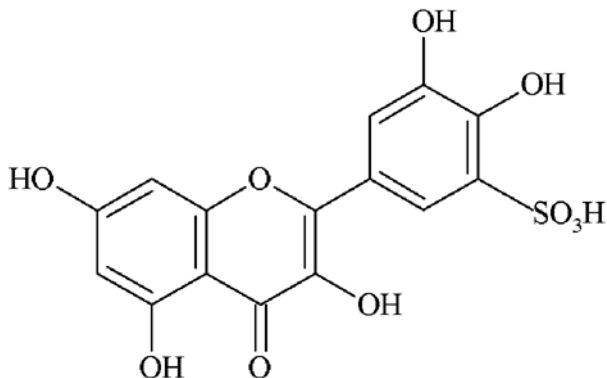
⁴ mkosinska@prz.edu.pl, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, <http://chemia.prz.edu.pl/wydzial/jednostki-organizacyjne/zcnia/>

nerwów, mięśni i uszkodzenie narządów wewnętrznych. Arsen(V) prawdopodobnie może zastępować fosfor w DNA powodując osłabienie chromosomów, co tłumaczy jego genotoksyczność [3].

Objawami ostrego zatrucia arsenem są silne bóle przewodu pokarmowego i głowy, mdłości, biegunka, utrata przytomności, spadek ciśnienia krwi, porażenie mięśnia sercowego, a w sytuacjach krytycznych – śmierć z objawami zapaści i porażenia oddechu. W zatruciach przewlekłych główne symptomy to zaburzenia czuciowe i ruchowe, zapalenie spojówek oczu i oddechowych błon śluzowych (niszczenie przegrody nosowej) oraz zmiany skórne (rak arsenowy), wypadanie włosów, kruchość paznokci i zmiany w postaci poprzecznych białych plam [1, 2, 4, 5].

Wypadki zatruc metalami, w tym także arsenem, związane są głównie z działalnością człowieka [6]. Podczas ratowania osób zatrutych metalami podaje się jako odtrutki m.in. substancje tworzące chelaty z metalami (EDTA, BAL, antidotum metallorum) [1]. Związek EDTA (CaNa_2edta) jest antidotum na ołów, beryl oraz kadm, natomiast BAL (British anti-lewisite, 2,3-dimerkaptopropanol) jest odtrutką na arsen, rtęć, złoto, antymon, bizmut, miedź, chrom, nikiel, kobalt, cynk i ołów. Wymienione odczynniki chelatujące są toksyczne dla organizmu ludzkiego.

Poszukiwania nowych odtrutek na metale ciężkie, które mogłyby być bezpiecznie wprowadzane do ustroju, zwracają uwagę na niektóre flawonoidy i ich pochodne, w tym QSA (rys. 1). Kwas kwercetyno-5'-sulfonowy (QSA) charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie i niską toksycznością, ponadto tworzy trwałe związki, w tym kompleksowe, w stanie stałym z jednoczesnym unieczynnieniem jonów metali ciężkich. Należy oczekiwać podobnego zachowania QSA względem jonów As(III) – na temat tego typu połączeń nie ma szczegółowych danych literaturowych.



Rysunek 1. Wzór strukturalny kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego (QSA)

2. Cel pracy

W pracy otrzymano nowe, dotąd nieopisane w literaturze, stałe związki jonów arsenu(III) z kwasem kwercetyno-5'-sulfonowym (QSA) wytrącone z roztworów wodnych. Skład i właściwości osadów zbadano z zastosowaniem analizy elementarnej, spektrofotometrycznego oznaczenia zawartości metalu, grawimetrycznego oznaczenia zawartości wody, wagowego oznaczenia rozpuszczalności w wodzie, analizy termogravimetrycznej w atmosferze powietrza, spektroskopii UV-VIS i FT-IR.

3. Materiały

Wszystkie wykorzystane w badaniach odczynniki i rozpuszczalniki były dostępne w handlu. Charakterystyka użytych odczynników: tlenek arsenu(III), As_2O_3 , cz.d.a., Fluka; kwas azotowy(V), HNO_3 , cz.d.a., $d = 1,38 \text{ g/cm}^3$, POCh; kwas octowy, CH_3COOH , cz.d.a., $d = 1,05 \text{ g/cm}^3$, POCh; kwas siarkowy(VI), H_2SO_4 , cz.d.a., $d = 1,84 \text{ g/cm}^3$, POCh; kwas solny, HCl , cz.d.a., $d = 1,19 \text{ g/cm}^3$, POCh; wodorotlenek sodu, $NaOH$, cz.d.a., POCh; chlorek glinu, $AlCl_3$, cz.d.a., POCh; paramolibdenian amonu, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, cz.d.a., MERCK; siarczan hydrazyny, $N_2H_6SO_4$, cz.d.a., MERCK; kwercetyna, $C_{15}H_{10}O_7$, cz.d.a., CHEMAPOL; n-butanol do HPLC, POCh.

3.1. Synteza kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego (QSA)

Syntezę QSA przeprowadzono według metody opisanej w pracy [7]. Do kolby o pojemności 100 cm^3 odważono 10 g kwercetyny i dodano 40 cm^3 stężonego kwasu siarkowego(VI). Kolbę umieszczono w łaźni wodnej i termostatowano w temperaturze 80°C przez 2 godz. intensywnie mieszając. Po ostudzeniu mieszaniny do temperatury pokojowej, dodano ciągle mieszając 50 cm^3 wody destylowanej. Wytrącony pomarańczowo-czerwony osad oddzielono przez odwirowanie i 3-krotnie krystalizowano z nasyconych wodnych roztworów otrzymanych przez rozpuszczenie osadu w temperaturze 70°C . Wytrącony osad podczas krystalizacji miał barwę żółtą, a po wysuszeniu na powietrzu i rozdrobnieniu barwę pomarańczowo-czerwoną. Wydajność syntezy wynosiła 80%.

Czystość otrzymanego związku sprawdzono metodą cienkowarstwowej chromatografii żelowej na płytkach aluminiowych pokrytych warstwą adsorbentu (żel krzemionkowy 60 WF254s, firmy MERCK) [8]. Jako układ rozwijający zastosowano roztwór o składzie: n-butanol – kwas octowy – woda w stosunku objętościowym 4:1:5, przygotowany według przepisu z pracy [9]. Składniki układu zmieszano na 3 dni przed wykonaniem oznaczenia, tak przygotowana mieszanina jest trwała przez 14 dni. Do badań sporządzono 0,1% n-butanolowe roztwory kwercetyny i QSA. Przed

naniesieniem substancji badanych, płytki żelowe kondycjonowano w atmosferze układu rozwijającego w komorze chromatograficznej wyłożonej bibułą nasączoną mieszaniną rozwijającą. Chromatogramy rozwijano metodą wstępującą. Wywoływanie prowadzono spryskując płytki 1% roztworem chłorku glinu.

Wartości współczynnika R_f wyznaczono korzystając ze wzoru:

$$R_f = \frac{A}{B} \quad (1)$$

gdzie: R_f – względna odległość środka plamki, A – odległość środka plamki od linii startu, B – odległość czoła fazy ruchomej od linii startu.

Uzyskano dobry rozdział wzorcowej mieszaniny kwercetyny i QSA w zastosowanych warunkach. Dla otrzymanego kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego stwierdzono obecność jednego produktu (QSA), natomiast nie stwierdzono obecności nieprzereagowanej kwercetyny. Wartości współczynników R_f dla pojedynczych substancji jak i w mieszaninie wynosiły odpowiednio 0,80 w przypadku kwercetyny i 0,35 w przypadku QSA.

Skład sumaryczny produktu wyznaczono na podstawie analizy elementarnej na zawartość C, H, S; ilość wody krystalizacyjnej wyznaczono metodą wagową (suszenie próbki w 120°C do stałej masy) i derywatograficzną (tabela 1).

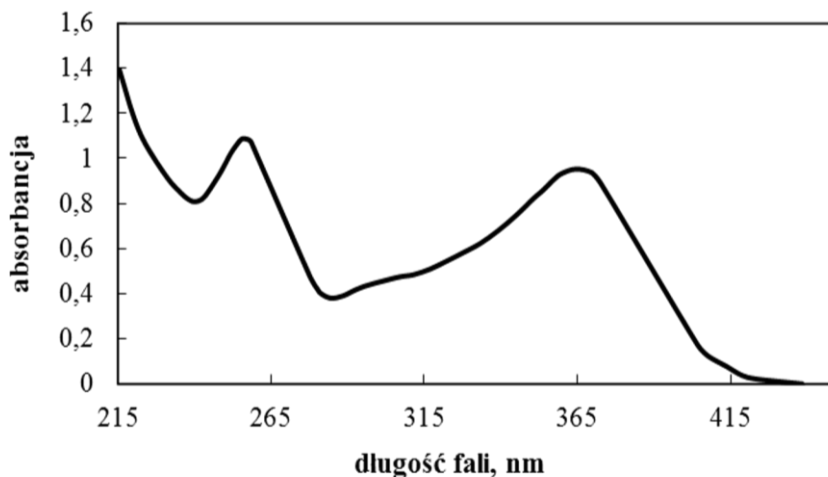
Tabela 1. Wyniki analizy elementarnej i charakterystyka spektrofotometryczna kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego (QSA)

QSA, C ₁₅ H ₁₀ O ₁₀ S·5H ₂ O; M = 472,365 g/mol			
	Symbol pierwiastka lub cząsteczki	Obliczony skład, %	Wyznaczony skład, %
Analiza elementarna	C	38,14	38,30
	H	4,27	4,17
	S	6,79	6,81
	H ₂ O	19,07	19,28
Charakterystyka spektrofotometryczna	Wielkości wyznaczone		Dane literaturowe [7]
	$\lambda_I = 366 \text{ nm}$ ($\epsilon = 19 \text{ 300}$),		$\lambda_I = 367 \text{ nm}$ ($\epsilon = 19 \text{ 500}$),
	$\lambda_{II} = 257 \text{ nm}$ ($\epsilon = 22 \text{ 200}$),		$\lambda_{II} = 257 \text{ nm}$ ($\epsilon = 22 \text{ 400}$),

Źródło: Opracowanie własne

Elektronowe widmo absorpcyjne QSA w wodzie wykonano na spektrofotometrze Beckman DU-640 w zakresie 200-800 nm (rys. 2). Charakterystykę spektrofotometryczną QSA przedstawiono w tabeli 1;

pasma I i II związane są z przejściami elektronowymi $\pi-\pi^*$ w cząsteczce kwasu. Położenie pasm i wartości molowych współczynników absorpcji są zgodne z danymi literaturowymi [7].



Rysunek 2. Widmo absorpcyjne QSA w wodzie, $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ [opracowanie własne]

Otrzymane wyniki potwierdzają, że produktem sulfonowania kwercetyny w podanych warunkach był kwas kwercetyno-5'-sulfonowy, QSA, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_{10}\text{S} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

3.2. Synteza i badanie składu związków jonów As(III) z QSA

3.2.1. Przygotowanie roztworów wyjściowych

Roztwór wyjściowy jonu metalu o stężeniu $1 \cdot 10^{-1} \text{ mol/dm}^3$ otrzymano przez sporządzenie odpowiedniej odważki tlenku arsenu(III) (As_2O_3).

Odważkę tlenku arsenu(III) rozpuszczono w roztworze NaOH o stężeniu 2 mol/dm^3 , rozcieńczono nieco wodą redestylowaną i zakwaszono 2 mol/dm^3 HCl.

Roztwór QSA o stężeniu $0,05 \text{ mol/dm}^3$ otrzymano przez sporządzenie odpowiedniej odważki QSA, którą rozpuszczono w wodzie redestylowanej.

3.2.2. Synteza związków

Syntezę przeprowadzono w dwóch układach. W pierwszym utrzymywano nadmiar jonów metalu w stosunku do liganda, a stosunek liczby moli arsenu do QSA wynosił 3:1, natomiast w drugim układzie stosunek liczby moli metalu do liganda wynosił 1:3.

W tym celu zmieszano odpowiednią objętość wyjściowego roztworu metalu o temperaturze pokojowej z określoną objętością roztworu QSA ogrzanego do temperatury 70°C. Nadmiar jednego z reagentów utrzymywano w ten sposób, że do jego roztworu dodawano kroplami drugi reagent, ciągle mieszając roztwór. pH mieszanin od 1,1 do 1,3 ustalano na pH-metrze za pomocą roztworów NaOH i HNO₃ o stężeniach 0,10 i 0,01 mol/dm³. Po ok. 30 min wytrącały się żółte, gąbczaste osady, które po upływie 3 godz. odsączano i przemywano kilkakrotnie wodą redestylowaną. Otrzymane osady suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej. Warunki i wydajności syntez podano w tabeli 2. Wydajność syntezy obliczono ze wzoru:

$$\eta = \frac{m_{otrz}}{m_{obl}} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie: η – wydajność syntezy, %, m_{otrz} – masa otrzymanego produktu, g, m_{obl} – masa produktu obliczona w reakcji syntezy ze 100% wydajnością, g.

Tabela 2. Warunki i wydajności syntez związków QSA z jonami As(III) (c_{As} i c_L - stężenia molowe odpowiednio kationu metalu i QSA)

Badany układ	Warunki syntezy		Barwa osadu po wysuszeniu	Wydajność syntezy, %
	$c_{As} : c_L$	pH		
As(III)-QSA	1:3	1,3	żółta	62,1
	3:1	1,1	żółta	89,7

Źródło: Opracowanie własne

3.2.3. Badania składu

Zawartość C, H, S w badanych związkach oznaczono za pomocą aparatu do mikroanalizy elementarnej Carbo Erba EA-1108. Zawartość wody krystalizacyjnej oznaczono metodą wagową (suszenie próbek w temp. 120°C) i derywatograficzną. Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 3.

Zawartość arsenu w związkach wyznaczono metodą spektrofotometryczną za pomocą błękitu arsenomolibdenowego, z wykorzystaniem krzywej wzorcowej [10].

W tym celu sporządzono roztwór wzorcowy jonów As(III) o stężeniu 1 mg/cm³, rozpuszczając odważkę 1,3200 g As₂O₃ w 20 cm³ 2 mol/dm³ roztworu NaOH. Następnie dodano 50 cm³ wody redestylowanej, słabo zakwaszono 2 mol/dm³ roztworem HCl i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 1 dm³.

Roztwór roboczy o stężeniu $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ sporządzono przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego.

Odczynnik molibdenowy przygotowano przez rozpuszczenie:

- 1,00 g paramolibdenianu amonu w 100 cm^3 $2 \text{ mol}/\text{dm}^3$ H_2SO_4 ;
- 0,10 g siarczanu hydrazyny w 100 cm^3 wody redestylowanej.

Przed użyciem zmieszano $10,0 \text{ cm}^3$ roztworu (a) z $10,0 \text{ cm}^3$ roztworu (b) i rozcieńczono wodą redestylowaną do 100 cm^3 . Roztworów (a) i (b) nie przechowywano dłużej niż 3 dni.

Wyznaczanie krzywej wzorcowej

Do zlewek o pojemności 25 cm^3 odmierzone kolejno 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 i $5,0 \text{ cm}^3$ roztworu roboczego, dodano po 10 cm^3 stężonego kwasu azotowego(V) i odparowano do sucha. Następnie dodano 20 cm^3 odczynnika molibdenowego, wymieszano i wstawiono każdą zlewkę do wrzącej łaźni wodnej na 10 min. Ostudzony roztwór przeniesiono do kolbki miarowej o pojemności 25 cm^3 i rozcieńczono wodą redestylowaną do kreski. Pomiar absorpcji wykonano przy długości fali $\lambda = 730 \text{ nm}$ względem wody jako odnośnika i grubości warstwy $l = 1 \text{ cm}$. Wartość absorpcji każdego punktu na krzywej wzorcowej jest wartością średnią z trzech pomiarów. Zależność $A = f(c_{\text{As}})$ wyrażona jest wzorem:

$$A = 0,00590c_{\text{As}} - 0,0900 \quad (3)$$

gdzie: A – zmierzona absorpcja roztworu, c_{As} – stężenie roztworu arsenu, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Współczynniki równania regresji wyznaczono metodą najmniejszych kwadratów ze współczynnikiem determinacji $R^2 = 0,9940$ korzystając z wbudowanych funkcji statystycznych programu Excel z pakietu Microsoft Office 2000 Standard.

W celu oznaczenia zawartości arsenu odważki związków o masie $0,0500 \text{ g}$ mineralizowano w stężonym kwasie azotowym(V), w zestawie do mineralizacji złożonym z mineralizatora DK 6 z systemem do mineralizacji przeznaczonym do oznaczania śladowych ilości metali ciężkich – model TMD 6 firmy VELP. W każdym przypadku odparowano nadmiar kwasu i przeniesiono pozostałości do kolbek miarowych o pojemności 100 cm^3 , uzupełniając wodą redestylowaną do kreski.

Z tak przygotowanych roztworów pobrano określone objętości do zlewek o pojemności 25 cm^3 . Dalsze oznaczanie prowadzono jak wyżej (wyznaczanie krzywej wzorcowej). Dla każdego związku oznaczenie metalu przeprowadzono 3-krotnie. Na podstawie zmierzonych wartości absorpcji obliczono z równania krzywej wzorcowej stężenie metalu w $\mu\text{g}/\text{cm}^3$. Zawartość procentową metalu obliczono ze wzoru (4). Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli 3.

$$\%M = \frac{m}{a} \cdot 100\% \quad (4)$$

gdzie: %M – zawartość procentowa metalu, m – masa metalu, µg, a – odważka badanego związku, µg.

Tabela 3. Wyniki analizy elementarnej związków jonów As(III) z QSA (o – obliczone, w – wyznaczone)

Wzór związku M, g/mol (warunki doświadczalne)		Skład procentowy				
		C	H	S	As	H ₂ O
As(C ₁₅ H ₉ O ₁₀ S) ₃ ·12H ₂ O M = 1435,00 (c _{As} :c _L = 1:3)	o	37,66	3,58	6,70	5,22	15,07
	w	37,90	3,57	6,67	5,38	15,57
As(C ₁₅ H ₉ O ₁₀ S) ₃ ·12H ₂ O M = 1435,00 (c _{As} :c _L = 3:1)	o	37,66	3,58	6,70	5,22	15,07
	w	37,70	3,54	6,65	5,38	15,17

Źródło: Opracowanie własne

3.2.4. Badania termogravimetryczne

Badania wykonano na derywatografie OD-102, system F. Paulik-J. Paulik-L. Erdey w atmosferze powietrza w następujących warunkach: czułość TG – 100 mg, temperatura 20-1000°C, DTA – 1/15, DTG – 1/5, czas 100 min. Wyniki rozkładu związku podano w tabeli 4.

3.2.5. Badanie rozpuszczalności w wodzie

Badania rozpuszczalności w wodzie wykonano w temperaturze 20 i 36°C ± 1°. W tym celu określoną odważkę badanej substancji termostawiano w ściśle określonej objętości wody redestylowanej w czasie 12 godz., ciągle mieszając. Po tym czasie mieszaninę przesączono na lejku ze spiekim szklanym G-5 i masę pozostałości określono metodą wagową. Przesącz odparowano w temp. 50°C, a pozostałość zważono. Na podstawie wykonanych pomiarów wyznaczono wartości rozpuszczalności, które zestawiono w tabeli 5.

Tabela 4. Wyniki analizy termogravimetrycznej $\text{As}(\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_{10}\text{S})_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Δt_1 , Δt_2 , – zakres temperatur odpowiadający procesowi dehydratacji związku (rozkładu bezwodnego związku), t_{\min}^{DTA} – temperatura odpowiadająca minimum na krzywej DTA, t_{\min}^{DTG} – temperatura odpowiadająca minimum na krzywej DTG, t_k – temperatura tworzenia końcowego produktu rozkładu)

Δt_1 , °C	20-150
DTA t_{\min}	150
DTG t_{\min}	140
Δt_2 , °C	150-795
t_k , °C	795
% ubytku masy związany z dehydratacją	obliczony – 15,1
	wyznaczony – 15,0
$n\text{H}_2\text{O}$	12
% pozostałości	obliczony – 9,2
	wyznaczony – 9,5
proponowany końcowy produkt rozkładu	As_2S_3

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 5. Rozpuszczalność związku As(III) z QSA w wodzie

Związek	Rozpuszczalność w $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$		Rozpuszczalność w $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$	
	x , g/100 cm^3 H_2O	c , mol/ dm^3	x , g/100 cm^3 H_2O	c , mol/ dm^3
$\text{As}(\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_{10}\text{S})_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$4,89 \cdot 10^{-2}$	$3,41 \cdot 10^{-4}$	$6,50 \cdot 10^{-2}$	$4,53 \cdot 10^{-4}$

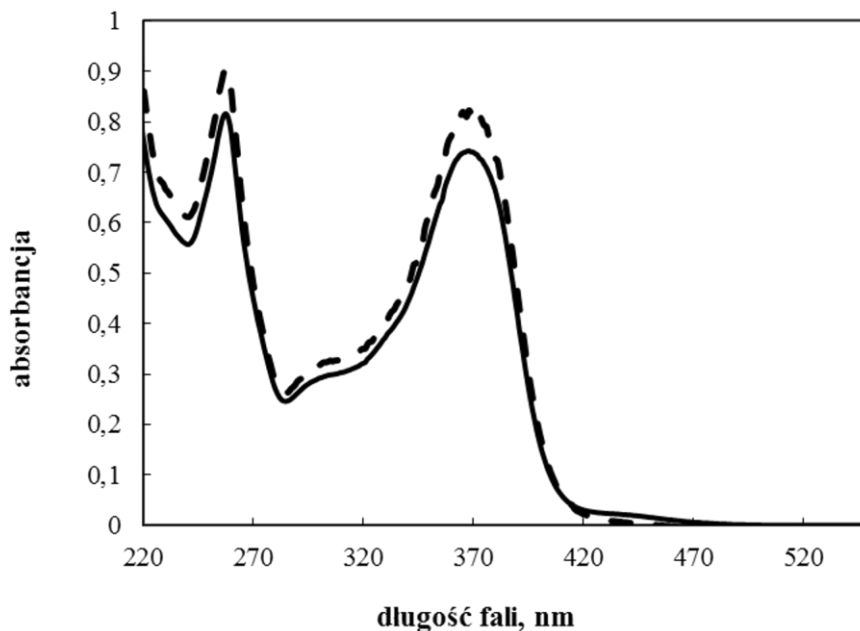
Źródło: Opracowanie własne

3.3. Badanie budowy związków jonów As(III) z QSA

3.3.1. Widma absorpcyjne w nadfiolecie i zakresie widzialnym

Wykonano widma absorpcyjne w nadfiolecie i zakresie widzialnym QSA i jego związków z jonami As(III) w roztworach metanolowych (rys. 3). Roztwory przygotowano przez rozpuszczenie odważek związków o masie 2 mg w 100 cm³ metanolu (do spektroskopii).

Położenie pasm absorpcyjnych zestawiono w tabeli 6.



Rysunek 3. Widma absorpcyjne w zakresie nadfioletu i widzialnym metanolowych roztworów QSA (—, $c = 4,23 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) i As(C₁₅H₉O₁₀S)₃·12H₂O (- - , $c = 1,48 \cdot 10^{-5}$ mol/dm³) [opracowanie własne]

Tabela 6. Położenie pasm absorpcyjnych w zakresie widzialnym i nadfiolecie metanolowych roztworów QSA i As(C₁₅H₉O₁₀S)₃·12H₂O

Związek	Długość fali, nm (ϵ , m ² /mol)	
	Pasmo I	Pasmo II
QSA	368 (2190)	258 (2440)
As(C ₁₅ H ₉ O ₁₀ S) ₃ ·12H ₂ O	368 (1960)	258 (2140)

Źródło: Opracowanie własne

3.3.2. Widma w podczerwieni

Widma w podczerwieni w tabletkach KBr wykonano na spektrofotometrze FT-IR Paragon 100 dla QSA oraz jego związków z jonami As(III) w zakresie 4000-400 cm⁻¹. W tabeli 7 zestawiono częstości grup C=O i SO₂ w widmach IR.

Tabela 7. Położenie niektórych pasm w widmach IR QSA, NaQSA (sól sodowa kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego) i związków jonów As(III) z QSA

Związek	$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}$
QSA	1640	1172
NaQSA	1665	1184
$\text{As}(\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_{10}\text{S})_3 \cdot 1$ $2\text{H}_2\text{O}$	1665	1184

Źródło: Opracowanie własne

4. Analiza wyników

4.1. Synteza QSA i jego związków z jonami As(III)

W wyniku sulfonowania kwercetyny otrzymano związek o składzie odpowiednio $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_{10}\text{S} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – kwas kwercetyno-5'-sulfonowy (QSA).

Położenie pasm absorpcyjnych w nadfiolecie i ich molowe współczynniki absorpcji (wodnych roztworów QSA) są zgodne z danymi literaturowymi [7]. Czystość związku sprawdzano metodą cienkowarstwowej chromatografii żelowej. Stwierdzono, że otrzymany QSA ($R_f=0,35$) jest substancją jednorodną i nie zawiera nieprzereagowanej kwercetyny ($R_f = 0,80$).

W wyniku reakcji wodnych roztworów o stężeniach rzędu 10^{-2} mol/dm³ jonów As(III) z QSA o stężeniu rzędu 10^{-2} mol/dm³ (pH mieszanin wynosiło 1,1-1,3) wytraciły się żółte kłaczkowate osady. Wydajność przeprowadzonych syntez była wysoka i wyniosła nawet 89,7%.

4.1.1. Skład i rozpuszczalność związków

Skład otrzymanych związków ustalono za pomocą analizy elementarnej i metodą spektrofotometryczną. Metodę termogravimetrii TG zastosowano także do badań składu i do określenia właściwości termicznych badanych związków. Roztwarzanie związków As z QSA ze względu na lotność oznaczanego metalu prowadzono w specjalnym zestawie do mineralizacji metodą moką. Tak prowadzone roztwarzanie zapewniło uzyskanie dokładnych i odtwarzalnych wyników oznaczeń. Uzyskane wyniki oznaczeń

(tabela 3) pozostają w dobrej zgodności z założonymi składami. Stwierdzono, że jony arsenu(III) z QSA niezależnie od warunków syntezy ($c_{As}:c_L$) tworzą jeden typ związków: $As(C_{15}H_9O_{10}S)_3 \cdot 12H_2O$. Związek ten jest silnie uwodniony, duża ilość cząsteczek wody w związku spowodowana jest obecnością grup OH i SO_3H , które łatwo tworzą z nią wiązania wodorowe.

Badania rozpuszczalności otrzymanych związków prowadzono w wodzie w temperaturze 20 i 36°C (tabela 5). Temperaturę 36°C wybrano ze względu na bliskość temperatury fizjologicznej organizmu człowieka. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że badane związki słabo rozpuszczają się w wodzie. W temperaturze 36°C rozpuszczalność jest rzędu 10^{-4} mol/dm³ pozwala wysnuć wniosek, że QSA potencjalnie może być zastosowany jako odtrutka na jony arsenu(III), ponieważ działania wchodzące w skład terapii odtruwającej to m.in. działania prowadzące do zmniejszenia wchłaniania trucizny z przewodu pokarmowego przez tworzenie mniej toksycznych, trudno rozpuszczalnych związków.

4.1.2. Analiza termograwimetryczna

Wykonane badania termograwimetryczne potwierdziły wyniki analizy elementarnej i skład otrzymanego związku. Uzyskane dane temperaturowe rozkładu badanego związku (tabela 4) wskazują, że związek ten ulega stopniowemu rozkładowi wraz ze wzrostem temperatury. As(III)-QSA charakteryzuje się jednym efektem endotermicznym (krzywa DTA), który jest związany z wydzieleniem wody krystalizacyjnej w zakresie temperatur 20-235°C.

Następne etapy przemian termicznych badanego związku są spowodowane utratą grup funkcyjnych lub naruszeniem jego struktury. Przemianom tym towarzyszą duże efekty egzotermiczne (krzywa DTA). Powyżej temperatury 600°C tworzy się końcowy produkt rozkładu, którym jest siarczek arsenu(III).

4.1.3. Widma absorpcyjne w nadfiolecie i zakresie widzialnym

Widma UV-VIS liganda i jego związku wykonano w metanolu (rys. 3). QSA w metanolu posiada dwa intensywne pasma absorpcyjne związane z przejściami $\pi-\pi^*$, pasma te występują przy $\lambda = 368$ i 258 nm.

Dla związku As-QSA nie zaobserwowano żadnych zmian w położeniu pasm absorpcyjnych w stosunku do widma QSA. Fakt ten sugeruje, że As-QSA jest solą arsenu(III) kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego i w stosowanym rozpuszczalniku (metanolu) ulega dysocjacji na jony As(III) i aniony QSA. Za takim stwierdzeniem przemawiają również inne dane doświadczalne przedstawione w dalszej części analizy wyników.

4.1.4. Widma w podczerwieni

W celu ustalenia budowy otrzymanych związków jonów As(III) z QSA wykonano ich widma w podczerwieni w zakresie 4000-400 cm^{-1} .

Jako pasma diagnostyczne dla charakterystyki związku wzięto pod uwagę wybrane częstości pasm związane z drganiami walencyjnymi grupy karbonylowej $>\text{C}=\text{O}$ i grupy SO_2 . Częstości tych pasm w badanym związku zestawiono w tabeli 7; dla porównania podano również wartości dla QSA i jego soli sodowej – NaQSA.

Położenie pasm od grupy $>\text{C}=\text{O}$ i SO_2 w związku As-QSA jest identyczne jak w soli sodowej kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego (NaQSA), co potwierdza tezę o wydzieleniu się związków As(III) w postaci soli sulfonowej pochodnej kwercetyny.

5. Wnioski

- Związki jonów As(III) z QSA wytrącają się z roztworów kwaśnych.
- Skład sumaryczny nie zależy od warunków syntezy, czyli stosunku $c_{\text{As}} : c_{\text{L}}$ ($\text{As}(\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_{10}\text{S})_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).
- Otrzymane związki są słabo rozpuszczalne w wodzie.
- Dla związków As-QSA nie zaobserwowano żadnych zmian w położeniu pasm absorpcyjnych w zakresie UV-VIS w stosunku do widma liganda. Również widma w podczerwieni tych związków są identyczne jak widma soli sodowej QSA. Fakty te świadczą o wydzieleniu się związków As(III) w postaci soli sulfonowej pochodnej kwercetyny.
- Najbardziej prawdopodobnym jest, że w wiązaniu metalu bierze udział grupa $-\text{SO}_3\text{H}$ liganda.

Literatura

1. Seńczuk W. Toksykologia. Podręcznik dla studentów, lekarzy i farmaceutów, PZWL, Warszawa 1994
2. Bogdanik T. *Toksykologia kliniczna*, PZWL, Warszawa 1988
3. Migula P. *Kiedy metale ciężkie są szkodliwe*, Biblioteczka Fundacji Ekologicznej „Silesia”, t. VII, Katowice 1993
4. Dutkiewicz T. *Chemia toksykologiczna*, PZWL, Warszawa 1974
5. Rusiecki W., Kubikowski P. *Toksykologia współczesna*, PZWL, Warszawa 1969
6. Bibudhendra S. *Heavy metals in the environment*, Marcel Dekker, Inc., New York 2002
7. Kopacz M. *Quercetin- and Morinsulfonates as Analytical Reagents*, Journal of Analytical Chemistry, 58 (2003), s. 225-229
8. Witkiewicz Z. *Nowe kierunki w chromatografii*, WNT, Warszawa 1998
9. Opieńska-Blauth J. *Chromatografia*, PWN, Warszawa 1957

10. Marczenko Z., Balcerzak M. Spektrofotometryczne metody w analizie nieorganicznej, PWN, Warszawa 1998

Synteza kwercetyno-5'-sulfonianu arsenu(III) jako potencjalnego produktu detoksykacji

Streszczenie

Przeprowadzono syntezę QSA oraz jego stałego związku z toksycznymi jonami As(III). Związek As(III)-QSA otrzymano z roztworów wodnych przy różnych stosunkach molowych reagentów ($c_{As} : c_L = 1:3$ oraz $c_{As} : c_L = 3:1$). Skład związku ustalono na podstawie analizy elementarnej, spektrofotometrycznego oznaczenia zawartości metalu i oznaczenia wody z wykorzystaniem metody derywatograficznej. Stwierdzono, że niezależnie od warunków prowadzenia reakcji otrzymuje się związek o składzie: $As(C_{15}H_9O_{10}S)_3 \cdot 12H_2O$.

Do określenia budowy powstałego związku wykorzystano metody spektroskopowe: UV-VIS i FT-IR. Przeprowadzono także analizę termogravimetryczną otrzymanego związku. Wyznaczona rozpuszczalność As(III)-QSA w wodzie (w temp. 20 i 36°C) rzędu $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pozwala wysnuć wniosek, że QSA potencjalnie może być zastosowany jako odtrutka na jony arsenu(III), ponieważ działania wchodzące w skład terapii odtruwającej to m.in. działania prowadzące do zmniejszenia wchłaniania trucizny z przewodu pokarmowego przez tworzenie mniej toksycznych, trudno rozpuszczalnych związków.

Słowa kluczowe: flawonoidy, sulfonowa pochodna kwercetyny, arsen

The synthesis of arsenic(III) quercetin-5'-sulfonate as a potential product of detoxication

Abstract

The synthesis of QSA and its solid compound with toxic ions As(III) was carried out. As(III)-QSA was obtained from water solutions at various molar ratios of reagents ($c_{As} : c_L = 1:3$ and $c_{As} : c_L = 3:1$). The composition of this compounds was determined based on elemental analysis, spectrophotometric determination of metal content and determination of water content using derivatographic analysis. It was claimed that regardless of reaction conditions $As(C_{15}H_9O_{10}S)_3 \cdot 12H_2O$ is obtained.

To determine the composition of the received compound, spectroscopic methods UV-VIS and FT-IR were used. The thermogravimetric analysis for this compound was applied as well. The determined solubility of As(III)-QSA in water (at 20 and 36 °C) of the order of $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ allows to draw a conclusion that QSA can potentially be applied as an antidote for arsenic(III) ions because the operations included in detoxicating therapy are e.g. actions leading to the decrease of toxicant absorption from the alimentary system by creating less toxic and slightly soluble compounds.

Keywords: flavonoids, sulfonic derivative of quercetin, arsenic

Barbara Laskowska¹, Marek Laskowski², Anna Lewandowska³,
Tomasz Ruman⁴

Zasady Schiffa oparte o związki dendrymeryczne oraz ich zastosowanie

1. Wprowadzenie

Zasady Schiffa stanowią ważną i interesującą grupę związków organicznych, zawierających swojej budowie aktywne chemicznie ugrupowanie azometinowe ($>C=N^*$), dzięki któremu iminy posiadają intensywną barwę żółtą, pomarańczową lub czerwoną. Zasady Schiffa mają szereg zastosowań, na co wskazuje znaczna liczba prac naukowych publikowanych na ich temat [1, 2]. Tak znaczne zainteresowanie iminami można tłumaczyć faktem, iż są one rozpowszechnione w wielu układach biologicznych, a także znajdują zastosowanie zarówno w syntezie organicznej i katalizie chemicznej, jak również w nowoczesnych technologiach [3, 4], medycynie, farmacji oraz analityce [5]. Związki typu zasad Schiffa są wykorzystywane w badaniach procesów dotyczących biochemii, katalizy, zjawisk aktywacji, transportu i rozdzielania oraz chelatowania jonów i wielu innych [6]. Szczególne właściwości zasad Schiffa wynikają z obecności w ich strukturze różnych grup protonodonorowych i protonoakceptorowych, możliwości tworzenia między- i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, a także z uczestniczenia w procesach przeniesienia protonu [7, 8].

2. Cel pracy

Celem pracy było przedstawienie metod otrzymywania oraz spektrum zastosowania zasad Schiffa oraz kompleksów tych związków, jako ważnej grupy związków organicznych o unikatowych właściwościach strukturalnych oraz właściwościach chelatujących.

¹ barbara.laskowska917@gmail.com, Instytut Ochrony Zdrowia, Państwowa Wyższa Szkoła Techniczno – Ekonomiczna w Jarosławiu

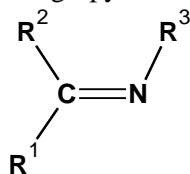
² laskowskimail@gmail.com, ICN Polfa Rzeszów S.A.

³ am.lewandowska@poczta.fm, Instytut Ochrony Zdrowia, Państwowa Wyższa Szkoła Techniczno – Ekonomiczna w Jarosławiu

⁴ tomruman@prz.edu.pl, Zakład Polimerów i Biopolimerów, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska

3. Otrzymywanie zasad Schiffa

Reakcja otrzymywania zasad Schiffa jest jedną z najczęściej opisanych z najstarszych w chemii [9]. Po raz pierwszy związki te zostały odkryte przez niemieckiego chemika, laureata Nagrody Nobla, Hugo Schiffa w 1864r. [10]. Pod względem strukturalnym zasady Schiffa stanowią związki aldehydo – lub ketonopodobne, w których grupa karbonylowa (C=O) została zastąpiona przez grupę iminową lub azometinową [11]. Wspólną strukturalną cechą związków typu zasad Schiffa jest więc ugrupowanie azometinowe o ogólnym wzorze -RHC=N-R_1 , gdzie R i R₁ oznacza alkil, aryl, cykloalkil lub grupy heterocykliczne [12, 13].

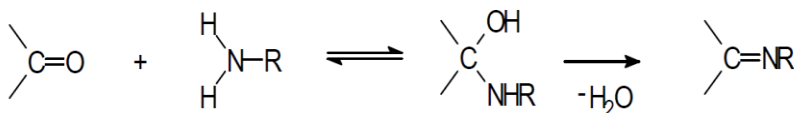


R¹, R² – atom wodoru, alkil lub aryl, i/lub R³ – alkil lub aryl

Rysunek 1. Ogólna struktura zasad Schiffa

Zasady Schiffa czyli iminy są produktami reakcji kondensacji amin pierwszorzędowych oraz aktywnych związków karbonylowych. Mechanizm tej reakcji polega na nukleofilowym przyłączeniu aminy do grupy karbonylowej aldehydów lub ketonów, a następnie eliminacji cząsteczki wody.

Ogólny schemat reakcji Schiffa można przedstawić równaniem:



Schemat 1. Ogólny schemat reakcji tworzenia zasad Schiffa

W pierwszym etapie reakcji trójwiązalny azot aminy, posiadający wolną niewiążącą parę elektronową, reaguje jako nukleofil z grupą karbonylową. Produktami przyłączenia są α -hydroksyaminy, związki nietrwałe chemicznie, ulegające natychmiastowej dehydratacji do produktów zawierających wiązanie iminowe (-HC=N-). Reakcja otrzymywania zasad Schiffa jest reakcją odwracalną, która przebiega z wytworzeniem produktu pośredniego stanowiącego tetraedyczny aminokarbinol. Katalizatorami reakcji są kwasy protonowe, kwasy Lewis'a, a szybkość reakcji chemicznej zależy od pH środowiska. W zależności od odczynu środowiska reakcji etapem, który określa szybkość tworzenia zasady Schiffa jest tworzenie aminokarbinolu

(w przypadku środowiska kwaśnego) lub odszczepienie cząsteczki wody (w przypadku środowiska zasadowego). Zarówno wysokie, jak i niskie pH spowalniają reakcję. Optymalnym środowiskiem reakcji jest pH 4-6, gdyż wtedy reakcja przebiega najszybciej. Poniżej tej wartości pH, przy zbyt dużej ilości katalizatora kwasowego, amina ulega sprotonowaniu w zbyt dużym stopniu. Powyżej podanej wartości pH, koncentracja protonów jest zbyt mała i nie pozwala na sprotonowanie grupy hydroksylowej na etapie dehydratacji. W przypadku udziału w reakcji amin alifatycznych, użycie katalizatora nie jest konieczne. Istnieje możliwość przesunięcia równowagi tej reakcji w kierunku tworzenia produktu przez usuwanie wody ze środowiska reakcji. Najczęściej osiąga się to poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej sit molekularnych lub wykorzystując destylację azeotropową.

Reakcja kondensacji aminy pierwszorzędowej z ketonami prowadzi do otrzymania zasad Schiffa typu ketimin [14]. Reakcja pomiędzy silnie nukleofilowymi związkami typu amina I- i II-rzędowa, przebiega na ogół bez dodania kwasu. Zasady Schiffa aldehydów alifatycznych są stosunkowo nietrwałe i łatwo ulegają polimeryzacji, podczas gdy zasady Schiffa aldehydów aromatycznych są bardziej stabilne.

4. Właściwości kompleksujące zasad Schiffa

Zasady Schiffa są bardzo interesujące nie tylko ze względu na swoje właściwości strukturalne, ale także ze względu na właściwości kompleksujące. Jako ligandy zasady Schiffa mają istotne znaczenie w dziedzinie chemii koordynacyjnej, zwłaszcza w dziedzinie syntezy kompleksów zasad Schiffa, ponieważ są one zdolne do tworzenia trwałych kompleksów z jonami metali przejściowych oraz metali grup głównych [15]. Iminy wykazują doskonałe właściwości donorowe, jeżeli w swojej strukturze zawierają wybrane grupy funkcyjne, położone obok ugrupowania azometinowego. Ze względu na doskonałe własności kompleksujące iminy aldehydów hydroksyaromatycznych stanowią interesującą grupę związków pod względem zastosowania w różnych dziedzinach przemysłu [16-22]. Znaczna liczba publikacji na temat zasad Schiffa jako popularnych ligandów w chemii koordynacyjnej dotyczy iminowych kompleksów z metalami [23, 24] głównie ze względu na ich stosunkowo prostą syntezę [25, 26], tworzenie stabilnych kompleksów z jonami metali oraz strukturalną różnorodność tych związków [27].

Iminowe kompleksy wykazują różnorodne właściwości biologiczne [28], do których głównie zaliczamy właściwości przeciwbakteryjne [29, 30], przeciwnowotworowe [31], przeciwrzybicze [32] oraz przeciwwirusowe [33]. Zasady Schiffa posiadają grupę iminową, która bierze udział m. in. w reakcji transaminowania i racemizacji w systemie biologicznym.

Stosowane jako modele biologiczne, kompleksy iminowe pozwalają zrozumieć budowę wybranych biocząsteczek oraz procesy biologiczne, które zachodzą w organizmach żywych [33, 34].

Kompleksy zasad Schiffa są również istotnymi katalizatorami w układach biologicznych, w syntezie polimerów, a także produkcji barwników. Ponadto uczestniczą one w procesie fotosyntezy oraz transporcie tlenu w organizmach [35, 36]. Coraz częściej związki te są testowane jako leki przeciwmalaryczne m.in. kompleksy iminowych pochodnych aldehydu salicylowego [37]. Zasady Schiffa i ich kompleksy mogą być wykorzystane w procesie uzdatniania wody, a także jako żywice jonowymienne [38].

Liczne kompleksy zasad Schiffa wykazują właściwości przeciwgrzybicze. Obecnie stwierdza się, iż zakażenia grzybicze na ogół nie ograniczają się jedynie do skażenia tkanek powierzchniowych. W ostatnim czasie nastąpił znaczący wzrost częstotliwości występowania tzw. systemowych zakażeń grzybiczych, które stanowią bezpośrednie zagrożenie dla życia [39]. W rozwoju skutecznych środków przeciwgrzybiczych za szczególnie obiecujące leki przeciwgrzybicze uważa się wybrane zasady Schiffa, do których należą m.in. iminowe kompleksy kobaltu z 1-(2'-hydroksyfenylo)-etylidenoaniliną [40].

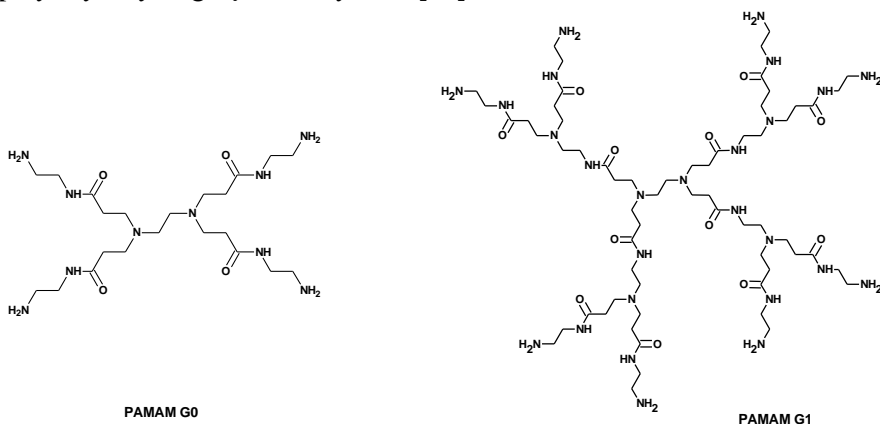
Wiele kompleksów zasad Schiffa z metalami odznacza się doskonałą aktywnością katalityczną, zarówno w reakcjach zachodzących pod wpływem wysokiej temperatury jak i w obecności wilgoci. Obecnie zwiększa się liczba badań dotyczących ich zastosowania w katalizie homogenicznej i heterogenicznej [41]. Iminowe kompleksy z metalami są coraz częściej wykorzystywane jako katalizatory w różnych procesach biologicznych. Ponadto kompleksy zasad Schiffa będących pochodnymi aminokwasów, uczestniczą w reakcjach transaminacji, racemizacji, oraz dekarboksylacji.

Związki typu zasad Schiffa, ze względu na swoje właściwości, mogą być wykorzystywane jako molekuly o aktywności katalitycznej [42]. Doskonała selektywność, stabilność oraz czułość zasad Schiffa na specyficzne jony metali, np.: Ag(II), Al(III), Co(II), Cu(II), Gd(III), Hg(II), Ni(II), Pb(II) i Zn(II) powoduje, iż znaczna liczba ich ligandów jest stosowana jako nośniki kationów w czujnikach potencjometrycznych. Do ciekawych zastosowań tych związków zalicza się możliwość wykorzystania ich jako skutecznych inhibitorów korozji. Na powierzchni przeznaczonej do ochrony antykorozyjnej tworzy się pojedynczą warstwę ochronną z wykorzystaniem kompleksów iminowych.

5. Czasteczki dendrymeryczne wykorzystywane do syntezy zasad Schiffa

Czasteczki dendrymeryczne stanowią ważne substraty do syntezy zasad Schiffa z wybranymi aldehydami. Prowadzi to do utworzenia dendrymerów zawierających w swej strukturze dwu- lub wielodonorowe ligandy o zdolności wiązania jony metali. Tak zbudowane zasady Schiffa tworzą bardzo trwałe chemicznie związki kompleksowe z metalami przejściowymi oraz metalami grup głównych.

W połączeniach metal-dendrymer, dendrymer może być: (I) budowany wokół kompleksu metalu stanowiącego rdzeń, (II) zawierać kompleks metalu stanowiący rdzeń dendronu, (III) zawierać kompleks metalu stanowiący jednostki peryferyczne, (IV) tworzyć wiązania koordynacyjne z jonami metali przez ligandy obecne w strukturze gałęzi dendrymeru, (V) posiadać rdzeń mogący wiązać się koordynacyjnie z jonem metalu, a także (VI) być budowany wokół kompleksu metalu będącego rdzeniem czasteczki zawierającej kompleksy metali będące rdzeniem i jednostkami peryferycznymi gałęzi dendrymeru [43].



Rysunek 2. Przykład dendrymerów PAMAM generacji całkowitych zawierających jako rdzeń etylenodiaminę wykorzystywanych do otrzymywania zasad Schiffa

6. Zastosowanie zasad Schiffa

Zasady Schiffa są wykorzystywane jako skuteczne środki przeciwbakteryjne. Badania potwierdzają, iż zasady Schiffa zawierające grupowania 2,4-dichloro-5-fluorofenyłowe efektywnie hamują wzrost bakterii [44, 45]. Związki otrzymane w wyniku reakcji pomiędzy furyloglioksalem a *p*-toluidyną wykazują aktywność antybakteryjną przeciwko szczepom bakteryjnym *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* i *Proteus vulgaris*. Do pochodnych zasad Schiffa, które posiadają właściwości antybakteryjne, należą m. in. pochodne benzimidazolu, tiazolu,

pirydyny, glukozaminy, pirazolonu, hydrazydu, tiazolidionów, indolu, tiosemikarbazonu, *p*-fluorobenzaldehydu [42]. Natomiast zasady Schiffa będące pochodnymi izatyny znajdują zastosowanie w zwalczaniu pasożytów i pierwotniaków [46].

Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, iż zasady Schiffa będące pochodnymi chinazolinonów, posiadają właściwości przeciwwgrzybicze wobec wybranych szczepów chorobotwórczych: *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus niger*, a także *Microsporium gypseum*. Kompleksy zasad Schiffa z metalami tworzone pomiędzy furyloglikoksałem lub furanem z różnymi aminami wykazują aktywność przeciwwgrzybiczą przeciwko *Helminthosporium gramineum*, która powoduje pasiastotę liści jęczmienia, *Syncephalostrum racemosus* przyczyniającej się do gnicia owoców oraz *Colletotrichum capsici*, powodująca zmiany w formie miejscowych nekroz na łodygach, liściach a także owocach roślin, co w konsekwencji może prowadzić do obumierania całych roślin np. chilli [42]. Ponadto kompleksy zasad Schiffa oparte na hydrazynie z wybranymi metalami, typu molibden i mangan, wykazują aktywność przeciwwgrzybiczą przeciwko *Alternaria alternata* i *H. graminicum*.

Związki typu zasad Schiffa i ich kompleksy wykazują również aktywność przeciwwirusową. Przeprowadzone badania potwierdzają, iż zasady Schiffa oparte na pochodnych gossypolu odznaczają się wysoką aktywnością przeciwwirusową [42]. Zasady Schiffa otrzymane w wyniku reakcji kondensacji glicyny i aldehydu salicylowego oraz ich kompleksy srebra (I), wykazują zadowalające działanie przeciwwirusowe wobec wirusa *Cucumber mosaic* [47]. Iminowe pochodne izatyny, które cechują się działaniem przeciwwirusowym, znajdują zastosowanie w leczeniu HIV [45].

7. Podsumowanie

Zasady Schiffa ze względu na swoje interesujące właściwości chemiczne, fizyczne oraz także biologiczne stanowią obecnie ważną grupę związków wykorzystywanych w różnorodnych badaniach prowadzonych w dziedzinie chemii, biochemii, oraz farmacji. Związki te są także szeroko badane ze względu na ich zastosowanie pozamedyczne.

Tworzenie połączeń z jonami metali przez ligandy, które są obecne w strukturze dendrymeru prowadzi do powstania kompleksów zwanych metalodendrymerami. Oddziaływanie dendrymerów z metalami pozwala na rozwój nowoczesnych technik analitycznych i diagnostycznych. Synteza kompleksów zasad Schiffa z jonami metali oraz dendrymerów jako czynników chelatujących jest obecnie przedmiotem zainteresowania ze względu na możliwość wykorzystania tych związków m. in. w asyme-

trycznej syntezie aminokwasów i peptydów, procesach katalizy homogenicznej i heterogenicznej, a także w wielu ważnymi procesach biologicznych.

Tak duże zainteresowanie iminami i ich kompleksami można tłumaczyć szerokim rozpowszechnieniem w wielu układach biologicznych oraz zastosowaniem, zarówno w syntezie organicznej, katalizie chemicznej, medycynie, farmacji, analityce, jak i w nowoczesnych technologiach [48, 49]. Liczne zasady Schiffa zostały zbadane pod względem różnorodnych zastosowań w przemyśle. Aktywność biologiczna tej grupy związków wymaga dalszych badań, gdyż ciągle są odkrywane nowe właściwości i potencjalne zastosowania zarówno zasad Schiffa jak i ich kompleksów z wybranymi metalami.

Literatura

1. Naeimi H., Safari J., Heidarneshad A. Synthesis of Schiff base ligands derived from condensation of salicylaldehyde derivatives and synthetic diamine, *Dyes and Pigments*, 73 (2007), s. 251-253
2. Krygowski T.M., Woźniak K., Anulewicz R., Pawlak D., Kołodziejcki W., Grech E., Szady A. *Throughresonance assisted ionic hydrogen bonding in 5-nitro-N-salicylideneethylamine*, *Journal of Physical Chemistry*, 101 (1997), s. 9399-9404
3. Dziembowska T. *Resonance Assisted Intramolecular Hydrogen Bond in Schiff Bases*, *Polish Journal of Chemistry*, 72 (1998), s. 193-209
4. Upadhyay K.K., Kumar A., Upadhyay S., Mishra P.C. Synthesis, characterization, structural optimization using density functional theory and superoxide ion scavenging activity of some Schiff bases, *Journal of Molecular Structure*, 873 (2008), s. 5-16
5. Xiao T., Xie X.Y., Xue Ch.B., Luo W.Ch., Jiang L., Cao S. *Inhibitory effects of Schiff analogs of salicylidene aniline on phenoloxidase from *Pieris rapae* L. (*Lepi-doptera: Pieridae*)*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91 (2008), s. 39-44
6. Vigato P.A., Tamburini S., Bertolo L. *Coord. Chem. Reviews*, 251 (2007), s. 1311-1492
7. Rozwadowski Z. Deuterium isotope effects on ^{13}C chemical shifts of lithium salts of Schiff bases amino acids, *Journal of Molecular Structure*, 753 (2005), s. 127-131
8. Rozwadowski Z., Ambroziak K., Szypa M., Jagodzińska E., Spychaj S., Schilf W., Kamiński B. *The ^{15}N and ^{13}C NMR study of Schiff bases of amino acids and their lithium salts in solid state and DMSO solution*, *Journal of Molecular Structure*, 734 (2005), s. 137-142
9. Atwood D.A., Harvey M.J. *Group 13 compounds incorporating Salen ligands*, *Chemical Reviews* 101 (2001), s. 37-52
10. Ashraf M. A., Mahmood K., Wajid A. Synthesis, Characterization and Biological Activity of Schiff Bases, *IPCBE*, 10 (2011), s. 1-7

11. Kalaivani S., Priya N. P., Arunachalam S. Schiff bases: facile synthesis, spectral characterization and biocidal studies, *IJABPT*, 3 (2012), s. 219-223
12. Arulmurugan S, Kavitha PH, Venkatraman RP. *Biological activities of Schiff base and its complexes: a review*, *Rasayan Journal Chemistry*, 3 (2010), s. 385-410
13. Gakias, S., Rix, C., Fowless, A., Wills-Johnson, G., Latham K., White J. A comparison of the intramolecular and intermolecular hydrogen bonding of N,N'-ethylenebis(aminobenzylidene) in the solid state with its salen analogue, *Journal of Molecular Structure*, 737(2005), s. 69-74
14. Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P.W.G., Tatchell A.R. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Longman Scientific & Technical (1989)
15. Souza P., Garcia-Vazquez J. A., Masaguer J. R. *Transition Metal Chemistry*, 10 (1985), s. 410
16. Fernández M.I., Fondo M., Garcia-Deibe A.M., Fernández B., Rodriguez M.J., Bermejo M. *Rearrangement of manganese(III) complexes with asymmetrical N₃O and N₂O₂ Schiff bases*, *Transition Metal Chemistry*, 27 (2002), s. 416-422
17. Chantarasiri N., Ruangpornvisuti V., Muangsin N., Detsen H., Mananunsap T., Batiya Ch., Chaichit N. Structure and physico-chemical properties of hexadentate Schiff base zinc complexes derived from salicylaldehydes and triethylenetetramine, *Journal of Molecular Structure*, 701 (2004), s. 93-103
18. Gangully R., Sreenivasulu B., Vittal J.J. *For structural studies of Schiff base complexes*, *Coordination Chemistry Reviews*, 252 (2008), s. 1027-1050
19. You Z.L., Shi D.H., Xu Ch., Zhang Q., Zhu H.L. *Schiff base transition metal complexes as novel inhibitors of xanthine oxidase*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43 (2008), s. 862-871
20. Li B.Y., Yao Y.M., Wang Y.R., Zhang Y., Shen Q. Reduction of imine of samarium Schiff base chloride by sodium-Formation of a novel samarium complex through unprecedented C-C coupling and hydrogen transfer reaction, *Inorganic Chemistry Communications*, 11 (2008), s. 349-352
21. Radecka-Paryzek W., Pospieszna-Markiewicz I., Kubicki M. *Self-assembled two-dimensional salicylaldehyde lanthanum(III) nitrate coordination polymer*, *Inorganica Chimica Acta*, 360 (2007), s. 488-496
22. El-Medani S.M., Ali O.A.M., Ramadan R.M. Photochemical reactions of group 6 metal carbonyls with N-salicylidene-2-hydroxyaniline and bis-(salicylaldehyde)-phenylenediimine, *Journal of Molecular Structure*, 738 (2005) s. 171-177
23. Sarkar B., Bocelli G., Cantoni A., Ghosh A. *Copper(II) complexes of symmetrical and unsymmetrical tetradentate Schiff base ligands incorporating 1-benzoylacetone: Synthesis, crystal structures and electrochemical behavior*, *Polyhedron*, 27 (2008), s. 693-700
24. Tümer M., Ekinci D., Tümer F., Bulut A. Synthesis, characterization and properties of some divalent metal(II) complexes: their electrochemical, catalytic, thermal and antimicrobial activity studies, *Spectrochimica Acta Part A*, 67 (2007), s. 916-929

25. Anthonysamy A., Balasubramanian S. Synthesis, spectral, thermal and electrochemical studies of nickel (II) complexes with N_2O_2 donor ligands, *Inorganic Chemistry Communications*, 8 (2005), s. 908-911
26. Venkatachalam G., Ramesh R. Catalytic and biological activities of Ru(III) mixed ligand complexes containing N,O donor of 2-hydroxy-1-naphthylideneimine, *Spectrochimica Acta Part A*, 61 (2005), s. 2081-2087
27. Sivagamasundari M., Ramesh R. Luminescent property and catalytic activity of Ru(II) carbonyl complexes containing N, O donor of 2-hydroxy-1-naphthylideneimines, *Spectrochimica Acta Part A*, 66 (2007), s. 427-433
28. Radecka-Paryzek W., Pospieszna-Markiewicz I., Nitbicki M. *Self-assembled two-dimensional salicylaldehyde lanthanum(III) nitrate coordination polymer*, *Inorganica Chimica Acta*, 360 (2007), s. 488-496
29. Yakuphanoglu F., Cukurovali A., Yilmaz D. Refractive index and optical absorption properties of the complexes of a cyclohexane containing thiazolyl hydrazone ligand, *Optical Materials*, 27 (2005), s. 1363-1368
30. Zhao H.-Y., Qiu X.-H., Xie Y.-B., Shen P. Synthesis, structure and properties of three new oxidovanadium complexes containing a tridentate salicylaldehyde-glycine, *Journal of Molecular Structure*, 733 (2005), s. 95-99
31. Szłyk E., Wojtczak A., Surdykowski A., Goździkiewicz M. Five-coordinate zinc(II) complexes with optically active Schiff bases derived from (1R,2R)-(-)-cyclohexanediamine: X-ray structure and CP MAS NMR characterization of [cyclohexylenebis(5-chlorosalicylideneiminato)zinc(II)pyridine] and [cyclohexylenebis(5-bromosalicylideneiminato)zinc(II)pyridine], *Inorganica Chimica Acta*, 358 (2005), s. 467-475
32. Belaid S., Landreau A., Djebbar S., Benali-Baitich O., Bouet G., Bouchara J.P. Synthesis, characterization and antifungal activity of a series of manganese(II) and copper(II) complexes with ligands derived from reduced N,N'-O-phenylenebis(salicylideneimine), *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102 (2008), s. 63-69
33. Boghaei D. M., Askarizadeh E., Bezaatpour A. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *Spectrochimica Acta Part A*, 69 (2008), s. 624-628
34. Rodyagina T.Yu., Gaman'kov P.V., Dmitrieva E.A., Chepurnaya I.A., Vasil'eva S.V., Timonov A.M. Redox transformations in electroactive polymer films derived from complexes of nickel with Salen-type ligands: computational, EQCM, and spectroelectrochemical study, *Russian Journal of Electrochemistry*, 41 (2005), s. 1101-1110
35. Anthonysamy A., Balasubramanian S. Synthesis, spectral, thermal and electrochemical studies of nickel (II) complexes with N_2O_2 donor ligands, *Inorganic Chemistry Communications*, 8 (2005), s. 908-911
36. Asadi M., Kianfar A.H., Torabi S., Mohammadi K. *Synthesis, characterization, and thermodynamic studies of cobalt Schiff base complexes with amine*, *Journal of Chemical Thermodynamics*, 40 (2008), s. 523-528
37. Wang M.Z., Meng Z.X., Liu B.L., Cai G.L., Zhang C.L., Wang X.Y. Novel tumor chemotherapeutic agents and tumor radio-imaging agents: potential tumor pharmaceuticals of ternary copper(II) complexes, *Inorganic Chemistry Communications*, 8 (2005), s. 368-371

38. Jain A.K., Gupta V.K., Ganeshpure P.A., Raisoni J.R. *Ni(II)-selective ion sensors of salen type Schiff base chelates*, *Analytica Chimica Acta*, 553 (2005), s. 177-184
39. Sundriyal S., Sharma R. K., Jain R. *Current advances in antifungal targets and drug development*, *Current Medicinal Chemistry*, 13 (2006), s. 1321-1335
40. Rehman W., Baloch M.K., Muhammad B., Badshah A., Khan K.M. *Characteristic spectral studies and in vitro antifungal activity of some Schiff bases and their organotin (IV) complexes*, *Chinese Science Bulletin*, 49 (2004), s. 119-122
41. Naeimi H., Safari J., Heidarneshad A. *Synthesis of Schiff base ligands derived from condensation of salicylaldehyde derivatives and synthetic diamine*, *Dyes Pigments*, 73 (2007), s. 251-253
42. Kumar S., Dhar D.N., Saxena P.N. *Applications of metal complexes of Schiff bases – a review*, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 68 (2009), s. 181-187
43. Rice L.B. *Unmet medical needs in antibacterial therapy*, *Biochemical Pharmacology*, 71 (2006), s. 991-995
44. Yang X., Wang Q., Huang Y., Fu P., Zhang J., Zeng R. *Synthesis, DNA interaction and antimicrobial activities of copper (II) complexes with Schiff base ligands derived from kaempferol and polyamines*, *Inorganic Chemistry Communications*, 25 (2012), s. 55-59
45. Pandeya S.N., Sriram D., Nath G., De Clercq E. *Synthesis, antibacterial, antifungal and anti-HIV activity of Schiff and Mannich bases of isatin with N-[6-chlorobenzothiazol-2-yl]thiosemicarbazide*, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61 (1999), s. 358-361
46. Silva da C., Silva da D., Modolo L., Alves R. *Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities*, *Journal of Advanced Research*, 2 (2011), s. 1-8
47. Ceroni P., Vicinelli V., Maestri M., Balzani V., Lee S., van Heyst J., Gorka M., Vögtle F. *Luminescent dendrimers as ligands for metal ions*, *Journal of Organometallic Chemistry*, 689 (2004), s. 4375-4383
48. Krygowski T. M., Woźniak K., Anulewicz R., Pawlak D., Kołodziejcki W., Grech E., Szady A. *Through-Resonance Assisted Ionic Hydrogen Bonding in 5-Nitro-N-salicylidene-ethylamine*, *The Journal of Physical Chemistry*, 101 (1997), s. 9399-9404
49. Upadhyay K. K., Kumar A., Upadhyay S., Mishra P. C. *Synthesis, characterization, structural optimization using density functional theory and superoxide ion scavenging activity of some Schiff bases*, *Journal of Molecular Structure*, 873 (2008), s. 5-16

Zasady Schiffa oparte o związki dendrymeryczne oraz ich zastosowanie

Streszczenie

Zasady Schiffa stanowią ważną i interesującą grupę związków organicznych, nie tylko ze względu na właściwości strukturalne, ale również ze względu na ich właściwości kompleksujące. Związki te są produktami reakcji kondensacji aminy pierwszorzędowej z aktywnym związkiem karbonylowym. Wiązania koordynacyjne z jonami metali przez ligandy, które są obecne w strukturze związku dendrymerycznego prowadzą do powstania kompleksów zwanych metalodendrymerami. Synteza kompleksów zasad Schiffa z jonami metali oraz dendrymerów jako czynników chelatujących jony metali jest obecnie przedmiotem zainteresowania ze względu na możliwość ich wykorzystania w różnych dziedzinach nauki.

Słowa kluczowe: zasady Schiffa, kompleksy, związki dendrymeryczne

Schiff bases based on the dendrimeric compounds and their use

Abstract

Schiff bases are important and interesting group of organic compounds, not only because of their structural characteristics, but also due to their coordination properties. These compounds are the products of condensation of a primary amine with an active carbonyl compound. Formation of coordinate bonds between a metal ion and ligands that are present in the structure of a dendrimeric compound lead to the complexes called metal-dendrimers. Synthesis of Schiff base complexes with metal ions, and dendrimers as chelating agents metal ions is of interest nowadays due to the possibility of their use in various fields of science.

Keywords: Schiff bases, complexes, dendrimeric compounds

Wykorzystanie pakietu Geant4 w szeroko pojętej fizyce jądrowej

1. Wstęp

Fizyka jądrowa rozwija się nieprzerwanie od bez mała stu lat. Początki sięgają odkrycia elektronu w roku 1897 dokonany przez J. J. Thompsona, który to stworzył własny model atomu. Uznał, że atom można przyrównać do „ciastka z rodzynkami”, gdzie *rodzynki* to rozrzucone swobodnie elektrony. Nieco później, w latach 1907-1912 Ernest Rutherford prowadził badania nad atomami i w końcu opublikował wyniki swoich eksperymentów, w których zaproponował całkowicie odmienną teorię budowy atomu niż ta, którą przedstawił Thompson. Otóż na podstawie doświadczeń, Rutherford stwierdził, że atom składać się musi z dodatnio naładowanego jądra i, jak wówczas sądzono, *swobodnie* krążących wokół niego elektronów. Tym samym nastąpiło odkrycie *jądra atomowego*.

W latach 30-tych XX wieku, James Chadwick zrozumiał i odkrył, że promieniowanie, które zaobserwowali Walther Bothe, Herbert Becker oraz małżeństwo Irène i Frédéric Joliot-Curie, było spowodowane przez obojętnie naładowaną cząstkę – *neutron*.

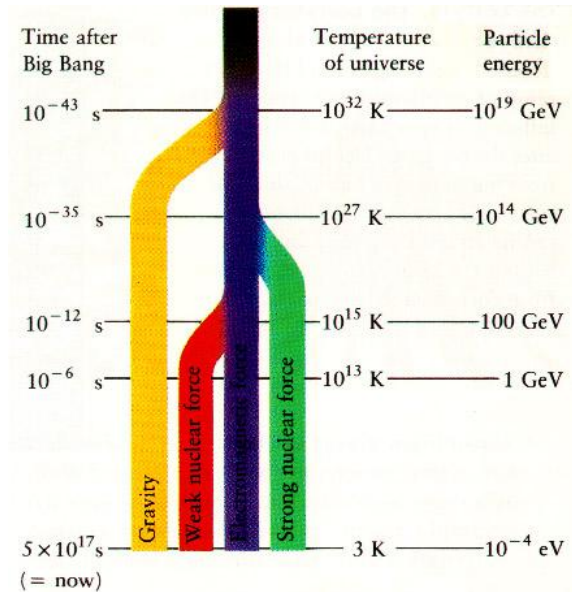
Od tego czasu, aż do dzisiejszego dnia, nieprzerwanie trwają badania nad fizyką jądrową. Po drodze zahaczając o mechanikę i chromodynamikę kwantową, elektrodynamikę, odkrycia neutrin, mionów, taonów, kwarków, gluonów i całej gamy innych cząstek, aż do Bozonu Higgsa (2012) [1][2].

2. Cel pracy

Celem badań nad fizyką jądrową nie jest tylko odkrywanie nowych cząstek, ale również badanie oddziaływań występujących w przyrodzie [3]. Postuluje się, że na początku Wszechświata (10^{-34} sekundy po Wielkim Wybuchu) było jedno oddziaływanie, które już w 10^{-12} sekundy po Wielkim Wybuchu rozdzieliło się na cztery rodzaje oddziaływań: silne, elektromagnetyczne, słabe i grawitacyjne.

Już teraz przy użyciu wielkiego zderzacza hadronów (*Large Hadron Collider* – LHC) w ośrodku badawczym CERN w Genewie, możemy uzyskać energię przyspieszenia protonu do 7TeV. Dla zobrazowania zobaczymy przeliczenie energii na temperaturę.

¹ fizyk137@gmail.com, Instytut Fizyki, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Śląski, www.us.edu.pl



Rysunek 1. Zobrazowana teoria unifikacji oddziaływań wraz z temperaturami (w kelwinach) i odpowiadającymi im temperaturami (w elektronowoltach) oraz czasem (w sekundach) po jakim teoretycznie nastąpiło rozdzielenie każdego z oddziaływań [źródło: <http://quantum-bits.org>]

Wiadomo, że $1\text{eV} = 11604.52\text{K}$, czyli ponad 11300°C . Na tej podstawie widać, że $7\text{TeV} = 8.1 \times 10^{16}\text{C}$. Biorąc pod uwagę, że temperatura wewnątrz Słońca to $14 - 16 \times 10^6$ °C możemy sobie wyobrazić z jaką potęgą mamy do czynienia. Różnica wynosi dziesięć rzędów wielkości, ale niestety, taka energia nadal nie jest wystarczająca.

Udało się doprowadzić do połączenia oddziaływań: elektromagnetycznych i słabych uzyskując tym samym oddziaływanie *elektrosłabe*. Było to możliwe, gdyż jak widać po prawej stronie rysunku 1 [3] energia potrzebna do połączenia oddziaływań słabego i elektromagnetycznego to około 100 GeV.

Można również zaobserwować, że kolejne połączenie – oddziaływania elektrosłabego i silnego – powinno nastąpić przy energii 10^{14}GeV . Przedstawiając jednostki w innej formie, widać więc, że $10^{14}\text{GeV} = 10^{11}\text{TeV}$, co oznacza ni mniej ni więcej jak to, że mamy jeszcze zbyt słabo rozwiniętą technologię, aby tego dokonać (dla przypomnienia: w LHC w CERN można uzyskać 7 TeV, a to oznacza, że jest to energia za mała dziesięć rzędów wielkości) [3].

Dla porządku moglibyśmy zobaczyć jaka temperatura teoretycznie powinna sprawić, że otrzymamy jedno oddziaływanie *elektrograwitacyjne*, ale skoro nie możemy póki co stworzyć nawet oddziaływania *elektrosil-*

nego, to opuścimy ten fragment, gdyż jeszcze przez wiele lat będzie to jedynie sfera marzeń wielu fizyków.

Proton atomu ma około $1.3 \cdot 10^{-15}$ metra, zaś jądro atomu to rząd wielkości $10^{-15} - 10^{-14}$ metra. Przy rozpędzeniu dwóch takich niewielkich cząstek, do wartości 7TeV każda, otrzymujemy energię zderzenia równą 14TeV. Dlatego niezbędne jest, aby mieć niezwykle precyzyjne detektory, które wychwycą jak najwięcej produktów powstałych przy zderzeniu. Oczywiście, po pierwsze koszty rosną wraz z każdym detektorem, po drugie zawsze trzeba zakładać, że nie wszystko odbędzie się bezproblemowo.

Celem tej pracy jest przedstawienie narzędzia służącego do opracowywania wyników pomiarów między innymi z takich eksperymentów. Często po otrzymaniu wyników z eksperymentu dostrzegamy, że ślady cząstek nie są ciągłe, a *porozrywane*. Znaczy to ni mniej ni więcej, jak tyle, że nie możemy mieć pewności, czy ślady za przerwaniem są kontynuacją śladów przed przerwaniem, dlatego też za pomocą odpowiednich wzorów staramy się dopasować owe linie i połączyć ze sobą najbardziej prawdopodobne.

To oczywiście tylko jeden z wielu przykładów do których służy pakiet Geant4. W niniejszym opracowaniu zostało przedstawione jego podstawowe i przeglądowe użycie w odniesieniu do badań prowadzonych w laboratorium, gdzie mamy do czynienia z promieniowaniem i emisją cząstek.

3. Materiały, metody i wiadomości teoretyczne

3.1. Dostępne narzędzia i sprecyzowanie oczekiwań

Do badania zostały wykorzystane dwie próbki promieniotwórcze. Stront – ^{90}Sr oraz sód – ^{22}Na . Celem badania było wyznaczenie widm energetycznych elektronów i pozytonów z rozpadów β przy wykorzystaniu spektrometru magnetycznego dla podanych wyżej źródeł promieniowania.

3.2. Opisy rozpadów i typy promieniowania

Izotopem nazywamy odmiany tego samego pierwiastka różniące się jedynie liczbą neutronów w jądrze. Na przykład: wodór (^1H) posiada jeden proton (p^+). Deuter (^2H) zbudowany jest z jednego protonu i jednego neutronu (n^0), zaś tryt (^3H) z jednego protonu i dwóch neutronów. Warto również zauważyć, że liczba stojąca po lewej stronie u góry oznaczenia pierwiastka, to liczba nukleonów – suma protonów i neutronów w jądrze (liczba masowa oznaczana jako A). Liczba protonów natomiast zapisywana jest zawsze na dole po lewej stronie (liczba atomowa oznaczana jako Z) [3].

Rozpadem promieniotwórczym nazywane są spontaniczne przemiany jądra atomowego danego izotopu w inne jądro.

Rozpad alfa (α) jest reakcją jądrową w wyniku której emitowana jest z jądra cząstka alfa. Po takim rozpadzie formowane jest nowe jądro, którego liczba masowa jest mniejsza o 4, a liczba atomowa o 2 względem jądra, które było na początku. Tym samym cząstka alfa składa się z dwóch protonów i dwóch neutronów, czyli jest to po prostu jądro helu (${}^4_2\text{He}^{+2}$).



gdzie A – liczba nukleonów, Z – liczba protonów, X – jądro pierwotne, Y – jądro powstałe po rozpadzie alfa, He – hel

Rozpad beta (β) jest przemianą jądrową zachodzącą pod wpływem oddziaływania słabego. Jej skutkiem jest przemiana nukleonu (protonu lub neutronu) w inny nukleon. Rozpad beta dzielimy na rozpady β^+ i β^- .

Rozpadem β^+ nazywamy przemianę wewnątrzjądrową protonu w neutron. Reakcja jest możliwa dzięki emisji bozonu W^+ , który rozpada się na pozyton i neutrino elektronowe.



gdzie A – liczba nukleonów, Z – liczba protonów, X – jądro pierwotne, Y – jądro powstałe po rozpadzie beta plus, e^+ – pozyton, ν_e – neutrino elektronowe, p^+ – proton, n^0 – neutron

Rozpadem β^- nazywamy sytuację, kiedy neutron zostaje przemieniony w proton. Reakcja zachodzi dzięki emisji bozonu W^- , który rozpada się na elektron i antyneutrino elektronowe.



gdzie A – liczba nukleonów, Z – liczba protonów, X – jądro pierwotne, Y – jądro powstałe po rozpadzie beta minus, e^- – elektron, $\bar{\nu}_e$ – antyneutrino elektronowe, p^+ – proton, n^0 – neutron

Promieniowanie gamma (γ) cechuje się wysoką energią (energia kwantu powyżej 50keV), która powstaje w wyniku deekscytacji poziomu wzbudzonego jądra atomowego. Promieniowanie gamma w przeciwieństwie do rozpadów alfa i beta wykazuje się brakiem „zasięgu maksymalnego”. W zależności od zastosowanej osłony (jej grubości i materiału z którego jest wykonana) jest ona w stanie zapewnić krotność osłabienia wiązki. Biorąc za przykład wiązkę irydu-192, aby ją osłabić stukrotnie trzeba zastosować osłonę o grubości 32 cm (beton) lub 9 cm (żelazo) albo 2.8 cm (ołów).

Promieniowanie rentgenowskie (X) podobnie jak promieniowanie gamma cechuje się wysoką energią. Jest jednym z najbardziej przenikliwych typów promieniowania. Promieniowanie rentgenowskie zawiera się między długościami fali rzędu 10^{-4} – 10^{-11} metra i rozchodzi się prostoliniowo [4].

3.3. Neutrino i jego związek z tematem

Jak wspomniano we wstępie, odkrycia cząstek rozpoczęły się intensywnie od lat 20-tych, 30-tych XX wieku. Nie inaczej więc było z neutrinem. W trzeciej dekadzie ubiegłego wieku Wolfgang Pauli po szeregu eksperymentów dotyczących rozpadów beta otrzymał wyniki na podstawie których zapostulował istnienie cząstki obojętnej elektrycznie o stosunkowo małej masie spoczynkowej – neutrina. Dopiero jednak po około dwudziestu latach od ogłoszenia wyników potwierdzono eksperymentalnie istnienie neutrin.

Pauli postawił swoją tezę w oparciu o analizę rozpadów dwu i trójciałowych. Produkty powstałe z dwuciałowego rozpadu mają konkretną, ściśle określoną energię, która wynika z obliczeń opartych na zasadach Zachowania pędu i energii. Jeśli zaś chodzi o rozpad trójciałowy, okazuje się, że jest zbyt mało równań, aby określić wszystkie składowe pędów cząstek.

Porównując te informacje ze wcześniejszymi danymi, możemy zauważyć, że rozpad dwuciałowy dotyczy rozpadu alfa, natomiast rozpad trójciałowy to rozpad beta plus i beta minus [4].

3.4. Cząstki w polu magnetycznym

Promieniotwórcze źródła naturalne emitują trzy rodzaje cząstek: obojętne cząstki gamma i naładowane elektrycznie cząstki alfa i beta. Skoro wiadomo, że cząstka alfa to jądro helu, wiemy zatem, że jest naładowana

dotatnio i posiada ładunek $+2e$ (e – ładunek elementarny), tym samym cząstka beta ma ładunek $-e$ (lub $+e$), a gamma to wysokoenergetyczne promieniowanie bez ładunku. Na podstawie odmiennych ładunków elektrycznych łatwo można odróżnić te trzy typy cząstek.

Odróżnienia takiego dokonuje się poprzez umieszczenie wiązki w polu magnetycznym o określonym kierunku, a następnie obserwuje w którą stronę odchylane są cząstki, które tworzą wiązkę. Takie postępowanie jest wynikiem znajomości wzoru na siłę Lorentza, który opisuje siłę działającą na poruszającą się naładowaną cząstkę [5].

$$\vec{F} = q(\vec{v} \times \vec{B}) \quad (6)$$

gdzie \vec{F} – siła Lorentza, q – ładunek cząstki, \vec{v} – wektor prędkości cząstki, \vec{B} – wektor indukcji pola magnetycznego

Łatwo zauważyć, że przy zmianie wartości ładunku cząstki, pozostawiając dwie pozostałe wartości niezmiennione, otrzymujemy wynik siły, która ma przeciwny zwrot, a co za tym idzie – kierunki w których odchylają się cząstki alfa i beta są takie same, ale promienie torów – inne. Dodatkowo wiedząc, że cząstka alfa ma większą masę niż cząstka beta wiemy, że promień skrętu dla tej pierwszej jest większy (cięższa, więc słabiej się ugina). Oczywiście rzeczą jest również fakt, że tor cząstek gamma pozostaną niezmiennione, gdyż nie posiadając ładunku wynikiem równania będzie:

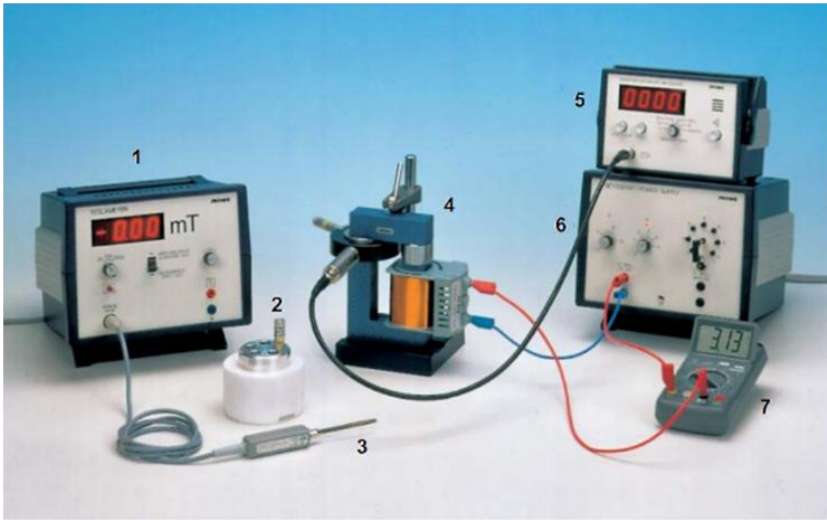
$$\vec{F} = 0 \quad (7)$$

4. Przebieg pomiaru i wprowadzenie niezbędnych wzorów

Pierwszym krokiem który został wykonany było podłączenie całej aparatury pomiarowej w której skład wchodziły: teslomierz, sonda Halla, spektrometr magnetyczny, czujnik Geigera-Müllera, zasilacz i amperomierz.

Metoda pomiaru polegała na obserwacji oddziaływania wiązki elektronów (lub pozytonów) z jednorodnym polem magnetycznym (wytwarzanym za pomocą cewki indukcyjnej), które skierowane zostało prostopadle do kierunku ruchu cząstki.

Potem została wykonana seria pomiarów (zakres: 0-2A) bez źródeł w celu sprawdzenia poprawności podłączenia aparatury. Następnie wykonano kalibrację zależności indukcji pola magnetycznego od natężenia prądu, poprzez zmiany napięcia zasilającego i wykonywanie pomiarów wartości prądu płynącego przez cewkę (rys.5). Wspomnianą kalibrację wykonano dla napięcia rosnącego, a następnie malejącego w celu uzyskania jak najbardziej poprawnych wyników oraz przy obu polarnościach napięcia – kierunkach pola magnetycznego.



Rysunek 2. Aparatura używana podczas wykonywania ćwiczenia. Numerami od 1 do 7 oznaczono kolejno: teslomierz, źródło promieniotwórcze, sondę Halla, spektrometr magnetyczny (zbudowany z żelaznych rdzeni i cewki – uzwojenie pierwotne – oraz komory spektrometrycznej – uzwojenie wtórne), układ elektroniczny Geigera-Mullera, zasilacz, miernik uniwersalny (w ćwiczeniu wykorzystany jako amperomierz) [źródło: <http://if.us.edu.pl>]

Kolejnym krokiem było ustalenie odpowiedniego kierunku pola magnetycznego (rozpad beta plus lub beta minus) i zmierzenie widm pędowych źródła wspomagając się licznikiem Geigera-Müllera. Wyniki zostały zapisane w formie: liczba zarejestrowanych przez licznik zliczeń do odpowiadających im natężeń prądu wytwarzających pole magnetyczne.

Potem zostało zmierzone tło dla odwrotnego pola magnetycznego, niż wymagane do rejestracji elektronów (pozytronów) ze źródła. Wówczas można było wykonać serię pomiarów widm przy właściwym kierunku pola.

Wszystkie pomiary ze źródłem zostały wykonane dla obu próbek – strontu i sodu. Wyniki natężenia prądu i pola magnetycznego widoczne są w Tabelach 1 i 2.

Tabela 1

STRONT											
I [A]	0.12	0.19	0.22	0.31	0.37	0.41	0.49	0.52	0.56	0.68	0.75
B [mT]	0.49	0.89	1.07	1.59	1.94	2.17	2.64	2.81	3.04	3.74	4.15
I [A]	0.87	0.97	1.06	1.13	1.24	1.37	1.45	1.56	1.62	1.74	-
B [mT]	4.85,	5.43	5.95	6.36	7.0	7.75	8.22	8.85	9.2	9.9	-

Tabela 2

SÓD											
I [A]	0.14	0.2	0.35	0.42	0.52	0.63	0.82	0.92	1.01	1.17	1.39
B [mT]	0.6	0.96	1.82	2.23	2.81	3.46	4.56	5.14	5.66	6.59	7.87
I [A]	1.43	1.49	1.54	1.57	1.64	1.68	1.72	-	-	-	-
B [mT]	8.01	8.45	8.74	8.91	9.32	9.55	9.78	-	-	-	-

Po zakończeniu eksperymentu zebrane wyniki zostały poddane odpowiedniej obróbce w pakiecie Geant4. Analiza obejmowała wyprowadzenie zależności opisujących pędy i energie.

Mając do czynienia z naładowaną cząstką, wiemy, że działa na nią pewna siła, która pełni rolę siły dośrodkowej:

$$F = \frac{mv^2}{r} \quad (8)$$

gdzie F – siła, m – masa cząstki, v – prędkość cząstki, r – promień krzywizny toru ruchu

Jednocześnie, skoro jest to cząstka naładowana, działa na nią siła Lorentza (6), dla przypomnienia:

$$\vec{F} = q(\vec{v} \times \vec{B}) \quad (6)$$

Zapisując skalarnie drugi wzór i przyrównując te siły do siebie otrzymujemy:

$$qvB \cdot \sin\alpha = \frac{mv^2}{r} \quad (9)$$

gdzie α – kąt między natężeniem pola elektrycznego i magnetycznego

Pamiętając, że pole przyłożone zostało prostopadle następuje uproszczenie po lewej stronie (sinus wynosi w tym wypadku 1). Jednocześnie przyjmujemy do obliczeń taki układ w którym masa $m = 1$, przez co powyższy wzór ma postać:

$$qvB = \frac{v^2}{r} \quad (10)$$

Dokonyjemy przekształcenia, tak aby otrzymać wzór na prędkość:

$$v = qBr \quad (11)$$

Następną rzeczą jest podstawienie wyliczonej wartości do wzoru na pęd:

$$p = mv \quad (12)$$

Stąd otrzymujemy:

$$p = qBr \quad (13)$$

Kolejnym krokiem jest działanie związane ze wzorem wyliczenia zależności na energię całkowitą w jego relatywistycznej wersji, czyli:

$$E^2 = p^2c^2 + m^2c^4 \quad (14)$$

gdzie E – energia całkowita, p – pęd, m – masa, c – prędkość światła w próżni

Przy podstawieniu wyliczonej wartości pędu:

$$E^2 = (qBrc)^2 + (mc^2)^2 \quad (15)$$

Teraz, znając związek energii całkowitej cząstki z jej energią kinetyczną:

$$E_{tot} = E_{kin} + m_0c^2 \quad (16)$$

gdzie E_{tot} – energia całkowita, E_{kin} – energia kinetyczna, m_0 – masa spoczynkowa

Możemy wyznaczyć wzór na energię kinetyczną:

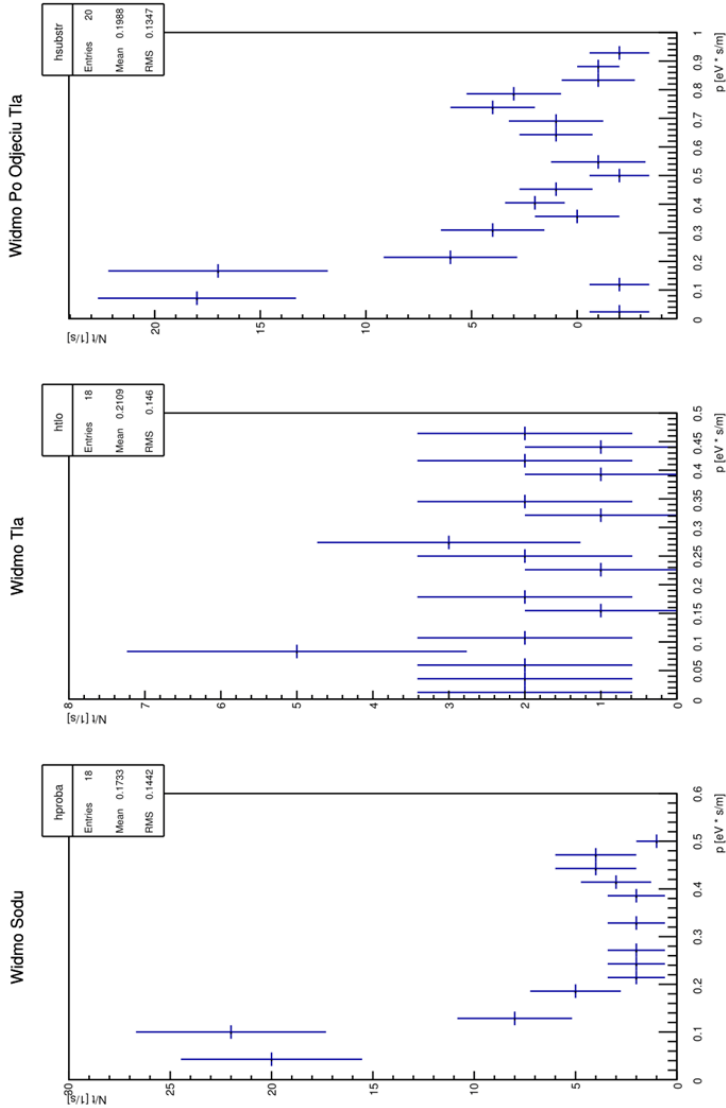
$$E_{kin} = E_{tot} - m_0c^2 \quad (17)$$

Więc przyjmując z naszych dotychczasowych obliczeń E za E_{tot} ostatecznie uzyskujemy:

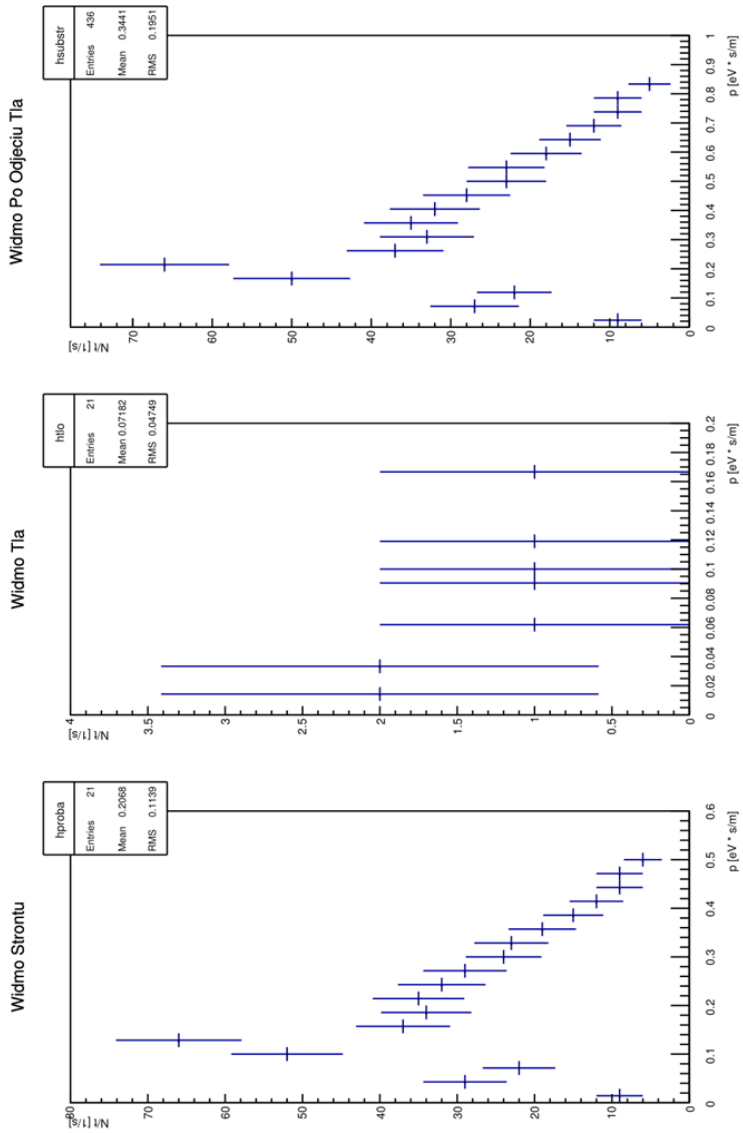
$$E_{kin} = \sqrt{(qBrc)^2 + m^2c^4} - m_0c^2 \quad (18)$$

Wyprowadzony wzór był podstawą do obliczenia energii cząstek beta dla różnych wartości pola magnetycznego.

Widma pędowe wykonane za pomocą pakietu ROOT (omówiony w następnym rozdziale) wyglądają następująco:



Rysunek 3. Histogram pędu dla sodu, dla tła i dla ostatecznego wyniku – sodu bez tła
[źródło: wykonanie własne]



Rysunek 4. Histogram pędu dla strontu, dla tła i dla ostatecznego wyniku – strontu bez tła [źródło: wykonanie własne]

5. Pakiet ROOT

5.1. Opis programu

ROOT jest tak zwanym środowiskiem. Oparty i napisany w języku programowania C++. Został stworzony do analizy wyników otrzymanych z eksperymentów fizyki jądrowej i cząstek elementarnych. Pierwsze wydanie powstało w roku 1994 w Europejskim Ośrodku Badań Jądrowych CERN na potrzeby wykonywanych tam eksperymentów akceleratorowych związanych z fizyką wysokich energii.

W skład ROOTa wchodzi między innymi: kompilator C++ i jego interpreter, wiele dobrze napisanych i zoptymalizowanych bibliotek (w tym biblioteki: matematyczna, statystyczna, graficzna, pozwalająca na tworzenie histogramów i wiele więcej) oraz narzędzia do równoległej analizy danych. Poprzez wykorzystywanie klas, które obudowują funkcje systemu operacyjnego został rozwiązany problem wieloplatformowości. Aplikacje/skrypty napisane w ROOT mogą być z powodzeniem uruchamiane tak na systemach operacyjnych z rodziny Unix jak i Windows.

Pakiet poza wymienionymi zaletami jest prosty w użyciu, kompatybilny i posiada szerokie zastosowanie w fizyce jądrowej i fizyce cząstek elementarnych. Całe środowisko jest udostępniane za darmo ze strony ośrodka CERN [6].

5.2. Ważniejsze moduły wykorzystywane w ROOT

- BINDINGS – jak sama nazwa wskazuje, moduł ten podporządkowuje (wiąże) jedne zasoby systemowe z drugimi, to znaczy łączy dwa języki programowania tak, aby biblioteka napisana w jednym języku była dostępna w innym. W przypadku ROOTa są to powiązania z Pythonem i Ruby;
- CINT – interpreter języków C i C++;
- GEOM – za jego pomocą można tworzyć, używać oraz wyświetlać geometrię detektorów;
- GRAPH2D – pozwala na tworzenie i wykonywanie operacji na dwuwymiarowym grafie, mającym zbiór współrzędnych x,y ;
- GRAPH3D – pozwala na tworzenie i wykonywanie operacji na trójwymiarowym grafie, mającym zbiór współrzędnych x,y,z ;
- GUI – dzięki niemu można tworzyć aplikacje okienkowe, np. wizualizator geometrii;
- HIST – umożliwia tworzenie histogramów i wykonywanie na nich operacji w 2D i 3D;

- IO – moduł dający możliwości zarządzania danymi wejściowymi i wyjściowymi, jak chociażby zapis i odczyt pliku z danymi;
- MATH – umożliwia, jak sama nazwa wskazuje, przeprowadzanie operacji matematycznych;
- PROOF – zbiór algorytmów odpowiedzialnych za przetwarzanie równoległe;
- SQL – przetwornik zapytań SQL [6].

5.3. Przykładowy kod histogramu

Aby stworzyć histogram za pomocą ROOTa, tworzymy plik o dowolnej nazwie z rozszerzeniem C i umieszczamy wewnątrz odpowiedni kod. Przykładowo:

```
voidPrzykładowyHistogram()
{
  TH1F *h1 = new TH1F("h1", " Przykładowy Histogram",100, -3,3);
  TCanvas *c1 = new TCanvas("c1","c1");
  FILE *exfile = fopen("przykładowe_dane.txt","r");
  Int_t iloscZliczen;
  Int_t bin=1;
  while(!feof(exfile)) {
    fscanf(exfile,"%d",&iloscZliczen);
    h1->SetBinContent(bin,iloscZliczen);
    bin++;
  }
  fclose(exfile);
  h1->GetXaxis()->SetTitle("Wartosc");
  h1->GetYaxis()->SetTitle("IloscZliczen");
  h1->Draw();
  h1->Fit("gaus");
  c1->SaveAs("PrzykładowyHistogram.pdf");
}
```

Po lewej stronie kodu zostały umieszczone duże litery, aby łatwiej było objaśnić poszczególne fragmenty. Kod objaśniony został ogólnie, bez wdawania się w szczegóły i wymaga co najmniej minimalnej znajomości języka C/C++. Po głębszą analizę odsyłam do dokumentacji pakietu [6].

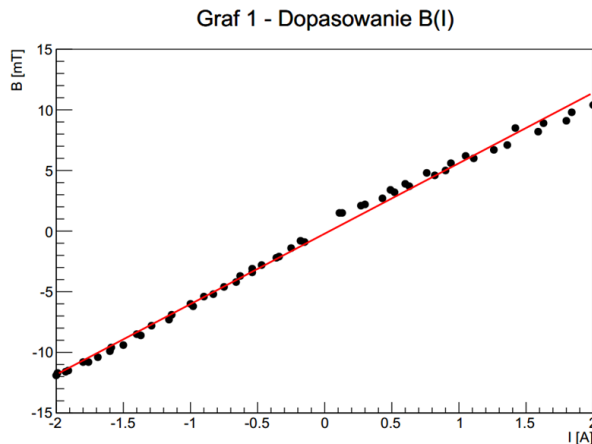
- utworzenie funkcji odpowiedzialnej za wykreowanie histogramu;
- nadanienazwytworzonemuhistogramowi;
- otworzenie pliku z danymi w trybie do odczytu do zmiennej exfile;
- do czasu, aż nie nastąpi koniec pliku, program wykonuje pętlę;
- odczytując z plikuilośćzliczeń;

- następuje złączenie kolejnej liczby całkowitej od odpowiadającej jej ilości zliczeń;
- ustawienie etykiety osi X;
- ustawienie etykiety osi Y;
- wywołanie funkcji rysującej histogram;
- dopasowanie wyników za pomocą wbudowanej funkcji gaussa;
- wyeksportowanie histogramu jako plik PDF.

Analogicznie jak w tym przypadku, tworzy się grafy, przy czym można z pliku odczytać od razu wartości X i Y, co też zostało zrobione w przypadku opracowania wyników eksperymentu wykonanego w celu prezentacji działania pakietu Geant4 [7].

6. Analiza wyników

Uzyskane wyniki zostały przetworzone w programie ROOT, a następnie, po usunięciu danych znacznie odbiegających od oczekiwanych, na ich podstawie zostały wykonane wykresy 3 i 4 (przykład: dopasowanie funkcji do danych zależności indukcji pola magnetycznego od natężenie prądu [rys. 5]).



Rysunek 5. Zależność indukcji pola magnetycznego od natężenia prądu wykonane w programie ROOT, czerwona linia przedstawia dopasowaną funkcję liniową [źródło: wykonanie własne]

Niestety, tak jak wszystko, również ROOT poza zaletami ma także wady. Mimo wykonania całkiem przyzwoitych histogramów, nie mogły one zostać tutaj umieszczone ze względu na wymogi edycyjne. Rozmiar skali, jak i legendy są zbyt małe, aby z powodzeniem mogłyby być tutaj zaprezentowane.

Widać zatem wyraźnie, że pakiet dobrze sprawuje się przy wykonywaniu zadań do których został skonstruowany. Pozwoliło to na odczytanie (z okna konsoli, w trakcie wykonywania skryptów w ROOT) wartości współczynników prostej: $a=5.81$ i $b=0.21$ oraz ich niepewności pomiarowych. Należy również pamiętać o fakcie, że wykonywane w nim wykresy wszelkiego rodzaju powinny mieć możliwość dopasowania wielkości rozmiarów legendy, czy oznaczeń na osiach, ale nie jest to zawsze problemem, jak widać na rysunku 5 [opracowanie własne].

7. Wnioski i podsumowanie

Cały proces trwania eksperymentu, od rozpoczęcia przygotowania teoretycznego przez ustawienie sprzętu i wykonanie pomiarów, a w końcu analizę wyników w programie ROOT był dość czasochłonny. Warto jednak zauważyć, że w momencie, kiedy znane są już użytkownikowi podstawy zjawisk dotyczące rozpadów promieniotwórczych, klasyfikacji cząstek, zachowania cząstek w stałym i zmiennym polu magnetycznym i cała gama innych ważnych dla fizyka eksperymentalnego informacji, proces sprowadza się tak naprawdę do odpowiedniego ustawienia układu pomiarowego, wykonania doświadczenia, zebrania wyników i opracowania w wygodnym dla siebie programie.

Celem pracy było przedstawienie pakietu ROOT stworzonego przez CERN, gdyż jest on jednym z wielu narzędzi dostępnych na rynku, które pozwalają na analizę danych dotyczących fizyki jądrowej i cząstek elementarnych. Oczywiście każdy ma własne wygodne narzędzia w których się odnajduje. Dla jednych jest to arkusz kalkulacyjny, dla innych C++, a jeszcze dla innej grupy FORTRAN 77. Przekrój dostępnych narzędzi jest ogromny, ale warto również zainteresować się narzędziami tworzonymi przez ludzi, którzy zajmują się daną dziedziną na co dzień.

Jak zostało wspomniane, ROOT jest pakietem darmowym. Nie wymaga wiele miejsca na dysku, ani ogromnych umiejętności. Ma obszerną i zarazem konkretną dokumentację. Dodatkowo można go używać zdalnie i przy minimalnej znajomości języka C, czy C++, gdyż jest naprawdę intuicyjny (w odróżnieniu chociażby od program ELK, który przeznaczony jest do modelowania fizyki ciała stałego, ale jego poznanie zabiera już ogromną ilość czasu).

Jak każdy program, pakiet, czy narzędzie, tak i ROOT nie jest oczywiście doskonały. Zdarzają mu się niedoskonałości (przypomnienie odnośnie wykonanych podczas analizy histogramów), które wymagają poprawy, ale nie należy go przez to skreślać, gdyż służy on głównie do zbierania, opracowywania i analizowania danych.

Na jego obronę może posłużyć również fakt, że faktycznie większość ludzi zajmujących się fizyką jądrową używa go z wielkim powodzeniem do codziennej pracy, czy to w CERN, PAN, czy też w jakimkolwiek zespole związanym chociażby z eksperymentem NA61/SHINE.

Literatura

1. CMS Collaboration, Observation of a new boson at a mass of 125 GeV with the CMS experiment at the LHC, (2013)
2. <http://cerncourier.com/cws/article/cern/53086>
3. Bubak A., *Wstęp do fizyki jądrowej I cząstek elementarnych*, (2013): <http://zajecia.bubak.pl> (materiały dla studentów)
4. L'Annunziata M., Radioactivity: Introduction and History, (2007)
5. Resnick R., Halliday D., Walker J., *Podstawy fizyki*, t. 1-5, (2015)
6. <https://root.cern.ch/>
7. <http://www.nuph.us.edu.pl/~kschmidt/PracowniaJadrowa>

Wykorzystanie pakietu Geant4 w szeroko pojętej fizyce jądrowej

Streszczenie

Europejska Organizacja Badań Jądrowych (CERN), gdzie znajduje się największy zderzacz hadronów na świecie, zajmuje się badaniami dotyczącymi fizyki jądrowej i cząstek elementarnych. Są to wszelkiego rodzaju eksperymenty o różnej tematyce i celu, a jednym z największych jest NA61/SHINE w którym bierze udział wielu naukowców. Oczywiście, jak każde duże zadanie, tak i NA61 jest podzielony na mniejsze zadania rozdzielone grupom, a w efekcie poszczególnym osobom. W niniejszej pracy przedstawiony został niewielki zakres możliwości jakie oferuje pakiet Geant4. Pakiet ten jest jednym z głównym narzędzi służących ludziom zajmującym się fizyką jądrową do między innymi analizy danych otrzymanych z eksperymentów. W pracy zostały po krótko poruszone najważniejsze wiadomości teoretyczne dla opisywanego zagadnienia, niewielka ilość informacji historycznych dotyczących fizyki cząstek, a w rezultacie przebieg prostego eksperymentu z którym powinien poradzić sobie każdy student fizyki mający minimalną wiedzę z dziedziny. Następnie zostały omówione najważniejsze informacje o pakiecie Geant4 i przedstawione wyniki działania. Na koniec podano zalety i wady pakietu, który jest ciągle rozwijany i zapewne jeszcze przez wiele lat będzie górował wśród narzędzi wykorzystywanych przy eksperymentach z dziedziny fizyki jądrowej.

Słowa kluczowe: CERN, fizyka jądrowa, analiza danych

Using a Geant4 suite in a broad sense of nuclear physics

Abstract

European Organization for Nuclear Research (CERN) where is the largest hadron collider of the world to take care of researches connected with nuclear physics and elementary particles. There are many experiments but one of the biggest is NA61/SHINE which focus many scientists. Of course, like all big tasks, that NA61 is divided on smaller tasks and they are assign to people. This paper shows a tiny range of Geant4 abilities. This suite is one of the majors of research tools used by nuclear physicists among other data experiments analysis. The article discussed about the most important of issue theoretical information, a few historical information connected with elementary particles physics and as a result turn of simply experiment which should to get by physics student having a minimal knowledge about this branch of science. Next, paper discussed the most important information about Geant4 suite and showed running data. On the end listed an advantages and disadvantages this packet which is still develop and no doubt still be on the top among tools using with experiments connected with nuclear physics branch.

Keywords: CERN, nuclear physics, data analysis

Interakcje bakteriofaga P1 z komórkami wybranych patogenów roślin z rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych

1. Wstęp

Bakterie z rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych należą do rodziny *Enterobacteriaceae*. Ich przedstawicielami są zarówno patogeny roślin, jak i niepatogenne bakterie związane z roślinami [1]. Niektórzy autorzy uważają, że rozwój rolnictwa doprowadził do konwersji niepatogennych lub słabo patogennych szczepów do zjadliwych przez nabycie genów warunkujących wirulencję od innych gatunków bakterii. Wykazano, że nowe szczepy bakterii patogennych dla roślin mogą pojawiać się w ekosystemach rolniczych m.in. dzięki horyzontalnemu transferowi genów [2].

Rozwój badań nad fitopatogennymi bakteriami wymaga opanowania takich technik manipulacji genetycznych, które pozwoliłyby na łatwą inaktywację ich konkretnych genów, modyfikacje genomów, czy też nadprodukcję określonych białek. Tradycyjnymi narzędziami w tych manipulacjach są plazmidy. Chociaż niektóre z nich, w postaci naturalnej lub zmodyfikowanej, już są wykorzystywane, trudności z ich wprowadzaniem do środowiskowych szczepów tych bakterii dyktują potrzebę poszukiwania nowych rozwiązań.

Na podstawie analizy 16S rDNA, z rodzaju *Erwinia* wyodrębniono dodatkowe pięć rodzajów: *Pantoea*, *Enterobacter*, *Brenneria*, *Pectobacterium* i *Dickeya* [1, 3]. Bakterie reprezentujące niektóre ich gatunki i będące groźnymi fitopatogenami, takie jak: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (wcześniej *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*), *Dickeya dedantii* (*Erwinia chrysanthemi*), *Erwinia amylovora*, *Erwinia aroideae*, *Erwinia horticola* i *Pantoea stewartii* (*Erwinia stewartii*) są wrażliwe na infekcję łącznym bakteriofagiem

¹ kagie@op.pl, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, www.sggw.pl

² malgorzata_lobocka@sggw.pl, Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, www.sggw.pl; lobocka@ibb.waw.pl, Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, www.ibb.waw.pl

modelowym, P1 (Tabela 1). Fitopatogeny te powodują m.in. zarazę ognio-
wą roślin, zgnilizny i wędnięcia, przyczyniające się do ogromnych strat
gospodarczych w uprawach roślin, głównie w klimacie ciepłym [4]. Dłate-
go ważne jest poznanie ich fizjologii i genetyki. Tymczasem brak jest
uniwersalnych wektorów plazmidowych, które byłyby wykorzystywane
w tych badaniach, a liczba naturalnych plazmidów w/w bakterii o dobrze
poznanej biologii jest ograniczona.

Wiele szczepów bakterii z rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych nie
osiąga stanu kompetencji. Takie szczepy nie są zdolne do pobrania DNA ze
środowiska w procesie naturalnej transformacji, a metody ich sztucznego
ukompetentniania lub elektroporacji są zawodne lub nie zostały opraco-
wane. Mogą one przyjąć DNA w wyniku koniugacji, ale najczęściej albo
odpowiednie wektory koniugacyjne lub mobilizowalne i mobilizujące są
nie dostępne, albo ich liczba i możliwości zastosowań są ograniczone.
Dlatego bakteriofag P1 okazuje się obiecującym narzędziem w badaniach
tych bakterii oraz w konstrukcji wektorów służącym tym badaniom. Może
on po infekcji bakterii tworzyć lizogeny, w których profag P1 utrzymy-
wany jest w formie kolistego, stabilnie dziedzicznego plazmidu. Jego
szeroka specyficzność w stosunku do bakterii z rodziny *Enterobacte-
riaceae*, w tym fitopatogenów, pozwala myśleć o konstrukcji na bazie tego
faga uniwersalnych wektorów do wprowadzania DNA do komórek liczy-
nych bakterii [5]. Dodatkowo, infekcja fagiem jest najprostszą, najszybszą
i najwydajniejszą metodą wprowadzenia do bakterii obcego DNA. Nie
wymaga ponadto urządzeń do elektroporacji i jest niezależna od możliwości
osiągania przez komórki stanu kompetencji. Ma zalety w porównaniu
z koniugacją – nie wymaga pomocniczych plazmidów mobilizujących.

2. Bakteriofag P1

2.1. Ogólna charakterystyka bakteriofaga P1

Bakteriofag P1 należy do rodziny *Myoviridae*. Jest to fag ogonkowy,
jego wirion składa się z dwudziestościennej izometrycznej główki przyłą-
czonej za pomocą szyjki do ogonka. Ogonek składa się z rurki i kurczliwej
pochewki, zakończonej tzw. płytką podstawną, do której przytwierdzo-
nych jest sześć włókien. Pełnią one funkcję adhezyń rozpoznających specy-
ficzne receptory na powierzchni komórek bakteryjnych [7].

Bakteriofag P1 jest zdolny do infekcji i lizogenizacji komórek szeregu
bakterii Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* [6, 7]. Został po raz
pierwszy wyizolowany w 1951 roku przez Giuseppe Bertani wraz z fagami
P2 i P3, ze szczepów *Escherichia coli* Lisbone i Carrere. Wyizolowane fagi
były serologicznie odmienne, a wytwarzane przez nich lysinki były

różnych rozmiarów. P1 wytwarzał najmniejsze łyśinki na warstwie komórek patogennej bakterii *Shigella dysenteriae* [8]. W 1955 roku Lennox odkrył, że P1 jest zdolny do ogólnej transdukcji. Od tamtej pory P1 był powszechnie używany jako narzędzie do przenoszenia fragmentów genomów pomiędzy bakteriami. Ogólna transdukcja okazała się nieocenionym narzędziem mapowania chromosomu *E. coli*, w czasie kiedy sekwencjonowanie genomu nie było możliwe [9]. Dodatkowo, od początku lat 60-tych bakteriofag P1 jest powszechnie stosowany jako narzędzie biologii molekularnej. Stanowi m.in. podstawę do konstrukcji wektorów, z pomocą których można wprowadzić duże fragmenty heterologicznego DNA do komórek bakterii. P1 może replikować jako plazmid i namnażać się jako wirus, co daje szersze możliwości manipulowania jego DNA, niż DNA innych dużych plazmidów, które w większości są przekazywane tylko przez koniugację lub transformację. Dlatego też P1 odegrał dużą rolę w badaniach z dziedziny genetyki, fizjologii i ekologii bakterii, a także w inżynierii genetycznej. Poznanie sekwencji genomu P1 (93,6 tys. pz) poszerzyło możliwości wykorzystania tego faga jako wektora w biologii molekularnej [10].

Kluczowy dla efektywnej infekcji bakterii środowiskowych, o aktywnych systemach restrykcji, jest system antyrestrykcji faga P1. Chroni on DNA faga wprowadzone do komórki przed pofragmentowaniem przez określone enzymy restrykcyjne typu I enterobakterii [11]. Związane są z geny *darA* i *darB*, położone w dwóch różnych, oddalonych od siebie operonach. Ich produkty są składnikami wirionu P1 i chronią przed restrykcją nawet heterologiczne DNA zapakowane *in vitro* do wirionów fagowych [10].

System restrykcji-modyfikacji kodowany przez bakteriofaga P1 chroni lizogeny przed infekcją innymi fagami, i w ten sposób zapewnia im przewagę selekcyjną nad Nielizogenami. Geny tego systemu: *res* i *mod*, kodują dwie podjednostki enzymu restrykcji-modyfikacji typu III – EcoP1. Białko Mod (74 kDa) rozpoznaje sekwencję DNA 5'AGACC, a następnie katalizuje metylację centralnej adeniny w obrębie tej sekwencji, z wykorzystaniem adenozylometioniny jako donora grupy metylowej. Białko Res (11 kDa) katalizuje przecięcie podwójnej nici DNA w rejonie odległym o około 25 pz od strony 3' rozpoznanej sekwencji [12].

2.2. Strategie rozwoju faga P1

Bakteriofag P1 infekuje komórki bakterii Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*. Początkowym etapem infekcji jest adsorpcja, możliwa dzięki rozpoznaniu przez białko włókien ogonka faga odpowiednich receptorów komórkowych [13]. Bakteriofag P1 rozpoznaje

końcową resztę glukozy lipopolisacharydu (LPS) błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych i dzięki interakcji włókna ogonka z tą resztą przyłącza się do powierzchni komórek. Do nieodwracalnego związania się faga z receptorami komórkowymi wystarczą interakcje co najmniej trzech z sześciu włókien ogonka z cząsteczką LPS bakterii [8]. Indukuje to skurcz pochewki ogonka i wówczas fag bardziej zbliża się do osłon komórkowych. Przynajmniej błona zewnętrzna jest przebijana przez rurkę ogonka bakteriofaga, która wnika przez osłony komórkowe na długość 30 nm [14]. Degradację peptydoglikanu ściany komórkowej wspomaga enzym – lityczna transglikozyłaza. Dzięki wytrawieniu przez nią otworu w peptydoglikanie, DNA z główki faga jest wprowadzany do wnętrza komórki bakterii. W cytoplazmie DNA P1 ulega cyklizacji, co chroni go przed degradacją przez nukleazy komórkowe [8]. Na tym etapie, zależnie od oddziaływania DNA lub białek faga z szeregiem czynników wewnątrzkomórkowych, rozpoczyna się rozwój lityczny faga lub lizogenia. Podczas lizogenii DNA faga P1 (profaga) znajduje się w komórce gospodarza w postaci niskokopijnego plazmidu-profaga, odmiennie od profaga λ , który występuje w formie wbudowanej do chromosomu. Ekspresję genów związanych z rozwojem litycznym faga P1 uniemożliwia białko represora, C1. Mutant faga P1, P1 *c1-100* Tn9 produkuje temperaturowrażliwy represor. W 42°C następuje jego inaktywacja, co umożliwia synchroniczne rozpoczęcie we wszystkich komórkach rozwoju litycznego faga. Represor kodowany przez dzikiego faga P1 nie jest temperaturowrażliwy. Indukcja dzikiego profaga P1 zachodzi spontanicznie z częstością zależną od warunków wzrostu bakterii [10].

Geny, których produkty są odpowiedzialne za rozwój lityczny faga P1 podzielono na wczesne i późne. Wczesne geny kodują m.in. białka związane z replikacją DNA faga i aktywacją późnych genów fagowych [10]. Są one kontrolowane przez represor C1, a ich transkrypcja rozpoczyna się z promotorów rozpoznawanych przez podjednostkę sigma 70 polimerazy RNA. Geny późne kodują białka wirionu faga oraz białka odpowiedzialne za dojrzewanie wirionów i lizę komórki. Replikacja DNA faga rozpoczyna się po przyłączeniu fagowego białka RepL do miejsca inicjacji, *oriL*, innego niż miejsce inicjacji replikacji plazmidu-profaga P1. Początkowo replikacja przebiega wg modelu theta, a następnie wg modelu toczącego się koła. Jest ona skorelowana z syntezą wczesnych białek fagowych. Po etapie powielania DNA faga rozpoczyna się synteza późnych białek oraz składanie główek i ogonków wirionów potomnych, z jednoczesnym pakowaniem DNA do pregłówek [15]. Pakowanie przebiega zgodnie z modelem „do wypełnienia główki” (ang. *headful packing*). Dlatego w populacji wirionów znajdują się cząsteczki DNA charakteryzujące się kolistą permutacją i terminalną nadmiarowością [16]. Nadmiar

DNA w wirionach w stosunku do wielkości genomu P1 wynosi około 10% [10]. Po wypełnieniu główki przyłącza się do niej ogonek, kończąc proces składania winionu. Wiriony potomne gromadzone są w cytoplazmie bakterii [8]. Uwolnienie fagów potomnych jest możliwe dzięki lizie komórek, powodowanej przez dwa białka: endolizynę – enzym uszkadzający peptydoglikan ściany komórkowej, oraz holinę, umożliwiającą endolizynie dostęp do jej substratu – ściany [16].

2.3. Systemy odpowiedzialne za utrzymanie plazmidu

W lizogenach profag P1 występuje jako kolisty, jednokopiowy plazmid. Jest on tracony z komórek z częstością zaledwie 10^{-5} na generację [10]. Zidentyfikowano i opisano cztery systemy zapewniające stabilne utrzymanie plazmidu P1 w populacji komórek bakteryjnych: regulowana replikacja plazmidu, miejscowo-specyficzna rekombinacja, aktywną segregację (partycję), oraz addycja [8].

Replikacja plazmidu P1 rozpoczyna się w miejscu inicjacji replikacji *oriR*. Plazmidowe białko RepA wchodzi w interakcje z tzw. iteronami – powtórzonymi sekwencjami o długości 19 pz wiążącymi to białko w rejonie *oriR*. Dodatkowe iterony w rejonie promotora genu *repA* umożliwiają negatywną kontrolę syntezy białka RepA przez produkt jego własnego genu. Interakcje pomiędzy cząsteczkami RepA oddziaływującymi z iteronami różnych cząsteczek plazmidu, powodują dodatkowe zablokowanie inicjacji replikacji tworząc wraz z plazmidami struktury podobne do kajdanek, stąd nazwa – kajdankowy mechanizm kontroli replikacji (ang. *handcuffing*) [10]. Replikacja plazmidu P1 przebiega wg modelu theta, a ścisła kontrola jej inicjacji ogranicza liczbę kopii plazmidu w komórce do jednej na chromosom [17].

Nowo zreplikowane plazmidy mają tendencję do tworzenia dimerów lub innych form multimerycznych na skutek homologicznej rekombinacji. Prowadzi to do zmniejszenia liczby kopii niezależnych cząsteczek DNA plazmidowego [18]. Za rozdział multimerów plazmidowych do monomerów odpowiada rekombinaza Cre bakteriofaga P1, kodowana przez gen *cre* zlokalizowany blisko miejsca jej działania, *lox*. Katalizuje ona preferencyjnie takie reakcje rekombinacji, w których z oligomerów powstają monomery, zmniejszając w ten sposób prawdopodobieństwo utraty plazmidu [10].

Stabilne dziedziczenie plazmidów przez komórki potomne zapewnia system aktywnej segregacji, zwany też systemem partycji. Partycja przypomina mitozę, w tym, że nowo zreplikowane plazmidy przemieszczane są z centrum komórki macierzystej do miejsc odpowiadających przyszłym centrom komórek potomnych [19]. Zależy ona od dwóch genów P1, *parA*

i *parB*, kodujących białka partycyjne, oraz działającej w układzie *cis* sekwencji *parS* – analogu centromeru eukariotycznego [20]. Inaktywacja genów systemu partycji prowadzi do utraty profaga P1 z ponad 90% komórek już po około 20 generacjach.

System postsegregacyjnej eliminacji komórek bezplazmidowych zwany systemem addykcji działa poprzez eliminację komórek potomnych gospodarza plazmidu, jeśli po podziale nie znajdzie się w niej żadna kopia plazmidu [21]. U bakteriofaga P1 białka systemu addykcji są kodowane przez operon *phd doc*. Produkt genu *doc* (13,6 kDa) jest stabilną toksyną, inhibitorem translacji. Komórki zawierające plazmid P1 produkują plazmidowe, niestabilne białko Phd (8,1 kDa) będące antidotum neutralizującym toksynę. Rozkład białka Phd w komórkach, które utraciły plazmid, uaktywnia toksynę [22].

3. Bakterie z rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych

Bakterie z rodzaju *Erwinia* to Gram-ujemne, względnie beztlenowe pałeczki [23]. Ich wymiary wahają się od 0,5 do 1,0 szerokości i od 1,0 do 3,0 μm długości. Bakterie te występują powszechnie w przyrodzie. Izolowane są przede wszystkim z tkanek roślinnych, wody, powietrza, gleby, ale również z tkanek zwierzęcych i materiałów pochodzących od człowieka. Nie tworzą przetrwalników. Wykazują typowe cechy rodziny *Enterobacteriaceae*, fermentują glukozę, wytwarzają katalazę, nie wytwarzają oksydazy i redukują azotany do azotynów. Optymalny dla ich wzrostu jest przedział temperatur 23-35°C. Występują pojedynczo, w parach, a czasami mogą tworzyć krótkie łańcuchy. Są to głównie patogeny, niektóre są epifitami lub saprofitami [4]. Nowoczesne metody identyfikacji bakterii w oparciu o podobieństwa sekwencji 16S rDNA oraz wyniki analizy genów i ich produktów, często związanych z fenotypem wywoływanej przez dany gatunek bakterii choroby, pozwoliły na wykluczenie z rodzaju *Erwinia* niektórych bakterii, początkowo zaliczanych do tego rodzaju. Sklasyfikowano je w obrębie rodzajów: *Pantoea*, *Enterobacter*, *Brenneria*, *Pectobacterium* i *Dickeya*. Niektóre wyodrębnione bakterie produkujące pektynazy, enzymy hydrolizujące pektyny – lepszczą komórek tkanki roślinnej, zaliczono do rodzaju *Pectobacterium* np. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, obecnie *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. Inne włączono do rodzaju *Dickeya*, np. obecny gatunek *Dickeya dedantii* grupuje bakterie zaliczane dawniej do gatunku *Erwinia chrysanthemii*. Grupę bakterii charakteryzujących się tlenowym metabolizmem D-glukozy i wytwarzaniem żółtego lub fioletowego pigmentu zaklasyfikowano do rodzaju *Pantoea* np. *Erwinia stewartii*, *Erwinia herbicola* [1].

Bakterie z rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych dostają się do tkanek roślinnych poprzez uszkodzenia mechaniczne powstałe w trakcie uprawy, zbioru i transportu plonów, a także przez naturalne otwory takie jak przetłoki, aparaty szparkowe i przewody nektarowe kwiatów [4]. Wektorem za pomocą którego bakterie są transportowane do rośliny są często owady. Np. *E. amylovora* przenoszona jest głównie przez pszczoły, które zapylają kwiaty drzew owocowych [23]. Bakterie atakują liście, łodygi, korzenie, powodując procesy gnilne wywołane na skutek wydzielania pektynazy [1]. Są m.in. sprawcami zarazy ogniowej, zgnilizny, więdnienia, nekroz, powstawania guzów, przyczyniając się do ogromnych strat gospodarczych w uprawie roślin, głównie w klimacie ciepłym [1, 4]. Dodatkowo ich niszczące działanie polega na wydzielaniu na zewnątrz komórki enzymów degradujących polisacharydy roślinnej ściany komórkowej. Niszczenie ściany dostarcza bakteriom pożywienia w postaci cukrów, a zarazem powoduje rozmięczenie środowiska ułatwiając rozprzestrzenianie się bakterii w roślinie. Jednak z produktów rozpadu ściany komórkowej mogą korzystać też inne bakterie. Zapewne, dlatego w ewolucji *Erwinia* wykształciła mechanizmy regulacyjne, w wyniku działania których synteza enzymów degradujących polisacharydy jest regulowana przez system „quorum sensing”. Zapewnia to produkcję tych enzymów, dopiero w warunkach dużego zagęszczenia populacji bakterii, kiedy ich aktywność przynosi największe korzyści [24]. Do wstrzykiwania białek efektorowych do cytoplazmy komórek roślinnych bakterie z rodzaju *Erwinia* wykorzystują system sekrecji typu III [1].

Często zakażenia bakteriami rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych powodują śmierć zainfekowanych roślin dopiero w warunkach sprzyjających rozwojowi choroby np. wysokiej wilgotności i deficytu tlenowego. Takie infekcje nie zawsze są łatwe do zdiagnozowania. Mogą one też być źródłem dużej liczby uwolnionych do środowiska patogenów, które w sprzyjających warunkach rozprzestrzeniają się szybko, powodując poważne straty gospodarcze [4].

Badania nad bakteriami z rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych z wykorzystaniem bakteriofaga P1 dotyczą tylko kilku gatunków tych bakterii. Są to patogeny roślin wywołujące poważne choroby, a co za tym idzie również duże straty w uprawach. Zaliczamy do nich takie gatunki jak *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *D. dedantii*, *E. amylovora*, *Erwinia aroideae*, *Erwinia horticola* i *Pantoea stewartii*.

3.1. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* powoduje mokrą zgniliznę wielu gatunków roślin m.in. pomidora oraz papryki [4]. Główne objawy choroby to wędnięcie i wycieki wody z liści, co może spowodować złamanie łodygi. Następnie pojawia się brązowienie łodygi i rdzenia. Gdy dojrzałe owoce, np. pomidora, są zainfekowane, pojawiają się pęknięcia skóry, a na koniec kremowo-biała zgnilizna [25]. Objawy występują w ciągu 24 do 48 godzin po infekcji. Zakażenia, które występują w niekorzystnych warunkach mogą prowadzić do zahamowania wzrostu i żółknięcia rośliny [26].

Z komórek bakterii *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* wyizolowano kryptyczne plazmidy, np. plazmid pCA25, który ma pochodzenie profagowe oraz plazmid pCA6-2, kodujący kolicyny [27, 28]. Niektóre plazmidy wyizolowane z innych bakterii np. plazmid R68.45, będący pochodną plazmidu *Pseudomonas aeruginosa* PAO oraz plazmidy RP4, R391 i pKM101 pochodzące z *Escherichia coli* lub *Salmonella* udało się przenieść do komórek *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* za pomocą koniugacji [29, 30]. Ponadto przez transformację przeniesiono do komórek tego fitopatogena pochodzący z *E. coli* plazmid pECL18. Chociaż wydajność transformacji była niska plazmid ten był stabilnie utrzymywany w komórkach nowego gospodarza [31]. Nie jest on jednak szeroko wykorzystywany jako wektor w badaniach tej bakterii.

3.2. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*

Pectobacterium carotovorum subsp. *atrosepticum* powoduje chorobę zwaną czarną nóżką u ziemniaka i innych warzyw [4]. Na początku liście porażonych roślin żółkną i wędną. Typowym objawem jest czernienie i gnicie podstawy łodygi. Rośliny zamierają nie tworząc bulw lub też jeśli zainfekowane są później wydają bulwy z bakteriami w formie utajonej, co skutkuje gniciem bulw podczas przechowywania [32].

3.3. *Dickeya dedantii*

Dickeya dedantii powoduje mokrą zgniliznę, bakteryjne wędnięcie i bakteryjną zgorzel u wielu roślin rosnących w klimacie tropikalnym i subtropikalnym, np. banany, goździki, chryzantemy, ziemniak, pomidory, marchew, seler [4]. Wytwarza dużo pektynaz, które niszczą ścianę komórkową roślin [33]. Powoduje systemiczne wędnięcie roślin, kolonizuje ksylem i rozprzestrzenia się na całą roślinę. Patogen może być przekazywany do kolejnych roślin poprzez organy służące do wegetatywnego rozmnażania np. bulwy, sadzonki [34, 35]. Bakterie te mogą przetrwać w glebie, z której są przekazywane razem z wodą, za pomocą owadów lub

poprzez zabiegi agrotechniczne [36]. *D. dedantii* koduje białka systemu sekrecji typu III (T3SS), który jest odpowiedzialny za wydzielanie i translokację białek efektorowych do komórek gospodarza i uważany za główny czynnik wirulencji w patogenezie [26].

Komórki *D. dedantii* transformowano plazmidami pBR322 i pMB9, lecz wydajność tego procesu była 60- lub 80-krotnie niższa niż w przypadku transformacji *E. coli*. Dopiero konstrukcja chimerycznych plazmidów pEC1 i pEC6, które zawierały przypadkowy fragment genomu *D. dedantii* oraz plazmid pBR322 zwiększyła częstość transformantów [37]. Natomiast przeniesienie do komórek tej bakterii genów warunkujących auksotrofię argininową i leucynową oraz oporność na antybiotyki: karbenicylinę, neomycynę i tetracyklinę wykonano za pomocą koniugacji z wykorzystaniem plazmidu RP1 z *E. coli* [38]. Mutagenezę transpozonową *D. dedantii* i *P. carotovorum*, przeprowadzono poprzez koniugacyjne przeniesienie plazmidów pDS1028 i pKRCPN1 z wbudowanym transpozonom Tn5. Wstawienie transpozonu do genomu tych bakterii dało efekty fenotypowe związane z inaktywacją określonych genów – zmniejszenie produkcji proteazy i zwiększenie produkcji niebieskiego barwnika – indygoidyny [39]. Brak jest uniwersalnych plazmidów do badań nad środowiskowymi szczepami tej bakterii.

3.4. *Erwinia amylovora*

Erwinia amylovora jest czynnikiem sprawczym zarazy ogniowej, powoduje duże straty w uprawach roślin z rodziny *Rosaceae* np. jabłoni, gruszy, roślin ozdobnych np. głóg, jarzab, irga [40]. Rozprzestrzenia się po całym świecie, a ostatnio zwłaszcza w Europie [41]. W Polsce po raz pierwszy zaraza ogniowa pojawiła się na wybrzeżu Bałtyku w 1966 roku [40]. Ostatnio odnotowanym źródłem zakażenia są sadzonki jarzabu importowane z Holandii [42]. W przypadku drzew owocowych objawy choroby widoczne są nie tylko na owocach, ale również na gałęziach z pąkami i liśćmi. Czasem choroba prowadzi do zamierania całego drzewa [43]. Pierwsze objawy w postaci opadania płatków kwiatowych obserwowane są po 1-2 tygodniach od infekcji. Dno kwiatowe, zalążnia i pręciki wydzielają wodnistą ciecz, stają się matowe i szarzielone, następnie kwiaty kurczą się i stają się brązowe, a nawet czarne. Pędy i liście początkowo więdną, a później ciemnieją stając się brązowe lub czarne [44]. Na korze drzew, owocach tworzą się brązowe, śluzowe wycieki (śluz bakteryjny połączony z sokiem roślinnym), ostatecznie owoce kurczą się i brązowieją [43]. Niszczące działanie bakterii polega m.in. na wydzielaniu na zewnątrz komórki enzymów degradujących polisacharydy roślinnej ściany komórkowej. Niszczenie ściany dostarcza bakteriom pożywienia w postaci cukrów, a zarazem powoduje rozmięk-

czenie tkanek roślinnych ułatwiając rozprzestrzenianie się bakterii w roślinie [44].

Badania przeprowadzone na szczepach *Erwinia amylovora* wykazały, że gatunek ten jest bardzo jednorodny na poziomie biochemicznym i serologicznym, natomiast istnieją różnice między szczepami w zakresie wirulencji [45-47]. Przyczynę tej różnorodności można przypisywać plazmidom. Powszechne są informacje o obecności plazmidów w szczepach tej bakterii [48, 49]. Większość z nich posiada plazmid pEA29. Ma on geny związane z wirulencją i stabilnym utrzymywaniem w komórce gospodarza. Nie może być przekazywany na drodze koniugacji, natomiast w warunkach laboratoryjnych wprowadzano go do komórek *E. amylovora* za pomocą elektrotransformacji [50].

Wiele plazmidów *E. amylovora* scharakteryzowano. Należą do nich: pEA8.7 – będący pochodną występującego u wielu gatunków bakterii plazmidu RSF1010; kryptyczny plazmid pEA72; zawierające transpozon Tn5393 plazmidy pCPP60 i pEA34 plazmid pEU30, oraz szereg małych plazmidów: pEA8.7, pEA1.7, pEP 2.6, pEAR5.2 i pEAR4.3 [48, 51-55]. W komórkach niektórych szczepów *E. amylovora* zidentyfikowano plazmidy koniugacyjne lub mobilizowalne: pEI70, pEL60 i pEA68 [3]. Żaden z plazmidów *E. amylovora* nie został wykorzystany do konstrukcji wektorów, które mogłyby być stosowane jako uniwersalne narzędzia przy wprowadzaniu DNA do środowiskowych izolatów *E. amylovora*.

3.5. *Pantoea stewartii*

Pantoea stewartii jest odpowiedzialna za wędnięcie naczyniowe kukurydzy, spotykane głównie w krajach Ameryki Północnej i Południowej [56]. Bakterie te mogą być przenoszone w nasionach, a czasem zimują w glebie, oborniku lub łodygach kukurydzy. Jednak największe znaczenie w transmisji *P. stewartii* mają wektory owadzie, np. *Chaetocnema pulicaria*, który przenosi je z jednej rośliny na drugą w okresie wegetacji, żerując na liściach [1]. Objawy choroby to zmiany nekrotyczne w postaci żółtych smug na liściach wzdłuż unerwienia, mogące rozprzestrzenić się na cały liść, małe nasiąknięte wodą plamy na łupinie kolb kukurydzy, gnicie łodygi i wędnięcie całej rośliny [57]. Bakterie lokalizują się w systemie naczyniowym rośliny i wytwarzają egzopolisacharydy powodujące zamknięcie naczyń, co doprowadza do wędnięcia całej rośliny [1].

Opisano szereg plazmidów *Pantoea stewartii*: pSW200, pSW500, pSW1200 oraz plazmidy koniugacyjne pSW100 i pSW800. Ich wielkość wahała się od 4000 do 318000 pz [58, 59]. Jednak żaden z tych plazmidów nie był systematycznie badany i nie stał się podstawą konstrukcji wektorów plazmidowych do badań.

4. Możliwość wykorzystania bakteriofaga P1 w infekcji patogenów roślin z rodzaju *Erwinia* i pokrewnych

Infekcyjność bakteriofaga P1 dla niektórych bakterii rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych stworzyła motywację do badań nad rozwojem P1 w komórkach tych bakterii (Tabela 1). W doświadczeniach nad bakteriami fitopatogennymi wykorzystywano mutanty faga P1, takie jak P1 *cI-100* Km, P1 *cI-100* Cm [60, 61]. Mutanty te posiadają allel *cI-100* genu *cI*, który koduje termowrażliwy represor fagowy C1. Dzięki mutacji *cI-100* w lizogenach można pod wpływem podwyższonej temperatury aktywować rozwój lityczny faga [10]. Niosą one również geny oporności na antybiotyki, Km – kanamycynę i Cm – chloramfenikol. Geny te wyrażają się w lizogenach P1, co umożliwia prostą i bezpośrednią selekcję lizogenów po infekcji bakterii fagiem.

Ogólna transdukcja przy pomocy P1 była wykorzystywana do mapowania chromosomu *E. coli*. Wykorzystanie transdukcji w badaniach bakterii innych gatunków pozwoliło na przyspieszenie tych badań, a tym samym na lepsze zrozumienie fizjologii i biologii molekularnej bakterii oraz mechanizmów ich patogenności [60, 62].

Szereg bakterii z rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych badano z wykorzystaniem mutantów P1 już od początku lat 70-tych. Wyniki dotychczasowych doświadczeń wzbogacają informacje na temat patogenności tych mikroorganizmów oraz ich genetyki i biologii.

Tabela 1. Strategie rozwoju bakteriofaga P1 w komórkach infekowanych bakterii z rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych.

Bakteria	Lizogenizacja	Produkcja faga	Odnosiniki
<i>Erwinia amylovora</i>	+	(-) +	62, 70
<i>Erwinia aroideae</i>	+	-	61
<i>Erwinia horticola</i>	+	(-) +	64, 70
<i>Dickeya dedantii</i>	+	-	61
<i>Pantoea stewartii</i>	+		71
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	+	-	60, 63, 64
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>atrosepticum</i>	+	-	61, 67

Wśród komórek szczepu *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* infekowanych fagiem P1 *cI-100* Km zaobserwowano wysoką częstość nabywania genu oporności na kanamycynę. Co więcej, po termoindukcji, zaobserwowano produkcję potomnych fagów P1 przez tak

otrzymane klony antybiotykooporne [60]. Późniejsze badania z wykorzystaniem tego samego mutantu faga potwierdziły jego zdolność przekazywania genów oporności na kanamycynę, ale po termoindukcji nie zaobserwowano produkcji potomnych fagów, co wskazuje na brak zdolności P1 do rozwoju litycznego w komórkach tej bakterii. Nie wykryto również, w komórkach kanamycynoopornych klonów, DNA P1 jako elementu pozachromosomalnego. Świadczy to o tym, że w lizogenach *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* profag P1 jest prawdopodobnie włączony do chromosomu bakteryjnego [63].

Fag P1 może nie tylko lizogenizować komórki *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Dodatkowo może też być dawcą transpozonu Tn9. Zostało to wykorzystane w mutagenizie kryptycznych plazmidów tego ważnego fitopatogena [64]. O kryptycznych plazmidach wiadomo tylko tyle, że posiadają moduł replikacyjny, a ich inne funkcje nie są znane [65]. Komórki *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* uzyskały oporność na chloramfenikol po transdukcji fagiem P1 *c1-100* Cm. Analiza restrykcyjna wykazała wstawienie fragmentu DNA P1 odpowiadającego Tn9 do plazmidu bakterii, dzięki pojawieniu się charakterystycznych miejsc restrykcyjnych dla transpozonu Tn9 oraz powiększeniu rozmiaru plazmidu. W DNA P1 *c1-100* Tn9, transpozon Tn9 występuje w dwóch tandemowych potównieniach. Bakterie posiadające plazmid z transpozonom były zdolne przeżyć przy stężeniu chloramfenikolu 100 µg/ml i większym, co wskazuje na nabycie przez nie obu lub nawet większej liczby kopii tego transpozonu. Dzięki wprowadzeniu Tn9 do DNA plazmidów *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* za pomocą faga P1 uzyskano markery selekcyjne pozwalające na dalsze badanie tych plazmidów [64].

Elementy genomu bakteriofaga P1 wykorzystano w mutagenizie *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* za pomocą hybrydowego faga Mu d1(Ap^r *lac cts62*)-P1. Bakteria ta jest odporna na infekcję fagiem Mu, z uwagi na brak na jej powierzchni receptorów dla tego faga. Zmodyfikowano genom Mu d1(Ap^r *lac cts62*) poprzez wprowadzenie drogą rekombinacji fragmentów genów kodujących włókna ogonka faga P1 w miejsce homologicznych fragmentów genów kodujących włókna ogonka faga Mu. Fag Mu, jest fagiem transpozycyjnym i może wbudowywać się w dowolne miejsce w chromosomie gospodarza. Jego pochodna, Mu d1(Ap^r *lac cts62*), niesie gen oporności na ampicylinę. Faga Mu d1(Ap^r *lac cts62*)-P1 uzyskano z podwójnego lizogenu *E. coli*, w którym profag Mu d1(Ap^r *lac cts62*) był wbudowany w chromosom, a P1 był obecny jako plazmid. Po indukcji rozwoju litycznego uzyskano hybrydowe fagi, którymi infekowano komórki *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Charakterystyczną cechą lizogenów Mu d1(Ap^r *lac cts62*) jest obecność na końcu genomu profaga, genów operonu *lac* pozbawionych własnego promotora. Operon ten może

więc tworzyć fuzję transkrypcyjną z promotorem, przed którym został wbudowany. W przypadku *P. carotovorum* uzyskano taką fuzję z promotorem genu *his*. Transkrypcja rozpoczynająca się od promotora *his* powodowała ekspresję operonu *lac*, co ujawniało się produkcją beta-galaktozydazy. *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* może wykorzystywać laktozę jako źródło węgla, ale z powodu represji katabolicznej nie ma wykrywalnej aktywności beta-galaktozydazy podczas wzrostu na pożywce minimalnej z glukozą. Obecność w komórkach fuzji Mu d1(Ap^r *lac cts62*) z funkcjonalnym promotorem chromosomu bakterii wyrażała się więc w komórkach rosnących na takiej pożywce zarówno przez produkcję beta-galaktozydazy jak i przez oporność transduktantów na ampicylinę. Ekspresja genu kodującego beta-galaktozydazę była aktywowana tak jak ekspresja operonu *his* u *Pectobacterium*, w warunkach niedoboru histydyny. Wyniki powyższych badań wskazują, że hybrydowy fag Mu d1(Ap^r *lac cts62*)-P1 może być użyty nie tylko jako mutagen *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, ale też jako narzędzie do badania regulacji ekspresji genów środowiskowych izolatów tej bakterii, w tym genów warunkujących jej patogenność [66].

Bakterie gatunków *D. dedantii*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* i *Erwinia aroideae* infekowane fagiem P1 *c1-100* Cm tworzyły na podłożu selekcyjnym z chloramfenikolem kolonie lizogenów, chociaż ich lizolelizacja zachodziła z mniejszą częstością niż lizogenizacja *E. coli*. Jednak w komórkach lizogenów nie zaobserwowano produkcji potomnych bakteriofagów ani spontanicznie ani po termoindukcji profaga [61].

Komórki *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* po infekcji fagiem P1 również tworzyły lizogeny, w których profag P1 *c1-100* Cm występował, w postaci plazmidu. Mimo, że lizogeny uzyskiwały oporność na chloramfenikol, była ona tracona po kolejnych podziałach komórkowych, co świadczy o niestabilnym dziedziczeniu plazmidu profaga. Utrata profaga następowała szybciej w niekorzystnych warunkach środowiska np. w podwyższonej temperaturze [67]. Pojawienie się profaga P1 w komórkach *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* wiązało się ze zjawiskiem tzw. konwersji lizogennej – nabyciem przez bakterie nowych cech, poprzez zakażenie bakteriofagiem, nawet bez udziału transdukcji [68]. Wyrazem konwersji było nabycie przez lizogeny *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* większej odporności na superinfekcję P1, oporności na bakteriocyny *Erwinia* i podwyższoną temperaturę oraz dwukrotnym zmniejszeniem szybkości wzrostu [67].

W komórkach *D. dedantii* zainfekowanych fagiem P1 *c1-100* Cm profag obecny był jako plazmid. Po przeniesieniu lizogenów do podwyższonej temperatury (37°C) również nie produkowały one potomnych fagów. Zamiast tego zmieniały się w długie nitkowate formy i zamierały. Po krótkotrwałej termoindukcji zaobserwowano podwyższoną oporność

lizogenów na promieniowanie UV [61]. Podobne reakcje komórek mają miejsce po indukcji odpowiedzi SOS bakterii, co sugeruje obecność produktów niekompletnej replikacji DNA faga w zaindukowanych lizogenach. Indukcję systemu SOS przez produkty niekompletnej replikacji P1 zaobserwowano również w przypadku komórek *E. coli* K-12, do których wprowadzono plazmidy mini-P1, pozbawione niektórych genów koniecznych dla prawidłowego przebiegu replikacji [69].

Zdolność bakteriofaga P1 *cI-100* CM do infekcji komórek *D. dedantii* umożliwiła wykorzystanie go jako wektora do wprowadzenia transpozonu Tn9 do komórek tej bakterii. Transpozon Tn9 z genomu faga ulegał transpozycji, jednak nie zaobserwowano pojawienia się zmian fenotypowych związanych z ewentualnym przerwaniem ciągłości chromosomalnych genów. Nie wiadomo, czy było to spowodowane preferencyjną transpozycją Tn9 w jedno miejsce w chromosomie, czy też w DNA kryptycznych plazmidów. W przypadku transpozycji z genomu faga P1 *cI-100* Km transpozonu Tn5, niosącego oporność na kanamycynę, zaobserwowano pojawienie się w komórkach *D. dedantii* mutacji genomowych związanych z transpozycją. P1 może zatem służyć jako wektor do wprowadzania elementów transpozycyjnych do genomu tego fitopatogena [61].

Po infekcji komórek *Erwinia amylovora* i *Erwinia horticola* za pomocą bakteriofaga P1 *cI-100* Cm uzyskano lizogeny odporne na chloramfenikol. Profaga P1 znajdował się w lizogenach w postaci plazmidu i współegzystował z podobnej wielkości kryptycznymi plazmidami *Erwinia*. Należą one do innych grup niezgodności niż P1, co zapewniało stabilną koegzystencję. W lizogenach wykazano ekspresję genu *cat* transpozonu Tn9, oraz genów kodujących systemy restrykcji-modyfikacji, partycji i addycji profaga P1. Mimo ekspresji tych genów traciły one profaga P1 z nieco większą częstością niż lizogeny *E. coli*. Jedynie w komórkach dwóch szczepów *E. horticola*, profaga P1 był stabilnie utrzymywany. Jednak traciły one marker oporności na antybiotyki, mimo zachowania plazmidu-profaga i związanej z obecnością profaga oporności na superinfekcję. Utrata markera antybio-tykooporności mogła wiązać się z delecją transpozonu Tn9. Próby indukcji profaga P1 w lizogenach szczepów *Erwinia* zakończyły się niepowodzeniem [70].

Badania nad *Pantoea stewartii* wskazują, że plazmidy spokrewnione z profagiem P1 występują naturalnie w komórkach niektórych szczepów tej bakterii. W jednym ze szczepów zidentyfikowano aż 13 plazmidów. Zawierają one geny związane z replikacją i mobilizacją. Region początku replikacji (*ori*) jednego z plazmidów (pSW1200; 106 tys. pz) został zsekwencjonowany. Okazało się, że koduje on białko w 73% identyczne z białkiem RepA bakteriofaga P1 i zawiera osiem iteronów (po 19 pz każdy) wysoce homologicznych z iteronami rejonu *oriR* plazmidu-profaga

P1. Podobnie do plazmidu profaga P1, pSW1200 występuje w komórkach w postaci jednej kopii na chromosom. Pochodny plazmid, pSW1201, posiada podobne cechy. Sklonowany iteron P1 może wykluczać pSW1201 z komórek bakterii, co świadczy o tym, że oba plazmidy należą do tej samej grupy niezgodności, IncY. Zidentyfikowano rejony plazmidu pSW1201 niezbędne dla jego replikacji i utrzymania w komórkach w jednej kopii na chromosom [71].

5. Podsumowanie

Łagodny bakteriofag P1, dzięki zdolności do infekcji bakterii reprezentujących określone gatunki rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych okazuje się pomocnym narzędziem w badaniach tych bakterii oraz modyfikacjach genetycznych ich komórek. Dzięki elementom swojego genomu takim jak gen kodujący represor funkcji litycznych, moduł replikacyjny i partycyjny, geny systemów restrykcji-modyfikacji oraz antyrestrykcji może on z powodzeniem lizogenizować szczepy bakterii wielu gatunków z rodziny *Enterobacteriaceae* i replikować w ich komórkach jako plazmid o niskiej liczbie kopii. W dotychczas przeprowadzonych eksperymentach udało się z sukcesem wykorzystać pochodne bakteriofaga P1 niosące elementy transpozycyjne, jako wektory wnoszące te elementy do komórek środowiskowych izolatów fitopato-genów z gatunku: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* i *D. dedantii*. Ponadto wykazano zdolność P1 do lizogenizacji komórek *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*, *D. dedantii*, *E. amylovora*, *Erwinia aroideae*, *Erwinia horticola* i *Pantoea stewartii*., w większości których podobnie jak w *E. coli* profag P1 jest stabilnie utrzymywany jako jednokopijowy plazmid. Chociaż nie zademonstrowano rozwoju litycznego P1 w komórkach wymienionych fitopatogenów, łatwość z jaką można wprowadzać DNA zawarte w wirionach P1 do ich środowiskowych izolatów jest przekonywującą motywacją do podejmowania dalszych badań w tej dziedzinie.

Literatura

1. Kado C.I. *Erwinia and related genera*, Prokaryotes., 6 (2006), s. 443-450
2. Stukenbrock E. A., McDonald B.A. *The origins of plant pathogens in agro-ecosystems*, Annual Review of Phytopathology., 46 (2008), s.75-100
3. Llop P., Barbe S., Lopez M.M. Functions and origin of plasmids in *Erwinia* species that are pathogenic to or epiphytically associated with pome fruit trees, *Trees* (Berl West)., 26 (2012), s. 31-46
4. Waleron M., Waleron K., Łojkowska E. Charakterystyka, identyfikacja, różnicowanie i taksonomia bakteryjnych patogenów roślin z rodzaju *Erwinia*, *Postępy Mikrobiologii.*, 43 (2004), s. 297-319

5. Yarmolinsky M.B., Strenberg N. *Bacteriophage P1*, The Bacteriophages, Plenum Press, New York. 1988, s. 310-311
6. Scott J. R., Kropf M., Mendelson L. *Clear plaque mutants of phage P7*, Virology 76 (1977), s. 39-46
7. Iida S., Arber W. Multiple physical differences in the genome structure of functionally related bacteriophages P1 and P7, Molecular and General Genetics., 173 (1979), s. 249-261
8. Lehnherr H. *Bacteriophage P1*, In R. Calendar (ed.), *The Bacteriophages*, in Press. Oxford University Press., (2004), s. 350-365
9. Yarmolinsky M.B. *Bacteriophage P1 in retrospect and in prospect*, Journal of Bacteriology., 186 (2004), s. 7025-7028
10. Łobocka M., Rose D.J., Plunkett G., Rusin M., Samojedny A., Lehnherr H., Yermolinsky M.B., Blattner F.R. *Genome of bacteriophage P1*, Journal of Bacteriology., 186 (2004), s. 7032-7068
11. Tock M.R., Dryden D.T.F. *The biology of restriction and anti- restriction*, Current Opinion in Microbiology, 8 (2005), s. 466-472
12. Iida S., Hiestand Nauer R., Sandmeier H., Lehnherr H., Arber W. Accessory genes in the darA operon of bacteriophage P1 affect antirestriction function, generalized transduction, head morphogenesis, and host cell lysis, Virology., 251 (1998), s. 49-58
13. Sandulache R., Prehm P, Kamp D. *Cell wall receptor for bacteriophage Mu G(+)*, Journal of Bacteriology., 160 (1984), s. 299-303
14. Liu J., Chen C., Shiomi D., Niki H., Margoloin W. Visualization of bacteriophage P1 infection by cryo-electron tomography of tiny Escherichia coli, Virology., 8 (2011)
15. Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. *Mikrobiologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2002), s. 142-145, 151-152
16. Young R. *Bacteriophage lysis: mechanism and regulation*, Microbiological Reviews. 56 (1992), s. 430-481
17. Chatteraj D.K. Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical, Molecular Microbiology., 37 (2000), s. 467-476
18. Funnell B.E., Phyllips G.J. *Plasmid biology*, American Society for Microbiology Press., 2004
19. Slavcev J.A., Funnell B.E. Identification and characterization of a novel allele of Escherichia coli dnaB helicase that compromises the stability of plasmid P1, Journal of Bacteriology., 187 (2005), s. 1227-1237
20. Łobocka M., Bugajska O., Dobruk A. *Partycja niskokopiowych plazmidów*, Kosmos., 51 (2002), s. 305-318
21. Funnell B.E., Gagnier L. The P1 plasmid partition complex at parS. II. Analysis of ParB protein binding activity and specificity, Journal of Biological Chemistry., 268 (1993), s. 3616-3624
22. Gazit, E., and R.T. Sauer. The Doc toxin and Phd antidote proteins of the bacteriophage P1 plasmid addiction system form a heterotrimeric complex, Journal of Biological Chemistry., 274 (1999), s. 16813-16818
23. Schlegel H.G. *Mikrobiologia ogólna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa., (2004), s. 181-190, 192-193, 357, 568-569

24. Salyers A.A., Whitt D.D. *Mikrobiologia. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, (2005), s. 146, 509-514
25. Blancard D., Lecoq H., and Pitrat M. *A colour atlas of cucurbit diseases: observation, identification and control*, Manson Publishing., 1994, s. 125, 143, 183
26. Daughtrey M.L., Wick R.L., Peterson J.L. *Compendium of flowering potted plants*, The American Phytopathological Society, 2006, s. 49-50
27. Gorb T.E., Kushkina A.L., Ivantisa T.V., Lysenko T.G., Tovkach F.I. *Structural stability of DNA of the transposon derivatives of pCA25 plasmid*, Mikrobiolohichnyj Zurnal - Journal of Microbiology., 72 (2) (2011), s. 53-57
28. Tovkach F.I., Isolation and preliminary characterization of cryptic plasmids from *Erwinia carotovora*, Mikrobiologiya., 70(6) (2001), s. 804-810
29. Currier T.C., Morgan M.K. Direct DNA repeat in plasmid R68.45 is associated with deletion formation and concomitant loss of chromosome mobilization ability, *Journal of Bacteriology.*, 150 (1982), s. 251-259
30. Cheravatiuk N.V.,Tovkach F.I. Effect of exogenous plasmid R68.45 on productive and lisogenic development of temperate bacteriophage ZF40 *Erwinia carotovora*, Mikrobiolohichnyj Zurnal - Journal of Microbiology., 68 (2006), s. 48-57
31. Cheravatiuk N.V., Tovkach F.I., Gorb T.E. *Method for transformation of Erwinia carotovora subsp. carotovora cells by plasmid pECL18*, Mikrobiolohichnyj Zurnal - Journal of Microbiology., 69 (2007), s. 35-41
32. Gawińska-Urbanowicz H. *Czarna nóżka- groźna choroba ziemniaka*, Wiadomości Rolnicze Polska, 5 (2007), s.8
33. Yang S., Peng Q., San Francisco M., Wang Y., Zeng Q., Yang C. H. Type III secretion system genes of *Dickeya dadantii* 3937 are induced by plant phenolic acids, *PLoS One.*,3 (2008)
34. Dickey R.S., Victoria J.I. *Taxonomy and emended description of strains of Erwinia isolated from Musa paradisiacal Linnaeus*, *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 30 (1980), s. 129-134
35. Dickey R.S. *Erwinia chrysanthemi*: reaction of eight plants to strains from several hosts and to strains of other *Erwinia* species, *Phytopathology.*, 71 (1981), s. 23-29
36. Basset A., Khush R. S., Braun A., Gardan L., Bocard F. , Hoffmann J. A., Lemaître B. *The phytopathogenic bacteria Erwinia carotovora infects Drosophila and activates an immune response*, *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 97 (2000), s.3376-3381
37. Wang J., Tseng Y.H. *Transformation of Erwinia chrysanthemi by Escherichia coli plasmids DNA*, *Chinese Journal of Microbiology and Immunology.*, 18 (1985), s. 115-122
38. Lacy G.H. Genetic studies with plasmid RP1 in *Erwinia chrysanthemi* strains pathogenic on maize, *Phytopathology.*, 68 (1978), s. 1323-1330
39. Monson R., Smith D.S., Matilla M.A., Roberts K., Richardson E., Drew A., Williamson N., Ramsay J., Welch M., Salmund G.P. *A plasmid-transposon*

- hybrid mutagenesis system effective in a broad range of Enterobacteria*, *Frontiers in Microbiology*, 6 (2015)
40. Bonn W.G., van der Zwet T. Distribution and economic importance of fire blight. Pages 37-55 in: *Fire Blight. The disease and its causative agent*, Erwinia amylovora, J. L. Vanneste, ed. Centre for Agriculture and Biosciences International Publishing., 2000, s. 37-55
 41. Van der Zwet T., Bonn W.G. *Recent spread and current worldwide distribution of fire blight*, *Acta Horticulturae*, 489 (1999), s. 167-168
 42. Puławska J., Kielak K., Sobiczewski P. *Phenotypic and genetic diversity of selected Polish Erwinia amylovora strains*, *Acta Horticulturae*, 704 (2006), s. 439-444
 43. Van der Zwet T., Beer S.V. *Fire blight-its nature, prevention, and control: A practical guide to integrated disease management*, U.S. Department of Agriculture, Agriculture Information Bulletin., 631 (1991), s. 5-59
 44. Johnson K.B. *Fire blight of apple and pear*, The Plant Health Instructor., 2000
 45. Paulin J.P. *Erwinia amylovora: general characteristics*. In: Vanneste JL (ed) *Fire blight. The disease and its causative agent*, Centre for Agriculture and Biosciences International Publishing., (2000), s. 87-115
 46. Smits T.H.M., Rezzonico F., Kamber T., Blom J., Goesmann A., Frey J.E., Duffy B. *Complete genome sequence of the fire blight pathogen Erwinia amylovora CFBP 1430 and comparison to other Erwinia spp*, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23 (2010), s.384-393
 47. Wang D., Korban S.S., Zhao Y. *Molecular signature of differential virulence in natural isolates of Erwinia amylovora*, *Phytopathology*, 100 (2009), s. 192-198
 48. Foster G.C., Gayle C., Jones A.L., Sundin G.W. *Nucleotide sequences, genetic organization, and distribution of pEU30 and pEL60 from Erwinia amylovora*, *Applied Environmental Microbiology*, 70 (2004), s. 7539-7544
 49. Llop P., Gonzalez R., Puławska J., Bultreys A., Dreo T., Lopez M.M. *The new plasmid pEI70 is present in Erwinia amylovora European strains*, *Acta Horticulturae*, 793 (2008), s. 131-136
 50. McGhee G.C., Jones A.L. *Complete nucleotide sequence of ubiquitous plasmid pEA29 from Erwinia amylovora strain Ea88:gene organization and intraspecies variation*, *Applied Environmental Microbiology*, 66 (2000), s. 4897-4907
 51. Palmer E.L., Teviotdale B.L., Jones A.L. *A relative of the broad-host-range plasmid RSF1010 detected in Erwinia amylovora*, *Applied Environmental Microbiology*, 63 (1997), s. 4604-4607
 52. Sebahia M., Bocsanczy A.M., Biehl B.S., Quail M.A., Perna N.T., Glasner J.D., DeClerck G.A., Cartinhour S., Schneider D.J., Bentley S.D., Parkhill J., Beer S.V. *Complete genome sequence of the plant pathogen Erwinia amylovora strain ATCC 49946*, *Journal of Bacteriology*, 192 (2010), s.2020-2021
 53. Chiou C.S., Jones A.L. *Nucleotide sequence analysis of a transposon (Tn5393) carrying streptomycin resistance genes in Erwinia amylovora and*

- other Gram-negative bacteria, *Journal of Bacteriology.*, 175 (1993), s. 732-740
54. McGhee G.C., Schnabel E.L., Maxson-Stein K., Jones B., Stromberg V.K., Lacy G.H., Jones A.L. *Relatedness of chromosomal and plasmid DNAs of Erwinia pyrifoliae and Erwinia amylovora*, *Applied Environmental Microbiology.*, 68 (2002), s. 6182-6192
 55. Powney R., Smits T.H.M., Sawbridge T., Frey B., Blom J., Frey J.E., Plummer K.M., Beer S.V., Luck J., Duffy B., Rodoni B. *Genome sequence of an Erwinia amylovora strain with pathogenicity restricted to Rubus plants*, *Journal of Bacteriology.*, 193 (2011), s. 785-786
 56. Coplin D.L., Rowan R.G., Chisholm D.A., Whitmoyer, R.E. *Characterization of plasmids in Erwinia stewartii*, *Applied Environmental Microbiology.*, 42 (1981), s. 599-604
 57. Pataky J.K. *Stewart's wilt of corn*, *The Plant Health Instructor.*, 2004
 58. Coplin D.L., Frederick R.D., McCammon, S.L. *Characterization of a conjugative plasmid from Erwinia stewartii*, *Journal of General Microbiology.*, 131 (1985), s. 2985-2991
 59. Fu J.F., Chang H.C., Chen Y.M., Chang Y.S., Liu S.T. *Characterization of the replicon of plasmid pSW500 of Erwinia stewartii*, *Molecular and General Genetics.*, 250 (1996), s. 699-704
 60. Murooka Y., Harada T. *Expansion of the host range of coliphage P1 and gene transfer from enteric bacteria to other Gram-negative bacteria*, *Applied and Environmental Microbiology.*, 38 (1979), s. 754-757
 61. Belisova N.A., Prokulevich V.A., Fomichev Ju.K. *Interactions of the phytopathogenic bacteria Erwinia whith phage P1 crl 100 Cml*, *Molecular Genetics, Microbiology and Virusology.*, 14 (1990), s. 14-18
 62. Goldberg R.B., Bender R.A., Streicher S.L. *Direct selection for P1- sensitive mutants of Enteric Bacteria*, *Journal of Bacteriology.*, 118 (1974), s. 810-814
 63. Jayaswal R.K., Bressan R.A., Handa A.K. *Behavior of bacteriophage P1 in Erwinia carotovora subsp. carotovora*, *Current Microbiology.*, 12 (1985), s. 73-78
 64. Sergejeva Zh.Yu., Burova L. M., Tovkach F.I. *Introduction of transpozon Tn9 to endogenic plasmids of Erwinia carotovora at lizogenization of cells by coliphage P1*, *Mikrobiolohicznyj Zurnal - Journal of Microbiology.*, 68 (2006), s. 34-39
 65. Włodarczyk M. *Co to jest plazmid*, *Kosmos.*, 51 (2002), s. 231-240
 66. Jayaswal R.K., Bressan R.A., Handa A.K. *Mutagenesis of Erwinia carotovora subsp. carotovora with bacteriophage Mu d1(Apr lac cts62): construction of his-lac gene fusions*, *Journal of Bacteriology.*, 158 (1984), s. 764-766
 67. Burova L.M. Tovkach F.I. *Expresion of genes of prophage P1 Escherichia coli in cells of phytopathogenic Erwinia*, *Mikrobiolohicznyj Zurnal - Journal of Microbiology.*, 68 (2006), s. 39-47
 68. Kunicki-Goldfinger W.J.H. *Życie bakterii*, *Wydawnictwo Naukowe PWN*, Warszawa, (1994), s. 111, 331-333, 335, 434-435
 69. Capage M.A., Scott J.R. *SOS induction by P1 Km miniplasmids*, *Journal of Bacteriology.*, 155 (1983), s. 473-480

70. Faidiuk I.V., Tovkach E.I. *Phytopathogenic bacteria phenotype conversion as a result of their lysogenisation by coliphage P1*, Mikrobiolohichnyj Zhurnal - Journal of Microbiology., 76 (2014), s. 59-66
71. Fu J.F., Ying S.W., Lui S.T. *Cloning and characterization of the ori region of pSW1200 of Erwinia stewartii: similarity with plasmid P1*, Plasmid., 38 (1997), s. 141-147

Interakcje bakteriofaga P1 z komórkami wybranych patogenów roślin z rodzaju *Erwinia* i rodzajów pokrewnych

Streszczenie

Bakteriofag P1 to łagodny fag mający szeroki zakres gospodarzy. Są to głównie bakterie Gram ujemne z rodziny *Enterobacteriaceae*. Po infekcji, P1 może je lizogenizować, pozostając w cytoplazmie jako niskokopiowy plazmid-profag. Ważną rolę podczas lizogenii spełniają określone elementy genomu P1, w tym gen kodujący represor C1, geny systemu restrykcji-modyfikacji i antyrestrykcji oraz moduł replikacyjny i partycyjny. Indukcja profaga w lizogenach zapoczątkowuje rozwój lityczny P1. Do gospodarzy P1 należą szczepy szeregu gatunków fitopatogenów z rodzaju *Erwinia* oraz rodzajów pokrewnych, powodujące duże straty gospodarcze w rolnictwie. Mechanizmy ich patogenności nie są jeszcze do końca poznane. P1 nie tylko lizogenizuje te bakterie, ale również umożliwia badanie ich genetyki i fizjologii. Istotną rolę w tych badaniach odgrywa transdukcja ogólna z pomocą faga P1, wykorzystanie faga P1 jako dawcy transpozonów i genów oporności na antybiotyki, a także jako wektora do klonowania dużych fragmentów DNA i regulowanej ekspresji genów.

Słowa kluczowe: bakteriofag P1, lizogenia, profag, transdukcja ogólna, *Erwinia*

Interaction of bacteriophage P1 with cells of selected plant pathogens of the genus *Erwinia* and related genera

Abstract

Bacteriophage P1 is a temperate phage of wide host range. Its hosts are mainly Gram-negative bacteria from the *Enterobacteriaceae* family. After infection, P1 can lysogenize them remaining in a cytoplasm as a low-copy-number plasmid-prophage. Certain elements of P1 genome play an important role during lysogeny: a gene encoding the C1 repressor, genes of restriction-modification and antirestriction system, and replication and partition module among them. Prophage induction in lysogens initiates phage lytic development. Strains of numerous species of phytopathogens of the genus *Erwinia* and related genera are among the hosts of P1. They cause large economic losses in agriculture, but mechanisms of their pathogenicity are still not completely understood. P1 not only lysogenizes these bacteria, but also enables to study their genetics and physiology. The P1-mediated general transduction, the use of P1 as a donor of transposons and antibiotic resistance genes, as well as a vector for cloning of large DNA fragment and for the regulated gene expression play a significant role in these studies.

Keywords: bacteriophage P1, lysogeny, prophage, general transduction, *Erwinia*

Charakterystyka bakterii z rodzaju *Xenorhabdus*

1. Wstęp

Rodzaj *Xenorhabdus* skupia ponad dwadzieścia gatunków enterobakterii wchodzących w symbiozę mutualistyczną z nicieniami z rodziny *Steinernematidae*. Bakterie wykorzystują nicienie jako wektory do przeniesienia do organizmu owada, który następnie infekują. Jak dotąd nie znaleziono wolnożyjących *Xenorhabdus* spp., tak więc przyjmuje się że w warunkach naturalnych są one w stanie dłużej przeżyć tylko w stanie symbiotycznym. Podobnie nicienie *Steinernema* spp. w warunkach naturalnych zawsze związane są z jakimś gatunkiem *Xenorhabdus*. Zarówno bakterie, jak i nicienie entomopatogeniczne budzą duże zainteresowanie, gdyż są wykorzystywane jako bardzo efektywne biologiczne środki ochrony roślin. W związku z tym od wielu lat są przedmiotem licznych badań naukowych.

2. Cykl życiowy entomopatogenicznych nicieni z rodzaju *Steinernema*, a ich interakcje z bakteriami z rodzaju *Xenorhabdus*

Bakterie z rodzaju *Xenorhabdus* żyją w dwóch różnych środowiskach. Jednym z nich jest układ pokarmowy nicieni entomopatogenicznych z rodzaju *Steinernema*, a drugim hemolimfa, a następnie tkanki rozkładającego się ciała owada. Nicienie *Steinernema* są naturalnymi patogenami larw owadów żyjących w glebie, w których przechodzą niemal cały cykl

¹ marskow@kul.pl, Laboratorium Biokontroli, Produkcji i Aplikacji EPN, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

² esajnaga@kul.pl, Laboratorium Biokontroli, Produkcji i Aplikacji EPN, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

³ wklublin@tlen.pl, Laboratorium Biokontroli, Produkcji i Aplikacji EPN, Interdyscyplinarne Centrum Badań Naukowych, Wydział Biotechnologii i Nauk o Środowisku, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II, www.kul.pl

⁴ adrianw2@poczta.umcs.lublin.pl, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, www.umcs.pl

rozwojowy. Jedynym stadium rozwojowym zdolnym do opuszczenia tego środowiska, a następnie przetrwania przed dłuższy czas w glebie, jest trzecie stadium larwalne, tzw. larwa infekcyjna (IJ). Stadium to penetruje powierzchnią warstwę gleby w poszukiwaniu przebywających tam owadów. Symbionty bakteryjne zasiedlają specjalną strukturę górnego fragmentu przewodu pokarmowego nicieni – pęcherzyk jelitowy [1]. Bakterie są w tym środowisku nieruchome, chociaż potencjalnie są obdarzone zdolnością do ruchu. IJ infekują napotkane larwy owadów bytujących w glebie, wnikając do ich ciała poprzez naturalne otwory układu pokarmowego, a następnie, przebijając się przez ścianę jelita, przedostają się do hemocelu, gdzie uwalniają symbionty bakteryjne na drodze defekacji [2]. Wyniki niektórych badań nad *S. carpocapsae* wskazują, że do uwalniania części bakterii (*X. nematophila*), może dochodzić już w jelicie owada, po kilku godzinach od pojawienia się nicienia w jego układzie pokarmowym [3].

Proces uwolnienia bakterii zapoczątkowuje wychodzenie larw infekcyjnych z diapauzy (ang. *recovery*). Nie odżywiające się, nie rosnące i nie rozmnażające się dotychczas larwy infekcyjne nicieni rozwijają się w dojrzałe samce i samice. Bakterie *Xenorhabdus* po uwolnieniu zaczynają syntetyzować szereg substancji umożliwiających szybki rozwój zarówno samych bakterii jak i nicieni. Niektóre z tych produktów umożliwiają przełamanie wrodzonego systemu obrony immunologicznej owada oraz zapewniają bakteriom przewagę konkurencyjną, umożliwiając szybkie opanowanie środowiska, pomimo początkowej obecności w nim bogatej gatunkowo naturalnej mikroflory jelitowej owada. Stosunkowo dobrze poznanym w tym zakresie gatunkiem jest *X. nematophila*. Stwierdzono, że bakterie te są zdolne do hamowania procesu nodulacji – jednego z ważnych mechanizmów odpornościowych owadów, poprzez wytwarzanie inhibitorów owadziej fosfolipazy A_2 , enzymu niezbędnego do dojrzewania guzków [4]. Przypuszcza się też, że ten gatunek bakterii ma zdolność do hamowania ekspresji genów odpowiadających za syntezę antybakteryjnych peptydów CAMP [5]. W skład błony komórkowej bakterii *Xenorhabdus* wchodzi też lipopolisacharyd, którego fragment – lipid A, jest toksyczny w stosunku do hemocytów [6]. Kolejnymi substancjami wytwarzanymi przez *X. nematophila* są toksyny XaxA/XaxB [7]. Stwierdzono, że ich iniekcja jest letalna dla wielu gatunków owadów, wykazują też toksyczność względem różnych linii komórkowych insektów. Kolejną, stosunkowo dobrze poznaną grupą substancji wytwarzanych m.in. przez *X. nematophila*, są toksyny Tc. Podawane oralnie powodują szybkie zahamowanie żerowania i śmierć owadów. Ich działanie polega m.in. na tworzeniu porów w błonach komórkowych [8]. Zazwyczaj larwa owada ginie w ciągu 24-48 godzin od momentu wniknięcia larwy infekcyjnej do jej organizmu. Również w przypadku wprowadzenia do hemolimfy owada samych bakterii z rodzaju *Xenorhabdus*, już ich niewielka liczba (powyżej 5 CFU na 1 larwę owada)

są w stanie wywołać infekcję i doprowadzić do śmierci larwy po 48-72 godzinach [5]. Udowodniono jednak, że do śmierci owada przyczyniają się zarówno bakterie, jak i nicienie, a wirulencja układu nicien-bakteria (dla *S. feltiae* i *X. bovi*) ma charakter synergiczny – jest wyższa od sumy wirulencji cząstkowych, gdy organizmy te działają osobno [9].

Bakteryjne symbionty nicieni *Steinernema* wytwarzają też substancje o właściwościach antybakteryjnych, hamujące wzrost innych bakterii entomopatogenicznych z rodzajów *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*, bądź też bakterii gospodarza. Ksenorabdycyna, wytwarzana przez *Xenorhabdus nematophila*, hamuje rozwój innych szczepów *Xenorhabdus*, *Photorhabdus luminescens* oraz bakterii z rodzaju *Proteus* [10]. Do produktów metabolizmu wtórnego wytwarzanych przez bakterie *Xenorhabdus* i hamujących wzrost bakterii można zaliczyć m.in. ksenokumacynę, nematofinę, pochodne indolu oraz benzylideneaceton [11, 12]. Niektóre gatunki mogą syntetyzować wiele tego typu substancji. W przypadku *X. nematophila* stwierdzono na przykład wytwarzanie 4 różnych związków [11]. Wraz z namnażaniem się bakterii w ciele owada, ich aktywność antybakteryjna stopniowo rośnie, osiągając maksimum między trzecim a piątym dniem od początku infekcji, już po śmierci żywiciela. Obecność związków przeciwdrobnoustrojowych powoduje, że w martwym ciele owada, gatunek zakażający stanowi dominujący, a często nawet jedyny wykrywany rodzaj bakterii. Równocześnie zachodzi proces namnażania nicieni, odżywiających się zarówno substancjami odżywczymi pochodzącymi z rozkładanych przez enzymy bakteryjne tkanek owada, jak też samymi bakteriami. W zależności od ilości dostępnego pokarmu powstaje od 1 do 3 pokoleń potomnych [13]. Wyczerpywanie się dostępnych składników pokarmowych indukuje rozwój nowego pokolenia larw infekcyjnych, które pobierają bakterie *Xenorhabdus* do swojego przewodu pokarmowego, gdzie następnie się one namnażają, osiągając liczebność od 50 do 100 pałeczek w pojedynczej larwie [2]. Rozwój bakterii w pęcherzyku jelitowym nicieni entomopatogenicznych świadczy o tym, że mają tam one dostęp do substancji odżywczych. W przypadku *S. carpocapsae* stwierdzono tam obecność wolnych aminokwasów oraz witamin [14]. Zaobserwowano też, że akseniczne larwy infekcyjne *S. carpocapsae* żyją dłużej niż larwy zawierające bakterie, co świadczyłoby o tym, że rozwijające się bakterie wykorzystują część zasobów pokarmowych zmagazynowanych w organizmie larwy infekcyjnej [15]. W czasie wykształcania dojrzałego stadium II u larw zanika torebka gębowa, a układ pokarmowy staje się niedrożny [16]. Po osiągnięciu tego stadium nicienie zawierające symbionty bakteryjne masowo opuszczają martwe ciało owada, migrując do gleby. W przypadku nicieni *Steinernema* spp. cały proces zajmuje 10-14 dni, a następnie nicienie mogą przetrwać w glebie do półtora roku, nie tracąc zdolności do porażania owadów [17].

3. Charakterystyka fenotypowa bakterii *Xenorhabdus*

Bakterie z rodzaju *Xenorhabdus* to ruchliwe, urzęsione perytrychalnie, nie tworzące spor, Gram-ujemne pałeczki, o wielkości ok. 0,3-2 μm x 2-10 μm . Są przystosowane do bytowania w środowisku ubogim w tlen, jakim są rozkładające się tkanki owada, dlatego też, podobnie jak pozostałe enterobakterie, należą do względnych beztlenowców [13]. Nie wytwarzają katalazy oraz oksydazy cytochromowej. Ujemny wynik testu na katalazę oraz brak zdolności do bioluminescencji są cechami pozwalającymi w prosty sposób odróżnić bakterie *Xenorhabdus* od innej grupy symbiontów nicieni entomopatogenicznych – bakterii *Photorhabdus*. W stacjonarnej fazie wzrostu w komórkach często występują krystaliczne inkluzje białkowe. Optimum temperaturowe wynosi około 28°C lub mniej, nieliczne szczepy osiągają 40°C. Większość szczepów *Xenorhabdus* jest lizogenna [18], co może powodować problemy związane z brakiem stabilności izolatów.

Charakterystyczną cechą symbiontów nicieni entomopatogenicznych jest ich występowanie w dwóch wariantach fenotypowych. Bakterie fazy I (pierwotnej) występują w larwach infekcyjnych nicieni oraz następnie w zainfekowanym ciele owada. Natomiast faza II (wtórna) może występować na dalszym etapie porażenia owada. Do przemiany bakterii *Xenorhabdus* z fazy I do fazy II dochodzi też często w trakcie ich hodowli w warunkach sztucznych, co zazwyczaj jest procesem niekorzystnym, gdyż za wytwarzanie związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym oraz enzymów zewnątrzkomórkowych zdolnych do hydrolizy różnego rodzaju związków organicznych odpowiadają bakterie znajdujące się w fazie pierwotnej [16, 19]. Bakterie w tej fazie, w odróżnieniu od bakterii w fazie II, tworzą też ciała inkluzyjne zawierające białka IP1 i IP2. Przypuszczalnie zwiększają one wartość odżywczą bakterii [5].

Wg niektórych doniesień bakterie *Xenorhabdus* w różnych fazach rozwojowych różnią się też urzęsieniem. Zaobserwowano, że *X. nematophila* i *X. bovienii* w fazie pierwotnej posiadają fimbrie i flagelle, natomiast w fazie wtórnej stwierdzono brak, bądź też znacznie zredukowaną liczbę tych struktur [20]. W przypadku *X. nematophila* zaobserwowano, że bakterie, w których zaszła rewersja z fazy II do fazy I odzyskiwały zdolność ruchu [21]. Bakterie *Xenorhabdus* w fazie pierwotnej są też zdolne do adsorpcji niektórych barwników. Ta cecha pozwala w prosty sposób ustalić aktualny wariant fenotypowy danego szczepu bakterii. Zazwyczaj stosuje się w tym celu podłoże NBTA (z błękitem bromotymolowym) lub podłoże MacConkey (z czerwienią obojętną). Zaobserwowano też inne różnice fizjologiczne pomiędzy bakteriami w różnych fazach. W przypadku *X. nematophila* ustalono, że bakterie w fazie II charakte-

ryzują się bardziej efektywnym metabolizmem oddechowym. Aktywność głównych enzymów łańcucha oddechowego była od 15% do 100% wyższa w bakteriach będących w fazie II. Komórki fazy II charakteryzowały się też wyższą o 20% trans-membranową siłą protonomotoryczną, 5-krotnie wyższym tempem asymilacji białek oraz krótszym czasem potrzebnym do rozpoczęcia fazy wzrostu po wprowadzeniu bakterii do bogatego w składniki pokarmowe podłoża [22].

Jak dotąd nie poznano w pełni mechanizmów indukujących zmianę wariantu fizjologicznego bakterii *Xenorhabdus*. Wiadomo jednak, że rewersję do fazy I wywołuje czynnik znajdujący się w hemolimfie. Bakterie *X. boviens*, będące w fazie II, przechodzą przemianę do fazy I, jeżeli w podłożu Luria-Bertani bądź bulionie odżywczym znajdzie się dodatek hemolimfy z larw *Galleria mellonella*. Rewersja ma też miejsce, gdy bakterie znajdują się w samej hemolimfie, natomiast w podłożach bez jej dodatku do niej nie dochodzi. Czynnik indukujący przemianę znajduje się też w podłożu Schneidera z dodatkiem 10% serum płodowego z cieląt (ang. *fetal bovine serum*). Bakterie *X. boviens* wprowadzone do takiego podłoża również powracają do fazy I [23]. Stwierdzono też, że przemianę bakterii *Xenorhabdus* w przeciwnym kierunku indukują niektóre warunki stresowe, takie jak brak tlenu czy stres osmotyczny [20]. Prawdopodobnie faza I związana jest z lepszym przystosowaniem do środowiska bogatego w substancje odżywcze, a faza II z przystosowaniem do ograniczonych, malejących zasobów pokarmowych, a następnie warunków głodowych [24].

4. Klasyfikacja i molekularna filogeneza bakterii *Xenorhabdus*

Pierwszego bakteryjnego symbionta nicieni entomopatogenicznych wyizolowano z *S. carpocapsae* w 1965 roku. Pierwotnie nosił on nazwę *Achromobacter nematophila*, lecz później w związku z przeniesieniem do nowopowstałego rodzaju *Xenorhabdus* jego nazwę zmieniono na *Xenorhabdus nematophilus*, a następnie poprawiono na *Xenorhabdus nematophila* [25]. W początkowej fazie rodzaj *Xenorhabdus* (z gr. *xenos* – nieproszony gość, pasożyt) zawierał dwa gatunki: *X. nematophila* (symbionty nicieni rodziny *Steinernematidae*) i *X. luminescens* (symbionty nicieni rodziny *Heterorhabditidae*), lecz w 1993 roku zgromadzone wyniki badań fenotypowych jak i hybrydyzacji DNA/DNA dały podstawę do utworzenia dla drugiego wymienionego gatunku nowego rodzaju *Photorhabdus* i przemianowania go na *P. luminescens* [26]. Od tego czasu rodzaj *Xenorhabdus* skupia wyłącznie mikrosymbionty żyjące w symbiozie z nicieniami rodziny *Steinernematidae*, zaś lista gatunków tego rodzaju stale się powiększa. Obecnie wyróżnia się 23 gatunki *Xenorhabdus* aczkolwiek wielu izolatów tej pory nie oznaczono (Tab. 1).

Tabela 1. Lista gatunków bakterii należących obecnie do rodzaju *Xenorhabdus* wraz z ich gospodarzami symbiotycznymi

Gatunek bakterii z rodzaju <i>Xenorhabdus</i>	Literatura	Gatunek nicienia z rodzaju <i>Steinernema</i>
<i>X. beddingii</i>	26	nieoznaczony
<i>X. bovienii</i>	26, 34, 43	<i>S. feltiae</i> , <i>S. kraussei</i> , <i>S. affinae</i> , <i>S. intermedium</i> , <i>S. weiseri</i> , <i>S. silvaticum</i> , <i>S. sichuanense</i> ,
<i>X. budapestensis</i>	44	<i>S. bicornutum</i> , <i>S. ceratophorum</i>
<i>X. cabanillasii</i>	34	<i>S. riobrave</i>
<i>X. doucetiae</i>	34	<i>S. diaprepesi</i>
<i>X. ehlersii</i>	44	<i>S. longicaudum</i>
<i>X. griffiniae</i>	34	<i>S. hermaphroditum</i>
<i>X. hominickii</i>	34	<i>S. kariii</i> , <i>S. monticolum</i>
<i>X. indica</i>	33	<i>S. thermophilum</i> , <i>S. abbasi</i>
<i>X. innexi</i>	44	<i>S. scapterisci</i>
<i>X. ishibashii</i>	41	<i>S. aciari</i>
<i>X. japonica</i>	45	<i>S. kushidai</i>
<i>X. khoisanae</i>	42	<i>S. khoisanae</i>
<i>X. koppenhoeferi</i>	34	<i>S. scarabaei</i>
<i>X. kozodoii</i>	34	<i>S. arenarium</i> , <i>S. apuliae</i>
<i>X. magdalenensis</i>	40	<i>S. australe</i>
<i>X. mauleonii</i>	34	nieoznaczony
<i>X. miraniensis</i>	34	nieoznaczony
<i>X. nematophila</i>	46	<i>S. carpocapsae</i>
<i>X. poinarii</i>	47	<i>S. glaseri</i> , <i>S. cubanum</i>
<i>X. romanii</i>	34	<i>S. puertoricense</i>
<i>X. stockiae</i>	34	<i>S. siamkayai</i>
<i>X. szentirmaii</i>	44	<i>S. rarum</i>
<i>X. vietnamensis</i>	39	<i>S. sangi</i>

Źródło: Opracowanie własne

Rodzaj *Xenorhabdus* należy do rodziny *Enterobacteriaceae* wchodzącej w skład gamma-proteobakterii. Analiza sekwencji genu 16S rDNA wykazała, że bakterie należące do rodzaju *Xenorhabdus* są najbliższym spokrewnionym z rodzajem *Photorhabdus* – identyczność sekwencji tego genu wynosi ponad 94%. Bakterie tych dwóch rodzajów są stosunkowo nietypowymi członkami rodziny *Enterobacteriaceae* pod względem fenotypowym, np. nie redukują azotanów do azotynów. Dodatkowo, bakterie

rodzaju *Xenorhabdus* nie wykazują aktywności katalazy, jako jedyne w rodzinie *Enterobacteriaceae*. Na podstawie hybrydyzacji DNA/DNA stwierdzono, niski poziom podobieństwa genomowego z *E. coli* (ok. 4%), typowym gatunkiem dla tej rodziny [27]. Przynależność *Xenorhabdus* spp. do *Enterobacteriaceae* potwierdza jednak obecność charakterystycznego antygeny jak i analiza filogenetyczna oparta na sekwencji genu kodującego 16S rRNA [28, 29].

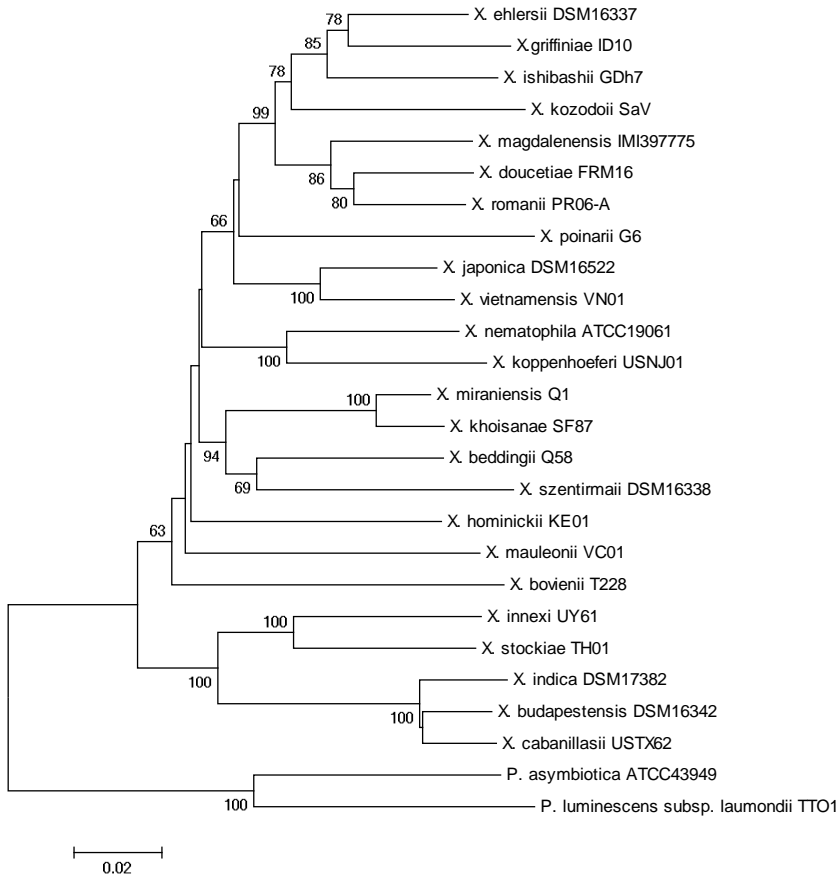
Przedstawiciel typowego gatunku rodzaju *Xenorhabdus*, szczep *X. nematophila* ATCC19061, posiada genom o wielkości 4 432 590 pz, który zawiera 7 operonów RNA i 79 genów kodujących tRNA. Zawartość par G+C w genomie tej bakterii wynosi 44,2%. Najbardziej prawdopodobna liczba otwartych ramek odczytu (ORF) kodujących białka to 4 299. *X. nematophila* ATCC19061 zawiera jeden duży plazmid o wielkości 155 327 pz, zawierający około 175 genów kodujących białka. Wielkość genomów i skład genomów innych szczepów *Xenorhabdus* wykazuje duże podobieństwo, aczkolwiek nie zawsze zawierają one plazmidy [30].

Obecnie szybka identyfikacja bakterii rodzaju *Xenorhabdus* jak i analiza ich różnorodności jest najczęściej przeprowadzana, tak jak w przypadku innych bakterii, za pomocą analizy polimorfizmu genu kodującego 16S rRNA, co jest bardziej wiarygodne i mniej pracochłonne niż przeprowadzanie licznych testów fenotypowych. Na podstawie sekwencji genu kodującego 16S rRNA szczepy *Xenorhabdus* mogą być łatwo rozróżnione od bakterii należących do rodzaju *Photorhabdus* poprzez unikalną sekwencję TTCG w pozycji 208-211 tego genu (numeracja względem *E. coli*) i od rodzaju *Proteus* (następny najbliższy członek rodziny), który posiada dłuższą wersję tej sekwencji (TGAAAG) [31]. W przypadku identyfikacji dużej liczby entomopatogenicznych bakterii dobre rezultaty uzyskano stosując metodę 16S rDNA RFLP [28]. Analiza filogenetyczna sekwencji genu kodującego 16S rRNA po raz pierwszy dla bakterii rodzaju *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* została przeprowadzona przez Liu i wsp. w 1997 roku i do tej pory jest rutynowym podejściem przy identyfikacji bakterii z rodzaju *Xenorhabdus*, opisywaniu ich ewolucji jak i oznaczaniu nowych gatunków [29, 32-36]. Filogenetyczna analiza sekwencji genu kodującego 16S rRNA 76 szczepów różnych gatunków *Xenorhabdus* wykazała ich wysoki stopień konserwatywności w obrębie rodzaju (powyżej 95% identyczności), co powoduje że analiza genu 16S rDNA nie zawsze daje wiarygodne rezultaty przy klasyfikacji tych bakterii na poziomie gatunku i podgatunku [34].

Gen kodujący 16S rRNA nie jest idealnym markerem molekularnym przy klasyfikacji bakterii nie tylko ze względu na wysoką konserwatywność sekwencji, ale także z powodu zróżnicowanej liczby kopii tego genu u różnych gatunków bakterii, różnic w sekwencji w obrębie jednego

genomu jak i możliwości horyzontalnego transferu [37, 38]. Z tego względu obecnie coraz częściej klasyfikacja entomopatogenicznych bakterii oparta na analizie sekwencji 16S rDNA jest weryfikowana wielolokusową analizą sekwencji (MLSA, z ang. multilocus sequence analysis) (Rys. 1). Polega ona na analizie filogenetycznej połączonej sekwencji kilku genów (zwykle od 4 do 6) z różnych fragmentów genomu, występujących w jednej kopii, które kodują białka niezbędne do funkcjonowania komórki (ang. housekeeping genes). Uważa się że technika ta może w pewnym stopniu zastąpić czasochłonną hybrydyzację DNA/DNA, która do tej pory stanowiła kluczową rolę w badaniach taksonomicznych organizmów prokariotycznych. Zastosowanie MLSA zaowocowało wyodrębnieniem nowych kilku gatunków *Xenorhabdus*, takich jak: *X. vietnamensis* [39], *X. magdalenensis* [40], *X. ishibashii* [41] i *X. khoisanæ* [42]. W badaniach polegających na analizie połączonej sekwencji 4 genów *recA*, *gyrB*, *dnaN* i *gltX* kodujących, odpowiednio, rekombinazę A, gyrazę B, podjednostkę β polimerazy III DNA i syntetazę glutamyl-tRNA wykazano, że szczepy *Xenorhabdus* wykazujące poniżej 97% identyczności takiej sekwencji nie powinny należeć do tego samego gatunku [39].

W badaniach filogenetycznych bakterii coraz większe znaczenie ma analiza sekwencji całych genomów. Na podstawie analizy porównawczej genomów dwóch przedstawicieli *Xenorhabdus* spp. (*X. nematophila* ATCC19061, *X. bovienii* SS-2004) i dwóch *Photorhabdus* spp. (*P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01, *P. asymbiotica* ATCC43949) stwierdzono, że pomimo ogólnego podobieństwa bakterii tych rodzajów w sposobie bytowania i bliskim pokrewieństwie filogenetycznym ich genomy cechują się dużą dywergencją i związanymi z tym znaczącymi różnicami w molekularnych mechanizmach wchodzenia w efektywne związki mutualistyczne [30]. Wyniki tej pracy, jak i fakt że gospodarze nicieniowi bakterii tych dwóch rodzajów nie są blisko spokrewnieni wskazują, że prawdopodobnie bakterie *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* wyewoluowały stosunkowo niedawno (ok. 250-500 mln lat temu) od wspólnego przodka, który wykazywał zdolność kolonizacji zarówno *Steinernema* jak i *Heterorhabditis*, lecz dłuższe funkcjonowanie w złożonym systemie symbiont-pasożyt-żywiciel wymusiło przystosowanie do jednego typu gospodarza, co w rezultacie zaowocowało ewolucją konwergentną tych dwóch grup bakterii.



Rysunek 1. Drzewo filogenetyczne gatunków *Xenorhabdus* oparte na połączonej sekwencji sekwencji genów *recA*, *gltX*, *gyrB* i *dnaN* (2986 pz). Filogram skonstruowano w oparciu o model złożony największej wiarygodności i metodę najbliższego sąsiada w programie MEGA6. Do przyrównania sekwencji użyto programu ClustalW. Wiarygodność grupowania określono na podstawie 1000-krotnego samo próbkowania. Zamieszczono wskaźniki poparcia ≥ 50 . Skala przedstawia ilość substytucji nukleotydowych w przeliczeniu na 1 pozycję w sekwencji [opracowanie własne].

5. Koewolucja nicieni *Steinernema* i bakterii *Xenorhabdus*

Rodzina *Steinernematidae* jest obecnie reprezentowana przez ponad 80 gatunków nicieni. Wszystkie zaliczane są do 1 rodzaju – *Steinernema*. Filogeneza oparta na analizie różnych fragmentów DNA (domeny D2D3 LSU rDNA, ITS1 i ITS2 rDNA) [48, 49] wskazuje na występowanie w tym rodzaju 5 kładów nicieni o zbliżonej morfologii. Do kladu I – *carpocapsae-scapterisci-tami* zaliczane są nicienie o najkrótszych larwach infekcyjnych (400-600 μm), niewielkim, kulistym, cienkościennym pęcherzyku bakte-

ryjnym i 6 polach bocznych. Kład II – *affine-intermedium* – to nicienie o larwach infekcyjnych średniej długości (600-800 μm), z dużym, cienkościennym pęcherzykiem bakteryjnym i 8 polami bocznymi. Do kładu III – *feltiae-kraussei-oregonense* – zalicza się liczną grupę gatunków nicieni o larwach infekcyjnych długości 800-1000 μm , z niewielkim, grubościennym pęcherzykiem bakteryjnym i 8 polami bocznymi. Kład IV tworzą te gatunki entomopatogenicznych nicieni, których larwy infekcyjne mają na przednim odcinku ciała strukturę przypominającą róg. Do ostatniego, V kładu – *arenarium-glaseri-longicaudum* – należą nicienie o najdłuższych larwach infekcyjnych (> 1000 μm).

Przeprowadzone analizy filogenetyczne bakterii z rodzaju *Xenorhabdus* [36, 50] i nicieni z rodzaju *Steinernema* [48, 49] wskazują na koewolucję symbiontów. Topologia drzew filogenetycznych obydwu symbiontów wydaje się wysoce zbieżna dla większości układów nicien-bakteria. Każdy bowiem gatunek nicieni entomopatogenicznych z rodzaju *Steinernema* jest symbiotycznie związany tylko z 1 gatunkiem bakterii z rodzaju *Xenorhabdus*. Symbioza różnych gatunków *Xenorhabdus* może być ograniczona do jednego gatunku nicieni (np. *X. duocetiae* i *S. diaprepesi*) [34]. Takie przypadki są jednak nieliczne i wynikają prawdopodobnie z niedostatecznego stanu wiedzy, zarówno o bioróżnorodności entomopatogenicznych nicieni, jak i związanych z nimi symbiotycznie bakterii (symbiont bakteryjny jest znany dla ok. 40% opisanych gatunków *Steinernema*). Częściej określone gatunki bakterii z rodzaju *Xenorhabdus* są związane z kilkoma gatunkami *Steinernema*, zwykle należącymi do 1 kładu nicieni. Taki związek mutualistyczny tworzą np. *X. kozodoii* ze *S. arenarium* i *S. apuliae* [34] oraz *X. poinarii* ze *S. glaseri* i *S. cubanum* [51].

Szczególnym przypadkiem są bakterie zaliczane do *X. bovienii*, które wchodzi w symbiozę z kilkunastoma gatunkami *Steinernema*, zaliczanymi do 2 kładów (*affine-intermedium* i *feltiae-kraussei-oregonense*) [26, 36, 43, 51-53]. Ten gatunek bakterii występuje w wielu filotypach [34, 36], a każdy z nich może mieć innego gospodarza [53]. Analiza genomów różnych izolatów *X. bovienii* związanych z nicieniami entomopatogenicznymi z kładu *feltiae-kraussei-oregonense* wykazała, że mają one podobną strukturę. Jednocześnie jednak u każdego z badanych szczepów bakterii stwierdzono występowanie unikalnych genów oraz mechanizmów regulacyjnych, które mogą wpływać na interakcje z nicieniami [54]. Analiza filogenetyczna badanych szczepów *X. bovienii* oraz ich gospodarzy nie wskazywała jednak jednoznacznie na koewolucję symbiontów. Ta niezgodność może być spowodowana możliwością wymiany mikrosymbiontów między różnymi gatunkami *Steinernema*. Przeprowadzone badania laboratoryjne wskazują bowiem, że owady mogą być jednocześnie infekowane przez różne gatunki nicieni [55]. Nie istnieją również skuteczne bariery zapobiegające żerowaniu nicieni na owadach zabitych przez przedstawicieli innych gatunków *Steinernema* [56]. Martwy owad

jest w takiej sytuacji skolonizowany głównie przez nienatywne dla padlinożercy bakterie. Wykazano, że rozwój populacji *S. carpocapsae* i *S. feltiae* wewnątrz martwego owada może być wspierany przez różne gatunki czy filotypy *Xenorhabdus*. Utrzymywanie symbionta bakteryjnego przez migrujące z porażonego owada larwy infekcyjne jest jednak ograniczona do gatunku bakterii im natywnego i, co więcej, związanego z nicieniami należącymi do tego samego kladu [53]. Tak więc możliwość wymiany symbiontów bakteryjnych między nicieniami z rodzaju *Steinernema*, jakkolwiek ograniczona, niewątpliwie istnieje i jest prawdopodobnie w warunkach naturalnych dość częsta. Uwzględniając powyższe hipoteza o koewolucji *Steinernema* i *Xenorhabdus*, wymaga dalszych, dokładnych badań, zwłaszcza w przypadku związków *X. bovienii*.

6. Podsumowanie

W ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem cieszą się nowe, bezpieczniejsze dla środowiska, biologiczne metody ochrony roślin. W związku z powyższym badania symbiontów nicieni entomopatogenicznych, poza niewątpliwymi walorami poznawczymi, mają duże znaczenie praktyczne. Z uwagi na złożony cykl życiowy, zdolność do tworzenia związku mutualistycznego z nicieniami, wytwarzanie szerokiej gamy substancji bioaktywnych oraz skuteczność w przezwyciężaniu mechanizmów obrony immunologicznej owadów, bakterie z rodzaju *Xenorhabdus* stanowią niezwykle interesujący obiekt badawczy.

Literatura

1. Forst S., Clarke D. *Bacteria-nematode symbiosis*. In: Gaugler R. (ed.) *Entomopathogenic nematology*. New York: CABI, (2002), s. 57-77
2. Martens E.C., Heungens K., Goodrich-Blair H. Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacteria, *Journal of Bacteriology*, 185 (2003), s. 3147-3154
3. Daborn P.J., Waterfield N., Silva C.P., Au C.P.Y., Sharma S., French-Constant R.H. *A single Photorhabdus gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows Escherichia coli to persist within and kill insects*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (2002), s. 10742-10747
4. Seo S., Lee S., Hong Y., Kim Y. Phospholipase A2 inhibitors synthesized by two entomopathogenic bacteria, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*, *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (2012), s. 3816-3823
5. Goodrich-Blair H., Clarke D.J. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination, *Molecular Microbiology*, 64 (2007), s. 260-268
6. Giannoulis P., Brooks C.L., Dunphy G.B., Niven D.F., Mandato C.A. Surface antigens of *Xenorhabdus nematophila* (F. Enterobacteriaceae) and *Bacillus*

- subtilis (F. Bacillaceae) react with antibacterial factors of *Malacosoma disstria* (C. Insecta: O. Lepidoptera) hemolymph, *Journal of Invertebrate Pathology*, 97 (2008), s. 211-222
7. Vigneux F., Zumbih R., Jubelin G., Ribeiro C., Poncet J., Baghdiguian S., Givaudan A., Brehélin M. The xaxAB genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are present in plant and human pathogens, *Journal of Biological Chemistry*, 282 (2007), s. 9571-9580
 8. Sheets J.J., Hey T.D., Fencil K.J., Burton S.L., Ni W., Lang A.E., Benz R., Aktories K. *Insecticidal toxin complex proteins from Xenorhabdus nematophilus: structure and pore formation*, *Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011), s. 22742-22749
 9. Ehlers R.U., Wulff A., Peters A. Pathogenicity of axenic *Steinernema feltiae*, *Xenorhabdus bovienii*, and the bacto-helminthic complex to larvae of *Tipula oleracea* (Diptera) and *Galleria mellonella* (Lepidoptera), *Journal of Invertebrate Pathology*, 69 (1997), s. 212-217
 10. Dharne M.S., Gupta A.K., Rangrez A.Y., Ghate H.V., Patole M.S., Shouche Y.S. Antibacterial activities of multi drug resistant *Myroides odoratimimus* bacteria isolated from adult flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) are independent of metallo beta-lactamase gene, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39 (2008), s. 397-404
 11. White J.F., Torres M.S. (eds.) *Defensive Mutualism in Microbial Symbiosis*, (2009), CRC Press, Boca Raton.
 12. Ansari M.A., Shah F.A., Tirry L., Moens M. Field trials against *Hoplia philanthus* (Coleoptera: Scarabaeidae) with a combination of an entomopathogenic nematode and the fungus *Metarhizium anisopliae* CLO 53, *Biological Control*, 39 (2006), s. 453-459
 13. Adams B.J., Fodor A., Koppenhofer H.S., Stackebrandt E., Stock S.P., Klein M.G. *Reprint of "Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens" [Biol. Control 37 (2006) 32-49]*, *Biological Control*, 38 (2006), s. 4-21
 14. Martens E.C., Goodrich-Blair H. The *Steinernema carpocapsae* intestinal vesicle contains a subcellular structure with which *Xenorhabdus nematophila* associates during colonization initiation, *Cell Microbiology*, 7 (2005), s. 1723-1735
 15. Emelianoff V., Sicard M., Le Brun N., Moulia C., Ferdj JB. *Effect of bacterial symbionts Xenorhabdus on mortality of infective juveniles of two Steinernema species*, *Parasitology Research*, 100 (2007), s. 657-659
 16. Kucharska K., Kucharski D., Zajdel B. Bakterie *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*, niczenie entomopatogeniczne i owady – funkcjonowanie w złożonym układzie symbiont – pasożyt – żywiciel, *Postępy Mikrobiologii*, 54 (2015), s. 154-164
 17. Burnell A.M., Stock S.P. Heterorhabditis, *Steinernema and their bacterial symbionts-lethal pathogens of insects*, *Nematology*, 2 (2000), s. 31-42
 18. Boemare N.E., Boyer-Giglio M.H., Thaler J.O., Akhurst R.J., Brehelin M. *Lysogeny and bacteriocinogeny in Xenorhabdus nematophilus and other Xenorhabdus spp.*, *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (1992), s. 3032-3037

19. Koppenhofer H.S. *Bacterial symbionts of Steinernema and Heterorhabditis*. In: *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*, Nguyen K.B., Hunt D.J (eds.), Brill, Leiden-Boston, (2007), s. 735-808
20. Owuama C.I. *Entomopathogenic symbiotic bacteria, Xenorhabdus and Photorhabdus of nematodes*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17 (2001), s. 505-515
21. Givaudan A., Baghdigui S., Lanois A., Boemare N.E. *Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in Xenorhabdus nematophilus*, Applied and Environmental Microbiology, 61 (1995), s. 1408-1413.
22. Smigielski A.J., Akhurst R.J., Boemare N.E. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*: differences in respiratory activity and membrane energization, Applied and Environmental Microbiology, 60 (1994), s. 120-125
23. Owuama C.I., Chikezie I. *Effect of Growth Media on Phase Variation in Xenorhabdus bovienii T228*, Annual International Conference on Advances in Biotechnology, (2013), s. 131
24. Forst S., Waukau J., Leisman G., Exner M., Hancock R. Functional and regulatory analysis of the OmpF-like porin, OpnP, of the symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*, Molecular Microbiology, 18 (1995), s. 779-789
25. Thomas G.M., Poinar G.O. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae, International Journal of Systematic Bacteriology, 29 (1979), s. 352-360
26. Akhurst R.J., Boemare N.E. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species, Journal of General Microbiology, 134 (1988), s. 1835-1845
27. Imhoff J.F. *Enterobacteriales*. W: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M., Boone D.R., Vos P., Goodfellow M., Rainey F.A., Schleifer K.-H. (Eds.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (2005). Springer US, Boston, MA, s. 587-850
28. Brunel B., Givaudan A., Lanois A., Akhurst R.J., Boemare N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes, Applied and Environmental Microbiology, 63 (1997), s. 574-580
29. Liu J., Berry R., Poinar G., Moldenke A. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* species and strains as determined by comparison of partial 16S rRNA gene sequences, International Journal of Systematic Bacteriology, 47 (1997), s. 948-951
30. Chaston J.M., Suen G., Tucker S.L., Andersen A.W., Bhasin A., Bode E., Bode H.B., Brachmann A.O., Cowles C.E., Cowles K.N., Darby C., Leon L. de, Drace K., Du Z., Givaudan A., Herbert Tran E.E., Jewell K.A., Knack J.J., Krasomil-Osterfeld K.C., Kukor R., Lanois A., Latreille P., Leimgruber N.K., Lipke C.M., Liu R., Lu X., Martens E.C., Marri P.R., Medigue C., Menard M.L., Miller N.M., Morales-Soto N., Norton S., Ogier J.-C., Orchard S.S., Park D., Park Y., Quorollo B.A., Sugar D.R., Richards G.R., Rouy Z., Slominski B., Slominski K., Snyder H., Tjaden B.C., van der Hoeven R.,

- Welch R.D., Wheeler C., Xiang B., Barbazuk B., Gaudriault S., Goodner B., Slater S.C., Forst S., Goldman B.S., Goodrich-Blair H. *The entomopathogenic bacterial endosymbionts Xenorhabdus and Photorhabdus: convergent lifestyles from divergent genomes*, PLoS One 6 (2011), e27909. 10.1371/journal.pone.0027909
31. Szallas E., Koch C., Fodor A., Burghardt J., Buss O., Szentirmai A., Nealon K.H., Stackebrandt E. *Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of Photorhabdus luminescens*, International Journal of Systematic Bacteriology, 47 (1997), s. 402-407
 32. Liu J., Berry R.E., Blouin M.S. Identification of symbiotic bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* based on 16S rDNA sequence, Journal of Invertebrate Pathology, 77 (2001), s. 87-91
 33. Somvanshi V.S., Lang E., Ganguly S., Swiderski J., Saxena A.K., Stackebrandt E. A novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus indica* sp. nov., symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum* Ganguly and Singh, 2000, Systematic and Applied Microbiology, 29 (2006), s. 519-525
 34. Tailliez P., Pages S., Ginibre N., Boemare N. *New insight into diversity in the genus Xenorhabdus, including the description of ten novel species*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56 (2006), s. 2805-2818
 35. Tsai M.-H., Tang L.-C., Hou R.F. The bacterium associated with the entomopathogenic nematode *Steinernema abbasi* (Nematoda: Steinernematidae) isolated from Taiwan, Journal of Invertebrate Pathology, 99 (2008), s. 242-245
 36. Lee M.-M., Stock S.P. A multigene approach for assessing evolutionary relationships of *Xenorhabdus* spp. (gamma-Proteobacteria), the bacterial symbionts of entomopathogenic *Steinernema* nematodes, Journal of Invertebrate Pathology, 104 (2010), s. 67-74
 37. Rajendhran J., Gunasekaran P. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond, Microbiological Research, 166 (2011), s. 99-110
 38. Vetrovsky T., Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses, PLoS One 8 (2013), e57923. 10.1371/journal.pone.0057923
 39. Tailliez P., Laroui C., Ginibre N., Paule A., Pages S., Boemare N. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis* comb. nov, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60 (2010), s. 1921-1937
 40. Tailliez P., Pages S., Edgington S., Tymo L.M., Buddie A.G. *Description of Xenorhabdus magdalenensis* sp. nov., the symbiotic bacterium associated

- with *Steinernema australe*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62 (2012), s. 1761-1765
41. Kuwata R., Qiu L.-h., Wang W., Harada Y., Yoshida M., Kondo E., Yoshiga T. *Xenorhabdus ishibashii* sp. nov., isolated from the entomopathogenic nematode *Steinernema aciari*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63 (2013), s. 1690-1695
 42. Ferreira T., van Reenen C.A., Endo A., Sproer C., Malan A.P., Dicks L.M.T. Description of *Xenorhabdus khoisanae* sp. nov., the symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema khoisanae*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63 (2013), s. 3220-3224
 43. Mracek Z., Nguyen K.B., Tailliez P., Boemare N., Chen S.L. *Steinernema sichuanense* n. sp. (Rhabditida, Steinernematidae), a new species of entomopathogenic nematode from the province of Sichuan, east Tibetan Mts., China, Journal of Invertebrate Pathology, 93 (2006), s. 157-169
 44. Lengyel K., Lang E., Fodor A., Szallas E., Schumann P., Stackebrandt E. Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov., *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov., Systematic and Applied Microbiology, 28 (2005), s. 115-122
 45. Nishimura Y., Hagiwara A., Suzuki T., Yamanaka S. *Xenorhabdus japonicus* sp. nov. associated with the nematode *Steinernema kushidai*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 10 (1994), s. 207-210
 46. Poinar G.O., Thomas G.M. A new bacterium, *Achromobacter Nematophilus* sp. nov. (Achromobacteriaceae Eubacteriales) associated with a nematode, International Bulletin of Bacterial Nomenclature and Taxonomy, 15 (1965), s. 249-252
 47. Akhurst R. J. Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect-pathogenic nematodes, International Journal of Systematic Bacteriology, 33 (1983), s. 38-45
 48. Stock S.P., Campbell J.F., Nadler S.A. Phylogeny of *Steinernema* Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters, Journal of Parasitology, 87 (2001), s. 877-889
 49. Spiridonov S.E., Reid A.P., Podrucka K., Subbotin S.A., Moens M. Phylogenetic relationships within the genus *Steinernema* (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA and morphological features, Nematology, 6 (2004), s. 547-566
 50. Murfin K.E., Lee M.M., Klassen J.L., McDonald R.J., Larget B., Forst S., et al., *Xenorhabdus bovienii* strain diversity impacts coevolution and symbiotic maintenance with *Steinernema* spp. nematode hosts, MBio 6 (2015a), e00076
 51. Fischer-Le Saux M., Arteaga-Hernandez E., Mráček Z., Boemare N.E. The bacterial symbiont *Xenorhabdus poinarii* (Enterobacteriaceae) is harbored by two phylogenetic related host nematodes: the entomopathogenic species *Steinernema cubanum* and *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae), FEMS Microbiology Ecology, 29 (1999), s. 149-157
 52. Emelianoff V., Le Brun N., Pages S., Stock S.P., Tailliez P., Moulia C., Sicard M. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and

- their symbiotic bacteria from Hérault and Gard (Southern France)*, Journal of Invertebrate Pathology, 98 (2008), s. 211-217
53. Chapuis E., Emelianoff V., Paulmier V., Le Brun N., Pages S., Sicard M., Ferdy J.B. *Manifold aspects of specificity in a nematode-bacterium mutualism*, Journal of Evolutionary Biology, 22 (2009), s. 2104-2117
 54. Murfin K.E., Whooley A.C., Klassen J.L., Goodrich-Blair H. *Comparison of Xenorhabdus bovienii bacterial strain genomes reveals diversity in symbiotic functions*, BMC Genomics, 16 (2015b), s. 889
 55. Koppenhöfer A.M., Kaya H.K., Shanmugam S., Wood G.L. *Interspecific competition between Steinernematid nematodes within an insect host*, Journal of Invertebrate Pathology, 66 (1995), s. 99-103
 56. Puza V., Mracek Z. *Does scavenging extend the host range of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae)?*, Journal of Invertebrate Pathology, 104 (2010), s. 1-3

Charakterystyka bakterii z rodzaju *Xenorhabdus*

Streszczenie

Do rodzaju *Xenorhabdus* należą enterobakterie wchodzące w symbiozę mutualistyczną z nicieniami entomopatogenicznymi z rodzaju *Steinernema*. Nicienie te są wykorzystywane w biologicznych metodach zwalczania szkodliwych owadów. Preparaty zawierające te organizmy używane są przeciwko larwom owadów z rzędu *Lepidoptera* i *Coleoptera*. Larwy inwazyjne nicieni *Steinernema*, zdolne do aktywnego poszukiwania żywiciela, wewnątrz ciała owada uwalniają bakterie *Xenorhabdus*, które produkują szereg toksyn oraz enzymów, powodujących śmierć owada i przekształcających jego tkanki w środowisko optymalne do rozwoju nicieni. W niniejszej pracy przedstawiono fenotypową i molekularną charakterystykę bakterii z rodzaju *Xenorhabdus*. Opisano cykl życiowy tych bakterii, przebieg infekcji organizmu owada oraz wzajemne relacje pomiędzy bakteriami, nicieniami i owadami. Zaprezentowano również filogenezę rodzaju *Xenorhabdus*, zgodnie z aktualnym stanem wiedzy. Na podstawie dostępnych danych filogenetycznych poddano dyskusji hipotezę o koewolucji bakterii i nicieni entomopatogenicznych.

Słowa kluczowe: *Xenorhabdus*, *Steinernema*, mutualizm, filogeneza

Characterization of bacteria of the genus *Xenorhabdus*

Abstract

Xenorhabdus is a genus of enterobacteria that form a mutualistic association with entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema*. Entomopathogenic nematodes are effective biocontrol agents which can significantly reduce the numbers of several lepidopteran and coleopteran insect pests. Infective juveniles, the only free-living stage in the life cycle of these nematodes, after entering an insect release *Xenorhabdus* cells from their gut. These bacteria begin to synthesize a number of toxins and enzymes which cause the death of the insect and prepare an optimal environment for the growth and reproduction of the nematodes. In this review, phenotypic and molecular characterization of the genus *Xenorhabdus* is presented. The life cycle of these bacteria, as well as the mechanism of insect infection and relationships between bacteria, nematodes and infected insects are characterized. Furthermore, the current knowledge of the phylogeny of the genus *Xenorhabdus* is described. And finally, the hypothesis about the cophylogeny of *Steinernema* spp. and *Xenorhabdus* spp. is discussed.

Keywords: *Xenorhabdus*, *Steinernema*, mutualism, phylogeny

Gospodarka wodno-ściekowa i odpadowa w gminie Łapy

1. Wprowadzenie

Woda jest jednym z czynników, który warunkuje życie na Ziemi. Wykorzystuje się ją do celów bytowych, produkcyjnych oraz do kształtowania krajobrazu. Bardzo duża ilość wody tracona jest w wyniku złegostanu technicznego urządzeń służących do jej poboru, związanego głównie z nieszczelnością instalacji wodociągowych. Na skutek tego mamy do czynienia ze stratami około 10-15% pobieranych zasobów. Dodatkowo, poziom gospodarki ściekowej, szczególnie na terenach wiejskich, jest niezadowalający. Wiąże się to z nieszczelnymi szambami oraz, w przypadku niektórych gospodarstw domowych, podłączeniami kanalizacji do zbiorników na odchody zwierzęce. Skutkuje to przesiąkaniem zanieczyszczeń do wód podziemnych.

Istotą idei zrównoważonego rozwoju jest harmonia pomiędzy dbałością o stan środowiska oraz rozwojem gospodarczym i społecznym. Jest to determinowane koniecznością prowadzenia polityki służącej ochronie środowiska oraz włączenia działań ochronnych w zakresie strategicznych polityk prowadzonych na szczeblu krajowym, międzynarodowym, unijnym oraz lokalnym [1].

Obecnie, Unia Europejska zapewnia ogromny wybór projektów dotyczących ochrony środowiska naturalnego, związanych głównie z poprawą jakości dystrybucji wody pitnej, wód powierzchniowych, racjonalizacji gospodarki odpadowej oraz zagwarantowaniu bezpieczeństwa przeciwpowodziowego. Zabieg ten jest możliwy poprzez modernizację oczyszczalni ścieków, poprawę działania urządzeń uzdatniających wodę oraz usprawnienie funkcjonowania kanalizacji sanitarnych. Ważne jest również przestrzeganie zasad recyklingu odpadów, które gromadzone w sposób niewłaściwy oddziałują bardzo niekorzystnie na środowisko.

W Polsce jednym z najpopularniejszych sposobów unieszkodliwiania odpadów jest ich składowanie. Nieprawidłowa gospodarka składowiskami jest przyczyną szkodliwego oddziaływania na wody, glebę, rośliny oraz atmosferę. Jednym ze sposobów ograniczających ilości składowanych

¹ a.poltorak@doktoranci.pb.edu.pl, Politechnika Białostocka, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska, www.wb.pb.edu.pl

odpadów oraz umożliwiających wtórny odzysk jest ich selektywna zbiórka. Oprócz korzyści dla środowiska, wiąże się to również z korzyściami ekonomicznymi. Jest to jednocześnie część przygotowanego planu zarządzania gospodarką odpadami w poszczególnych regionach. Dzięki ponownemu wykorzystaniu surowców wtórnych, możliwe jest zmniejszenie udziału surowców pierwotnych w produkcji. Jest to oszczędne dla gospodarki oraz ogranicza szkodliwy wpływ na krajobraz.

Nowe prawo w dużej mierze dostosowane jest do wymagań Unijnych wprowadzając szereg zmian w sposobie zaopatrzenia w wodę i odprowadzania ścieków. Jedną z podstawowych zasad sformułowanych w ustawie – Prawo wodne jest zasada mówiąca o konieczności jednoczesnego rozwiązania problemów zaopatrzenia ludności w wodę do picia z problemami gospodarki ściekami [2].

2. Cel pracy

Celem poniższej pracy była analiza stanu gospodarki wodno-ściekowej oraz odpadowej w gminie Łapy w województwie podlaskim. Poprzedzona została ona charakterystyką zasobów wodnych Polski, rolą gminy w gospodarowaniu zasobami wodnymi, opisem problematyki ściekowej i odpadowej. Ponadto przeprowadzono ankietę dotyczącą świadomości ekologicznej.

3. Zasoby wodne Polski

Zasoby wodne Polski cechuje duża zmienność sezonowa. Średnia ilość wody przypadająca na mieszkańca na rok wynosi około $1,6 \text{ dm}^3$. W pozostałych krajach UE jest to około $4,6 \text{ dm}^3$ na rok. Jest to prawie 3 razy więcej, niż na jednego mieszkańca naszego kraju. W związku z tym Polska posiada małe zasoby wodne. Woda słodka w naszym państwie zajmuje około 200 km^3 . Głównym powodem niskich zasobów są małe opady roczne oraz parowanie.

Jednym z czynników, który spowodował zmniejszenie się ilości zasobów wodnych była błędna polityka wodno-gospodarcza w naszym kraju. Można tu wskazać liczne zabiegi melioracyjne, mające na celu osuszanie gleb, nieracjonalne wykorzystywanie wody przy jednoczesnym wzroście liczby ludności, niewielkie inwestycje w zabiegi mające na celu zaopatrzenie w wodę, niszczenie obiektów tzw. „małej retencji” oraz początkowy brak zainteresowania środowiskiem i skutkami, jakie niosą za sobą błędne korzystanie z zasobów wód. Do zmniejszenia ilości wody przyczynił się również wzrost współczynnika ewaporacji, powodujący obniżenie poziomu wód gruntowych, spowodowany głównie ociepleniem klimatu.

Przepisy regulujące gospodarowanie wodami w Polsce zawarte są w ustawie Prawo wodne [3]. Ramowa Dyrektywa Wodna, która obowiązuje w Unii Europejskiej, określa, iż jakość wód powierzchniowych należy klasyfikować na podstawie pięciu poziomów stanu ekologicznego. W związku z tym, od roku 2005 nowa klasyfikacja wód obejmuje pięć klas jakości: I, II, III, IV oraz V. Początkowo klasy jakości wód powierzchniowych i podziemnych związane były z ich kategoryzacją jako wód przeznaczonych do spożycia, a od 2008 roku z ich stanem ekologicznym [3].

Kolejne klasy jakości wód przedstawiają się następująco:

- I klasa jakości – bardzo dobry stan ekologiczny lub maksymalny potencjał ekologiczny. Elementy jakości wód osiągają wartości odpowiadające wartościom w niezakłóconych lub nieznacznie zakłóconych warunkach.
- II klasa jakości – dobry stan ekologiczny lub dobry potencjał ekologiczny. Elementy jakości wód osiągają wartości wskazujące na wpływ antropogeniczny powodujący jedynie niewielkie odchylenia od warunków niezakłóconych.
- III klasa jakości – umiarkowany stan ekologiczny lub umiarkowany potencjał ekologiczny. Biologiczne elementy jakości wód osiągają wartości wskazujące na umiarkowane odchylenia od wartości cechujących biocenozy naturalne dla danego typu wód.
- IV klasa jakości – słaby stan ekologiczny lub słaby potencjał ekologiczny. Elementy jakości wód osiągają wartości wskazujące na znaczne odchylenia od wartości cechujących biocenozy naturalne dla danego typu wód.
- V klasa jakości – zły stan ekologiczny lub zły potencjał ekologiczny. Elementy jakości wód osiągają wartości wskazujące na poważne odchylenia od wartości cechujących biocenozy naturalne dla danego typu wód, łącznie z brakiem typowych biocenoz. Gdy elementy biologiczne wskazują na stan zły, elementy fizykochemiczne i hydrofologiczne już nie są oceniane odrębnie, gdyż przyjmuje się, że również one mają wpływ na stan elementów biologicznych [5].

3.1. Rola gminy w gospodarowaniu zasobami wodnymi

Probleмами ochrony środowiska na szczeblach gminnych zajmuje się samorząd terytorialny. Zadaniem samorządu, czyli gminy, jest kontrola nad gospodarką ściekową oraz regulacja prawna problemów gospodarki ściekowej, która nie została jeszcze uregulowana przepisami państwowymi, np. wywóz nieczystości beczkownikami, których kontrola pozostawia wiele zastrzeżeń.

Podmiot gospodarczy, czyli społeczeństwo, które wytwarza ścieki, obowiązane są do ich unieszkodliwiania poprzez dostarczenie na oczyszczalnię, lub też oczyszczenie ich we własnym zakresie do tego stopnia, aby nadawały się do dokonania zrzutu do odbiornika. Kwestie gromadzenia, odprowadzania oraz utylizacji ścieków, budowy kanalizacji, kontroli gospodarki ściekowej oraz wykonywania oceny oddziaływania na środowisko zawarte są w dotyczących tychże kwestii ustawach. Utrudnieniem w dążeniu do ochrony środowiska jest brak aktów wykonawczych oraz odpowiednio wysokich kar za spowodowanie negatywnych skutków w środowisku.

3.2. Rodzaje ścieków i ich oddziaływanie na zasoby wodne

Wyróżniane są następujące rodzaje ścieków:

- ścieki bytowe – z budynków mieszkalnych, zamieszkania zbiorowego oraz użyteczności publicznej, powstające w wyniku ludzkiego metabolizmu lub funkcjonowania gospodarstw domowych;
- ścieki komunalne – ścieki bytowe lub mieszanina ścieków bytowych ze ściekami przemysłowymi albo wodami opadowymi lub roztopowymi;
- ścieki przemysłowe – niebędące ściekami bytowymi albo wodami opadowymi lub roztopowymi, powstałe w związku z prowadzoną przez zakład działalnością handlową, przemysłową, składową, transportową lub usługową, a także będące ich mieszaniną ze ściekami innego podmiotu, odprowadzane urządzeniami kanalizacyjnymi tego zakładu.

Po oczyszczeniu ścieki kierowane są do odbiornika, którym są zazwyczaj wody powierzchniowe lub środowisko gruntowe, zaś nie mogą być one zrucane do wód podziemnych, śródlądowych, jezior bezodpływowych, oraz ziemia na obszarach użytkowania płytkich wód gruntowych.

Głównym zagrożeniem dla wód są związki fosforu, azotu, głównie azotyny oraz azotany, bakterie, wirusy oraz toksyczne związki organiczne. Jeziora w Polsce są szczególnie narażone na zrzuty ścieków przemysłowych oraz komunalnych, co w efekcie prowadzi do eutrofizacji wód. Jakość wód podziemnych jest szczególnie istotna dla dużych zbiorników podziemnych, które są głównym źródłem zaopatrzenia miast oraz wsi w wodę. Niebezpieczny jest również dopływ pestycydów z terenów rolniczych, zawierających głównie metale ciężkie. Największe zagrożenie związanie jest z ich akumulacją w organizmach oraz długim czasem oczyszczania wód. Skutkuje to długim czasem przebywania w organizmach wodnych oraz w wodzie, co skutkuje obumieraniem wspomnianych organizmów [6].

Zbiorniki bezodpływowe, jak sama nazwa wskazuje, ze względu na brak odpływu magazynują ścieki. Wody nie zawsze oczyszczają się same, co wymusza zastosowanie oczyszczania przy ingerencji człowieka. W przypadku przydomowych oczyszczalni ścieków, do pełnego biologicznego oczyszczania ścieków, często stosowanym zabiegiem jest stosowanie oczyszczalni hydrobotanicznych, zwanych roślinnymi, hydrofitowymi oraz makrofitowymi [7].

3.3. Problemodpadów

Ustawa o odpadach i ustawa o utrzymaniu czystości i porządku wymieniają szereg zadań gmin w zakresie utrzymania porządku i czystości. Przepisy te nie zawierają bliższych wskazówek co do tego, jak taki system powinien być zorganizowany, gminy mają tu więc pewną swobodę, mogą uwzględniać własne możliwości, istniejące tradycje i doświadczenia [8].

Ze względu na źródło powstawania, możemy wyróżnić odpady komunalne, przemysłowe oraz niebezpieczne. Odpady komunalne pochodzą z indywidualnych gospodarstw domowych, z infrastruktury wiejskiej, miejskiej, z ulic i jednostek osiedlowych. Odpady przemysłowe powstają głównie na skutek działalności gospodarczej, przemysłu i przetwórstwa. Z odpadami niebezpiecznymi mamy do czynienia w wyniku ich oddziaływania w sposób niebezpieczny, pośredni lub bezpośredni, na wszelkie organizmy żywe, mogącymi wywołać negatywne skutki zawartymi w nich substancjami agresywnymi. Oprócz tego występują również odpady medyczne, weterynaryjne, odpady z wypadków oraz odpady obojętne [8].

Ważną kwestią jest wpływ odcieków z wysypisk komunalnych na wody podziemne. Ocieki ze składowisk odpadów stanowią źródło zanieczyszczeń wód, co powoduje charakterystyczne zanieczyszczenia. Jeżeli na danym składowisku mamy niezabezpieczoną powierzchnię podłoża, a składowisko znajduje się w stosunkowo niedalekiej odległości od cieku wodnego, wówczas zanieczyszczenia przedostają się do zbiornika, skutkując pogorszeniem parametrów chemicznych oraz biologicznych tejże wody. Oprócz tego, w glebach nagromadzona zostaje znaczna ilość szkodliwych pierwiastków, skutkujące zasoleniem, zakwaszeniem, alkalizacją lub zanieczyszczeniem takich gleb. Zanieczyszczenie głównie metalami ciężkimi może skutkować przedostawaniem się zanieczyszczeń do żywności, z późniejszymi konsekwencjami dla zdrowia na skutek spożywania skażonych pokarmów.

3.4. Charakterystyka gminy Łapy

Gmina Łapy jest gminą miejsko-wiejską, zlokalizowaną nad rzeką Narew, na terenie powiatu białostockiego, w województwie podlaskim. Zajmuje powierzchnię 12 757 ha i zamieszkuje ją około 23 688 osób. Znajduje się ona we wschodniej części Polski, a w układzie administracyjnym stanowi środkowy fragment województwa podlaskiego i graniczy od północy z gminą Choroszcz, od wschodu z gminą Turośń Kościelna i Suraż, od zachodu z gminą Sokoły, a od południa z gminą Poświętne. Ponadto znajduje się w obrębiach trzech mezoregionów tj. od zachodu Wysoczyzny Wysokomazowieckiej, od północy Doliny Górnej Narwi i od północnego wschodu Wysoczyzny Białostockiej, obejmującej fragment obszaru wschodniej części gminy. Pod względem hydrograficznym obszar gminy Łapy należy do dorzecza Wisły i położony jest w obrębie zlewni Narwi. W gminie skanalizowanych jest 10 wiosek na 24 miejscowości oraz całe miasto Łapy. Gmina jest skanalizowana prawie w 90%, w odniesieniu do liczby gospodarstw domowych, długość kanalizacji sanitarnej wynosi 83,2 km. Składowisko odpadów zlokalizowane w miejscowości Uhowo. Składowisko posiada zatwierdzoną instrukcję eksploatacji. Powierzchnia całkowita składowiska obejmuje ponad 2 ha. [9].

4. Metodyka

Głównym źródłem do powstania pracy były informacje uzyskane od władz gminy oraz przeprowadzenie ankiety wśród stu mieszkańców gminy Łapy. Ankiety przeprowadzono w połowie 2015 roku. Zawierała ona pytania o sposób wykorzystywania wody, gromadzenia i odprowadzania ścieków oraz sposób postępowania z wytwarzanymi odpadami. W metryczce dotyczącej danych socjodemograficznych ankietowani zaznaczali swój wiek, wykształcenie i miejsce zamieszkania.

5. Analiza wyników

Wiek ankietowanych mieścił się w przedziale 25-65 lat. Zdecydowana większość, aż 87% ankietowanych, to osoby ze średnim wykształceniem. 70% ankietowanych osób to mieszkańcy pobliskich wsi, natomiast pozostali to mieszkańcy miasta.

Wykształcenie oraz wiek wykazały znaczący wpływ na świadomość ekologiczną mieszkańców. Młodszy ludzie, bardziej wykształceni mieli o wiele większą świadomość powagi zagrożenia, jaką niesie za sobą nieprawidłowa gospodarka wodno-ściekowa. Dodatkową informacją jest to, iż mieszkańcy miejscowości, w których nie było kanalizacji, znacznie rzadziej zdawali sobie sprawę z konieczności utylizacji ścieków w oczyszczalniach. Po przeanalizowaniu ankiet wynika, iż 89% mieszkańców posiada podłączenie do kanalizacji oraz bieżącą wodę. Małe gospodarstwa

domowe posiadają głównie studnie głębinowe oraz kopane, stanowiąc przy tym 11% ankietowanych.

Odnośnie gromadzenia i postępowania z odpadami – na wsiach wiele odpadów suchych jest spalanych. Odpady organiczne stają się nawozem organicznym na polach. Segreguje się tam głównie szkło. Co jest bardzo smutne i niepokojące – wciąż zdarzają się przypadki porzucania odpadów na tak zwanych dzikich wysypiskach. Są to głównie odpady wielkogabarytowe. W miastach problem odpadów jest w dużym stopniu przestrzegany ze względu na różniące się koszty wywozu odpadów segregowanych oraz zmieszanych.

Wśród wielu pytań zadanych ankietowanym, znalazło się również to o oszczędzaniu wody oraz sposobie, w jaki jest to praktykowane. Warto podkreślić, że aż 82% mieszkańców przyznało się do oszczędzania wody. Ponad połowa z ankietowanych zrezygnowała z kąpieli w wannach na rzecz kilkuminutowego prysznica. Część osób ze względu na brak łazienki stosuje miskę. U 65% osób występują dwupoziomowe spłuczki w toaletach. Aż 64% osób zmywa naczynia pod bieżącą wodą, a 26% posiada w domu zmywarkę. Oszczędności spowodowane są głównie czynnikami ekonomicznymi.

6. Podsumowanie

Świadomość ekologiczna jest złożoną z wielu elementów, skomplikowaną strukturą świadomości społecznej. Uważa się ją za zespół przekonań oraz informacji na temat środowiska naturalnego. W naszych badaniach stwierdzono, iż młodsi oraz lepiej wykształceni ludzie posiadają większą świadomość dotyczącą sposobu wykorzystywania wody, odprowadzania ścieków oraz sposobu postępowania z odpadami.

Ze względu na przynależność gminy do Narwiańskiego Parku Narodowego, uzasadnione jest uwzględnienie prowadzenia racjonalnej gospodarki wodno-ściekowej, głównie dla zachowania lasów, łąk, torfowisk, mokradel oraz wielu gatunków zwierząt, głównie ptaków.

Wraz ze wzrostem liczby ludności – wzrasta również ilość produkowanych ścieków, odpadów, a zasoby wodne wciąż się kurczą. Odpady stanowią coraz większy problem zarówno gospodarczy, związany z ich zbiórką, transportem i unieszkodliwianiem, jak i problem ekonomiczny, dotyczący ich negatywnego oddziaływania na wszystkie elementy środowiska [10]. My, jako społeczeństwo, powinniśmy o wiele bardziej zwrócić na to uwagę i podejść do problemu w sposób w pełni świadomy oraz racjonalny, zdając sobie przy tym sprawę z powagi sytuacji. Władze gminy, szkoły oraz media powinny w większym stopniu promować sposoby postępowania w takich sytuacjach, gdyż należy dotrzeć nie tylko do ludzi młodych, ale przede wszystkim do starszych, którzy mają już swoje niekiedy naganne nawyki, dlatego ważne są wszelkie programy edukacyjne.

Literatura

1. Czech E.K. (red.) Uwarunkowania ochrony środowiska: aspekty krajowe, unijne, międzynarodowe., Wydawnictwo Difin. Warszawa 2006, s. 232
2. Kozłowski S., Rauba E. *Problemy gospodarki wodno-ściekowej w gminie*, [w:] Kozłowski S. (red.), Materiały konferencyjne nt: „*Regionalne strategie rozwoju zrównoważonego*” Wyd. Ekonomia i Środowisko, Białystok 2004
3. Ustawa z dnia 18 lipca 2001 r. Prawo wodne. Dz.U. 2001 nr 115 poz. 1229
4. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 listopada 2011 r. w sprawie klasyfikacji stanu ekologicznego, potencjału ekologicznego i stanu chemicznego jednolitych części wód Dz. U. 258, poz. 1549
5. Stepwise Approach for the Ecological Classification. W: Overall Approach to the Classification of Ecological Status and Ecological Potential. Water Framework Directive Common Implementation Strategy Working Group 2 A Ecological Status (ECOSTAT), 2003-11-27, s. 19-23
6. Gromiec M., Sadurski A., Zalewski M., Rowiński P. *Zagrożenia związane z jakością wody*, Nauka 1 (2014), s. 99-122
7. Heidrich Z., Stańko G. *Leksykon przydomowych oczyszczalni ścieków*, Wydawnictwo: Seidel-Przywecki Sp. z o.o., Warszawa 2007, s. 67
8. Grygorczuk-Petersons E.Z., Tałałaj I.A. *Kształtowanie gospodarki odpadami w gminie*, Podlaska Agencja Zarządzania Energią, Białystok 2007, s. 137
9. Plan Rozwoju Lokalnego Gminy Łapy na lata 2004-2013 (2004), s. 85
10. D'Obyrn K., Szalińska E. *Odpady komunalne, zbiórka, recykling, unieszkodliwianie*, Wydawnictwo Politechnika Krakowska, Kraków 2005, s. 138

Gospodarka wodno-ściekowa i odpadowa w gminie Łapy

Streszczenie

Opracowanie miało na celu przybliżenie sposobu funkcjonowania gospodarki wodno-ściekowej i odpadowej na terenie gminy Łapy. W tym celu przeprowadzono ankiety wśród mieszkańców gminy oraz oparto się na danych statystycznych uzyskanych od władz gminy. W pracy wykazano stopień świadomości ankietowanych osób, związany z ich wiekiem, wykształceniem oraz miejscem zamieszkania. Stwierdzono, iż wiele osób, pomimo zmniejszających się zasobów wodnych oraz pogarszających się stanów gleb, wciąż nie zdaje sobie sprawy z zagrożenia skażeniem środowiska, czego dowodem są odpowiedzi uzyskane w przeprowadzonych ankietach. Młodszy, wykształceni ludzie posiadają większą świadomość dotyczącą sposobu wykorzystywania wody, odprowadzania ścieków oraz sposobu postępowania z odpadami.

Słowa kluczowe: gospodarka wodno-ściekowa, odpady komunalne, zanieczyszczenia wód

Wastewater and waste management in Łapy commune

Abstract

This work introduces the functioning of wastewater and waste management in Łapy commune. For this purpose, questionnaires among residents were conducted and statistical data obtained from the municipal authority were analyzed. In the study was shown that degree of awareness of respondents were correlated with their age, education and place of residence. It was stated that many people, in spite of deteriorating water resources and deteriorating soil conditions, were still not unaware of the danger of contamination the environment, which were evidenced by the responses to questionnaires. It was observed that younger, better educated people had a greater awareness about how to use of water resources, and about the treatment of wastewater and waste.

Keywords: wastewater management, municipal waste, water pollution

Bioakumulacja metali ciężkich w rybach

1. Wprowadzenie

Wśród konsumentów obecnie duże zainteresowanie wzbudza bezpieczeństwo i jakość zdrowotna żywności [1]. Obecność zanieczyszczeń chemicznych jest jednym z kryteriów oceny bezpieczeństwa produktów przeznaczanych do konsumpcji. Z tego powodu od wielu lat prowadzi się szeroko zakrojony monitoring zawartości tych substancji w środkach spożywczych i porównuje ich zawartość z normami, aby określić jakość zdrowotną żywności [2]. Członkostwo Polski we Wspólnocie Europejskiej obliguje nasz kraj do prowadzenia stałego nadzoru i kontroli pozostałości substancji szkodliwych w produktach spożywczych. Oceny wyników zawartości ołowiu, kadmu i rtęci w żywności dokonuje się zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) Nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. [3] wraz z późniejszymi zmianami, ustalającym najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych [4]. Zanieczyszczenie środowiska sprawia, że pomimo wdrażania do produkcji żywności zasad dobrej praktyki produkcyjnej i rolniczej nie jest możliwe całkowite wyeliminowanie obecności w niej zanieczyszczeń chemicznych [5]. Metale ciężkie (ołów, kadm, rtęć) należą obecnie do jednych z najgroźniejszych zanieczyszczeń środowiska [2]. Związki metali ciężkich zaliczane są do zanieczyszczeń ze względu na ich zdolność do kumulowania się w określonych dla poszczególnych metali tkankach [6]. Kumulują się one w organizmie: ołów głównie w tkance kostnej, kadm – w tkance korowej nerek i wątrobie, związki metylortęciowe – w tkance mózgowej [7, 8]. Pierwiastki te odznaczają się najwyższym współczynnikiem kumulacji, który wynosi od 10 do 600% [1, 2].

Zanieczyszczenie środowiska metalami ciężkimi pochodzi głównie z pyłów, dymów, ścieków i opadów przemysłowych. Związki metali łatwo ulegają rozpuszczeniu w wodzie deszczowej, zasilając systemy wodne oraz gleby [9]. Na poziom akumulacji metali w poszczególnych organizmach

¹ rstanisl@ur.edu.pl, Katedra Przetwórstwa i Towaroznawstwa Rolniczego, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, www.ur.edu.pl

² mgil@ur.edu.pl, Katedra Przetwórstwa i Towaroznawstwa Rolniczego, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, www.ur.edu.pl

³ mrudy@ur.edu.pl, Katedra Przetwórstwa i Towaroznawstwa Rolniczego, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, www.ur.edu.pl

mają wpływ: sposób odżywiania, przyjęta dawka, szybkość usuwania, a także drogi wchłaniania [10, 11]. Różne tkanki i organy ryb akumulują różne ilości poszczególnych metali ciężkich [11]. Na zawartość metali ciężkich w rybach w znacznym stopniu wpływają: gatunek, płeć, wiek, żywienie (specyficzny metabolizm metali) oraz dostępność metali ciężkich w środowisku (stan zanieczyszczenia) [12-14]. W przypadku ryb zawartość metali w poszczególnych narządach jest zróżnicowana i zależy od funkcji spełnianej przez dany organ wewnętrzny [15].

Metale ciężkie stanowiące zanieczyszczenia żywności pochodzą z różnych źródeł. Zanieczyszczenia pochodzenia roślinnego, jak i pochodzenia zwierzęcego mogą pojawić się na różnych etapach produkcji [16, 17]. Do produktów spożywczych metale ciężkie trafiają ze środowiska, w którym pojawiają się jako skutek industrializacji i działalności technologicznej człowieka, z opakowań, urządzeń przemysłowych, substancji dodatkowych oraz procesów technologicznych przetwarzania żywności. Dlatego też w praktyce nie można uniknąć tych zanieczyszczeń. Należy jednak kontrolować poziom metali ciężkich i dążyć do minimalizowania zawartości tych zanieczyszczeń [6].

Szczególnie narażone na zanieczyszczenia jest środowisko wodne, ponieważ zbiorniki wodne są często bezpośrednim miejscem zrzutu ścieków przemysłowych, komunalnych i zanieczyszczeń będących wynikiem działalności rolniczej [11]. Zanieczyszczenie wód następuje z przyczyn naturalnych i antropogenicznych. W związku z działalnością człowieka, najbardziej narażone są powierzchniowe wody śródlądowe, płytkie gruntowe i wody atmosferyczne, a najmniej zanieczyszczane są wody podziemne [18]. Do wody substancje szkodliwe dostają się z powietrza, w wyniku opadów atmosferycznych, jak również z gleb – w wyniku spływów obszarowych [11, 19]. Toksyczność metali w środowisku wodnym jest warunkowana głównie ich rozpuszczalnością, pH wody, temperaturą oraz twardością wody itp. [11, 20]. Organizmy wodne są szczególnie narażone na bezpośrednie działanie szkodliwych substancji. Metale ciężkie w organizmach żywych prawie zawsze występują w postaci utlenionej lub chemicznie związanej. Metale w postaci nieorganicznych kationów wykazują w większości przypadków skłonność do silnego wiązania się z białkami i tkankami biologicznymi [21]. Takie wiązanie zwiększa bioakumulację i hamuje ich wydzielenie z organizmu [11].

Ocena stopnia skażenia ekosystemów wodnych metalami ciężkimi nie może ograniczyć się tylko do określania stopnia zanieczyszczenia występującego w wodzie, ale również w organizmach żywych bytujących w środowisku wodnym [11, 22]. Zawartość metali ciężkich w tkankach ryb jest efektem pobierania tych związków w trakcie życia w dwojaki sposób: przez akumulację z otaczającego środowiska (wody), głównie przez

skrzela, oraz drogą pokarmową wraz z pożywieniem [9, 11]. W warunkach naturalnych wyszczególnione źródła pobierania metali ciężkich zachodzą równocześnie, a końcowym rezultatem jest stężenie pierwiastka w tkankach. Stężenie to określa się jako funkcję ilości przyjętego metalu, współczynnika wchłaniania pierwiastka przez daną tkankę oraz szybkości usuwania metalu z organizmu. Zjawisko to nazywane jest biokumulacją [8].

Literatura [11] dotycząca pobierania i rozmieszczania metali w ciele ryb informuje, że ich kumulacja w tkance mięśniowej jest stosunkowo niewielka. W największych ilościach metale odkładają się w tkankach i organach miękkich: wątroba, nerki, śledziona, przewód pokarmowy i skrzela [11, 14].

Celem niniejszej pracy było przedstawienie na podstawie piśmiennictwa poziomu akumulacji metali ciężkich w tkankach ryb.

2. Wpływ metali ciężkich na organizm człowieka

Metale ciężkie, głównie ołów, kadm, chrom, nikiel, miedź, cynk oraz rtęć zaliczane są do podstawowych zanieczyszczeń przemysłowych i środowiskowych [9, 23]. Nie stwierdzono przydatności tych pierwiastków dla organizmu człowieka, mogą być przyczyną przewlekłych i niebezpiecznych zatruć. Problemy zdrowotne związane z narażeniem środowiskowym na metale ciężkie spowodowane są wchłanianiem tych pierwiastków nie tylko drogą oddechową (pył metalonośny), ale przede wszystkim drogą pokarmową. Wraz z przyjmowanym pokarmem i wodą do organizmu człowieka może trafiać do 80% całkowitej dziennej dawki tych toksycznych pierwiastków (ołów, rtęć, kadm i inne) [1, 24, 25], natomiast pozostałe 20% – poprzez układ oddechowy [1]. Metale ciężkie kumulują się w organizmie, a objawy chorobowe uświadczniają się na ogół po upływie wielu miesięcy, a nawet lat. Z tego powodu ogromne znaczenie ma kontrola jakości produktów zanieczyszczonych tymi pierwiastkami [5].

Wzrost stężenia metali ciężkich w środowisku ma bezpośredni wpływ na funkcjonowanie organizmów roślinnych i zwierzęcych [1]. Ich obecność w żywności nawet w ilościach śladowych stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi [7, 26]. Zdaniem wielu autorów [16, 17] występowanie ich w dużych ilościach może powodować ostre lub przewlekłe stany chorobowe. Metale ciężkie to pierwiastki toksyczne dla organizmów żywych. Narażenie na nie może stanowić podłoże wielu chorób: układu sercowo-naczyniowego, chorób wątroby, nerek, krwi, układu nerwowego i kostnego oraz kostno-stawowego. Powodują również nieprawidłowy rozwój dzieci, zmiany mutagenne i teratogenne, alergie, a także choroby nowotworowe [5, 8, 13, 17, 27]. Ponadto działają neurotoksycznie, nefrotoksycznie, przenikają przez barierę krew-łożysko [7, 8, 27]. Stosunkowo rzadko metale ciężkie mogą wywoływać ostre zatrucia. Najczęściej mogą być przyczyną zatruć przewlekłych, o nietypowym przebiegu, ujawniającymi się po dłuż-

szym okresie czasu [6]. Przy małym stopniu narażenia objawy nie występują od razu, lecz dopiero po upływie miesięcy, a nawet wielu lat. Metale ciężkie wpływają na biodostępność i metabolizm mikroelementów. W związku z niebezpieczeństwem, związanym z zanieczyszczeniem żywności metalami ciężkimi, ich poziom powinien być stale monitorowany [7, 28].

3. Wartość odżywcza mięsa ryb

Ryby oraz przetwory rybne są ważnym elementem zbilansowanej diety człowieka [12, 26, 29]. Produkty te są cennym źródłem wysokowartościowego i łatwo przyswajalnego białka, niezbędnych aminokwasów, witamin (A, D, E, z grupy B; niacyna, kwas pantotenowy, pirydoksyna, ryboflawina, tiamina i cyjanokobalaminy), makroelementów (potas, sód, wapń, fosfor, magnez) i mikroelementów (fluor, żelazo, cynk, miedź). Gatunki morskie dostarczają również jodu i selenu, a także bardzo cennych dla organizmu człowieka tłuszczów, w tym nienasyconych kwasów tłuszczowych z grupy *omega* – 3, głównie kwasu eikozapentaenowego – EPA oraz dokozaheksaenowego – DHA [14, 29, 30, 31]. Kwasy te między innymi zapobiegają miażdżycy, wspomagają rozwój i pracę mózgu oraz wpływają na prawidłową ostrość widzenia. Ponadto redukują poziom triglicerydów we krwi i zmniejszają ryzyko zachorowań na raka [30, 32]. Mięśnie ryb zawierają średnio 50–85% wody, 10–25% białka, 0,2–30% tłuszczu (najczęściej 1–8%), 0,5–5,6% soli mineralnych, 0,1–0,4% węglowodanów w postaci glikogenu [33, 34]. Ryby pod względem zawartości niektórych składników mineralnych znacznie przewyższają inne rodzaje żywności. Średnia zawartość wapnia w tuszach ryb na poziomie 5-750 mg/100g mięsa jest prawie 10-krotnie wyższa niż w wołowinie. Najwięcej wapnia (powyżej 1%) zawierają konserwy i ryby wędzone z drobnych ryb całych (szprot, sardynka) oraz marynaty i ryby solone. Pod względem zawartości fosforu (10-1110 mg/100g mięsa) mięso ryb przewyższa wołowinę i wieprzowinę o około 15%. Zawartość magnezu w mięsie ryb nie jest specjalnie zależna od gatunku ryby i wynosi średnio 25 mg/100g mięsa. Wyższą od ryb zawartością magnezu (powyżej 40 mg/100g mięsa), charakteryzują się skorupiaki i inne bezkręgowce morskie [35, 36]. Żywność pochodzenia morskiego jest przede wszystkim jednym z najlepszych źródeł również fluoru i manganu [35].

4. Zawartość metali ciężkich w tkankach ryb

Poza prozdrowotnymi składnikami odżywczymi, mięso ryb i ich przetwory mogą zawierać również substancje niepożądane w żywieniu człowieka [2, 37]. Coraz większe zanieczyszczenie środowiska sprawia, że organizmy wodne poza cennymi składnikami odżywczymi są również źródłem substancji szkodliwych [30]. Ryby zajmując jedno z ostatnich

ogniw w łańcuchu troficznym ekosystemu wodnego mogą akumulować znaczne ilości metali ciężkich [11, 14].

Zanieczyszczenie środowiska jest ściśle związane ze stopniem industrializacji określonego regionu geograficznego. Dlatego zakłada się, że ryby hodowane na terenach uprzemysłowionych (w województwie śląskim) będą zawierały więcej metali ciężkich niż ryby hodowane na terenach charakteryzujących się większym udziałem gospodarstw rolnych (w województwie małopolskim) [9]. W badaniach Tkaczewskiej i Migdała [9] nie wykazano zwiększonego stężenia metali ciężkich w mięśniach pstrągów z hodowli usytuowanej w województwie śląskim w porównaniu z rybami pochodzącymi z innych rejonów. Ponadto Tkaczewska i Migdał [9] wykazali na podstawie przeprowadzonych badań niewielkie pozostałości zanieczyszczeń środowiskowych w mięśniach pstrągów hodowlanych. Według tych autorów może to być wynikiem ścisłej kontroli zarówno jakości pasz stosowanych w hodowli zwierząt, jak i warunków środowiskowych, w jakich te zwierzęta przebywają oraz stosunkowo krótkim cyklem produkcji pstrąga.

W mięsie ryb wielu autorów [2, 38] wykazuje często podwyższoną zawartość metali ciężkich, a w szczególności rtęci. Rtęć kumuluje się w łańcuchu troficznym organizmów wodnych, dlatego też ryby i owoce morza stanowią istotne źródło pobrania tego toksycznego pierwiastka [30, 39, 40]. Badania wskazują również na większą kumulację związków rtęci w osadach dennych [40]. Z tego powodu ryby bardzo często wykorzystywane są jako bioindykatory zanieczyszczenia środowiska substancjami toksycznymi i szkodliwymi dla zdrowia konsumentów [2, 37]. Zdaniem Dumy i in. [2] oraz Rudego [41] stężenie rtęci w mięsie ryb przekracza zawartość tego pierwiastka w porównaniu z mięsem innych gatunków zwierząt [30, 40]. Również tkanka mięsna pozyskiwana od ryb zawiera więcej rtęci w porównaniu do innych gatunków zwierząt pochodzących z badanego regionu (województwo podkarpackie). Najprawdopodobniej pierwiastek ten przedostaje się do wód śródlądowych za pośrednictwem ścieków melioracyjnych z pól uprawnych, na których rolnicy stosują duże ilości nawozów i środków ochrony roślin [2].

Stężenie rtęci w rybach jest bardzo zróżnicowane [42]. Na Występowanie tego pierwiastka w mięśniach ryb wpływa wiele czynników: zawartość rtęci w wodzie, temperatura, obecność tlenu rozpuszczonego oraz węgla organicznego, odczyn wody, rodzaj spożywanego pokarmu, jak również gatunek, wiek oraz rozmiar ryb [40, 42].

Metale ciężkie są akumulowane w systemie wydzielania wewnętrznego. Rtęć w ilości $0,03 \text{ gHg/m}^3$ w wodzie rzecznej może ulec akumulacji do $0,3 \text{ mgHg/kg}$ w organizmie ryb. Jest to poziom, który zawiera się w zakresie mogącym powodować zakłócenie pracy gruczołów dokrewnych. U ryb

pochodzących z niektórych obszarów zanieczyszczonych wykryto nawet wyższe zawartości tego pierwiastka [43]. Rtęć w tkankach mięśni ryb może osiągać poziom milion razy wyższy niż stężenie tego toksycznego metalu w wodzie [42]. Średnia całkowita zawartość rtęci w jadalnych częściach produktów rybołówstwa i mięsa ryb zgodnie z rozporządzeniem Komisji (UE) nie może przekraczać 0,50 mg/kg [44].

Rtęć wskutek metabolizmu mikroorganizmów może się przekształcić w metylortęć gromadząc się w organizmach (biokoncentracja) lub akumulować w łańcuchach troficznych (biomagnifikacja). Dotyczy to zwłaszcza środowiska wodnego, ryb oraz ssaków morskich. Szacuje się, że od 75 do 95% rtęci w rybach i owocach morza ma formę metylortęci [42, 45, 46]. Metylortęć budzi największy niepokój. Związek ten jest silną neurotoksyną, która włączając się do łańcucha pokarmowego akumuluje się w rybach drapieżnych, u ludzi i w całej żywej przyrodzie. U kobiet w ciąży metylortęć atakuje rozwijający się mózg płodowy oraz centralny układ nerwowy [42]. Pierwsze masowe zatrucie rtęcią dotyczyło dużej grupy osób systematycznie jedzących ryby złowione w wodach zanieczyszczonych związkami rtęci Zatoki Minamata w Japonii [25]. U setek osób stwierdzono poważne objawy uszkodzeń mózgu. Znane są przypadki śmiertelnego zatrucia rtęcią [25, 38].

Metylortęć może stanowić nawet ponad 90% rtęci całkowitej zawartej w organizmach wodnych. Gatunki drapieżne ryb: szczupak, rekin, tuńczyk, miecznik, znajdujące się na szczycie łańcucha pokarmowego charakteryzują się znacznie większą kumulacją metylortęci w porównaniu z pozostałymi gatunkami ryb. Związane jest to nie tylko z samym sposobem odżywiania ryb, ale również z ich wiekiem, ruchliwością i miejscem hodowli. Gatunki denne żyjące na dnie zbiorników wodnych mogą również zawierać więcej metylortęci. W przypadku tuńczyka średnia zawartość metylortęci w zależności od gatunku wynosi: tuńczyk bonito (*Katsuwonus pelamis*) – 0,15 µg/g, tuńczyk biały (*Thunnus alalunga*), tuńczyk błękitno-płetwy (*Thunnus thynnus*) – 0,49 µg/g. Stężenie metylortęci w mięsie ryb może stanowić od 75 do 100% rtęci całkowitej, średnio około 91%. Istnieją jednak gatunki: marlin błękitny (*Makaira nigricans*), a także szproty czy małż – omulek jadalny (*Mytilus edulis*), w których stosunek metylortęci do rtęci całkowitej wynosi poniżej 50%. Przyczyn tych dysproporcji upatruje się w zmianach klimatycznych. O wyższej możliwości kumulowania metylortęci głównie przez gatunki drapieżne ryb: miecznik (0,94 µg/g), gardłosz (0,57 µg/g), tuńczyk (0,33 µg/g), węgorz (0,32 µg/g świeżej masy) świadczą dane liczbowe pochodzące z Francji [30].

W mięsie ryb: śledzia, szprota, dorsza, czarniaka i plamiaka – średnia zawartość rtęci nie przekracza 0,1 µg/g. W przypadku tkanki mięśniowej

ryb drapieżnych występuje ok. 0,5–1,0 $\mu\text{g/g}$ rtęci, a w przypadku szczególnie dużych osobników do kilku $\mu\text{g/g}$ [42].

Beldowska i in. [47] wykazali trzykrotnie wyższą koncentrację rtęci w skrzelach (ok. 10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) oraz dwukrotnie wyższą w gonadach (ok. 7 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) storni zatokowej w porównaniu ze stornią pełnomorską. W tkance mięśniowej ryb, w której wykazano najwyższe stężenie Hg, poziom analizowanego pierwiastka był 30% większy w rybach z zatoki (35 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) w porównaniu z organizmami z otwartego morza (25 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$). W latach 1996–2000 przeprowadzono badania ryb odłowionych w Międzyodrze (dolny bieg Odry) oraz w rejonie Wrocławia (górny bieg Odry). Największe ilości rtęci oznaczono w mięśniach okoni oraz boleni z rejonu Międzyodrze, u których wykazano odpowiednio 0,28 mg/kg i 0,23 mg/kg analizowanego pierwiastka [42].

W polskiej strefie brzegowej Bałtyku w sezonie zimowym, wysokie stężenie rtęci oznaczono w tkance mięśniowej storni (25 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) w porównaniu ze skrzelami (ok. 10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) czy gonadami (ok. 2 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) [47]. Porównując zawartości rtęci w narządach ryb zauważono, że w większości przypadków najwyższe stężenia tego pierwiastka występowały w mięśniach. Dlatego stwierdza się, że ryby kumulują rtęć głównie w tkance mięśniowej, w mniejszym stopniu w wątrobie i jelitach [42].

W badaniach Stężyckiej i in. [40] średnie stężenie rtęci w wątrobie ryb stanowiło od 50% do 70% średniego stężenia rtęci w mięśniach ryb. Beldowska i in. [47] wykazali, że zawartość rtęci w analizowanych rybach pochodzących z Zatoki Puckiej była nierównomiernie akumulowana u poszczególnych osobników tego samego gatunku, również w ich narządach i samych tkankach. Stężenie rtęci w tkance mięśniowej w pobliżu płetwy ogonowej dorsza na poziomie ok. 21 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ było dwudziestokrotnie wyższe, a u storni nawet trzydziestokrotnie (ok. 30 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) wyższe w porównaniu z mięśniami w okolicy głowy (ok. 1 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ – u dorsza i storni). Jest to prawdopodobnie związane z intensywniejszym przyrostem w okolicach głowy tkanki mięśniowej i jej większą masą niż tkanki w okolicach płetwy ogonowej, gdzie koncentracja rtęci się pogłębia.

W tkankach ryb odłowionych w Wiśle w pobliżu Warszawy i Włocławka w latach 1998, 2000 i 2002 najwyższe stężenie rtęci, dla ryb drapieżnych oznaczono w mięśniach bolenia 0,45 mg/kg i 0,35 mg/kg świeżej masy w 2002 roku oraz szczupaka – 0,25 mg/kg w 2000 roku. Wśród ryb niedrapieżnych najwyższy poziom rtęci oznaczono w mięśniach leszcza – 0,33 mg/kg w 2000 roku i 0,31 mg/kg w 2002 roku. Średnie stężenie rtęci w mięśniach badanych ryb wynosiło 0,122 mg/kg w 1998 roku, 0,169 mg/kg w 2000 roku i 0,209 mg/kg w 2002 roku [42].

Według danych GUS [48], zawartość rtęci w mięśniach karpia w 2001 roku mieściła się w zakresie od 0,003 mg/kg do 0,148 mg/kg.

Poziom rtęci całkowitej w tkance mięśniowej ryb dostępnych w handlu kształtował się następująco: łosoś 0,092 mg/kg, płotka 0,168 mg/kg, śledź 0,359 mg/kg, tuńczyk 0,415 mg/kg. W przypadku ryb pochodzących z prywatnych hodowli z okolic Łodzi stężenie rtęci wynosiło: karp 0,156 mg/kg, zębacz 0,296 mg/kg, okoń 0,320 mg/kg [42].

W ramach badań monitoringowych przeprowadzonych w Polsce średnie zanieczyszczenie rtęcią w tej grupie środków spożywczych wyniosło w przypadku ryb 0,035 mg/kg [30]. W wyniku przeprowadzonych badań Duma i in. [2] wykazali w tkance mięśniowej ryb pozyskiwanych z województwa podkarpackiego w latach 2002–2010 średnią zawartość rtęci na poziomie 0,015 mg/kg (tab. 3). W badaniach Stężyckiej i in. [40] w żadnej z przebadanych próbek ryb nie wystąpiło przekroczenie dopuszczalnego stężenia rtęci (wynoszącego 0,5 mg/kg). Najwyższe stężenie rtęci wykryto w mięśniach bolenia (0,450 mg/kg) i leszcza (0,330 mg/kg). Poziom akumulacji Hg w mięśniach badanych ryb wynosił 0,122 mg/kg w 1998 roku, 0,169 mg/kg w 2000 roku i 0,209 mg/kg w 2002 roku. W wątrobie natomiast 0,101 mg/kg w 2000 roku i 0,142 mg/kg w 2002 roku. Stężycka i in. [40] stwierdzili również, że zanieczyszczenie rtęcią ryb pochodzących z Wisły było większe niż innych ryb słodkowodnych w kraju. Dla leszczy odłowionych z Wisły w okolicach Czerwińska w latach 1996–1997 średnie stężenie rtęci w mięśniach wynosiło odpowiednio 0,106 mg/kg i 0,256 mg/kg, a w wątrobie tych ryb 0,076 mg/kg i 0,174 mg/kg. Ryby niedrapieżne odłowione w Bugo-Narwi zawierały średnio 0,064 mg/kg rtęci, a drapieżne 0,189 mg/kg. Dla porównania Szkoła i in. [4] wykazali średnie stężenie rtęci w mięśniach ryb na poziomie 0,036 mg/kg, a wykazana maksymalna wartość osiągnęła poziom 0,361 mg/kg. W badaniach Rudego [41] przeprowadzonych w latach 2002–2006 w rejonie Polski południowo-wschodniej (okolice województw podkarpackiego i lubelskiego) poziom akumulacji rtęci w mięsie karpi wahał się w przedziale od 0,006 mg/kg do 0,008 mg/kg. Ponadto wraz z wiekiem karpi zwiększyła się zawartość rtęci w mięsie. Ilość tego pierwiastka w mięsie karpi najmłodszych wyniosła 0,005 mg/kg i wzrosła w surowcu z kolejnych grup wiekowych odpowiednio o 60% i 180% (tab. 2). W innych badaniach ten sam autor [49] wykazał stężenie rtęci w mięsie karpi na poziomie 0,008 mg/kg. W badaniach Tkaczewskiej i Migdała [9] zawartość rtęci w mięśniach ryb w hodowlach z województw: śląskiego i warmińsko-mazurskiego była mniejsza niż 0,02 mg/kg. Poziom rtęci w tkankach ryb z hodowli położonej w południowo-zachodniej części województwa świętokrzyskiego wynosił 0,03 mg/kg masy ciała, a w mięśniach pstrągów z hodowli położonej w południowej części województwa małopolskiego 0,02 mg/kg.

Dość powszechnym składnikiem wód jest arsen. Naturalna zawartość tego pierwiastka w wodzie wynosi około 10 $\mu\text{g}/\text{dm}^3$. Zanieczyszczenie wód

arsenem związane jest przede wszystkim ze ściekami przemysłowymi i komunalnymi oraz opadami pyłów atmosferycznych. Dodatkowo arsen może się przedostawać do wód na skutek wymywania gleb zawierających pozostałości środków ochrony roślin [50]. Największe ilości arsenu w całodziennej racji pokarmowej pochodzą z ryb i owoców morza oraz z wody pitnej [16, 17, 50]. W żywności wykrywa się zawartość arsenu na poziomie kilku setnych mg/kg. Wyjątek stanowią ryby i inne organizmy morskie i ich przetwory, w których ilości te są kilkakrotnie wyższe [50]. Najwyższe stężenie arsenu zawierają ryby morskie, u których występuje on głównie w formie organicznej, uznawanej za mało toksyczną. W rybach słodkowodnych stwierdzono zaś znacznie niższe poziomy tego pierwiastka [41]. Organiczne związki arsenu: arsenobetaina (AsB) czy arsenocholina (AsC), są dominującymi formami występującymi w organizmach morskich, zarówno roślinnych – glony, jak i zwierzęcych – ryby, skorupiaki, mięczaki. Mechanizm obronny tych organizmów polega na przekształcaniu nieorganicznych związków arsenu w mniej szkodliwe formy organiczne. Arsenobetaina stanowi od 75 do 95% całkowitej zawartości arsenu w rybach i jest łatwo oraz szybko absorbowana w układzie pokarmowym, a także szybko eliminowana z organizmu [51].

Uwzględniając brak limitów w odniesieniu do arsenu wiele państw członkowskich Unii Europejskiej ustaliło tzw. krajowe poziomy działania dla tego pierwiastka w wielu produktach żywnościowych, które nie są objęte rozporządzeniem Komisji (WE) Nr 1881/2006 [3]. Również w Polsce Główny Lekarz Weterynarii podjął decyzję, by przy interpretacji wyników badań kontrolnych pozostałości chemicznych w żywności zwierzęcego pochodzenia stosować poziomy działania zamieszczone w Krajowym programie badań kontrolnych obecności substancji niedozwolonych oraz pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów leczniczych u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego (tab. 1), który corocznie jest zatwierdzany przez Głównego Lekarza Weterynarii i Komisję Europejską, stając się obowiązującym prawem [4].

Tab. 1. Najwyższe dopuszczalne poziomy wybranych pierwiastków toksycznych w rybach (mg/kg św. m.), przyjęte dla urzędowych badań kontrolnych [4]

Produkt	Ołów	Kadm	Rtęć	Arsen
Ryby	0,30	0,05	0,50	4,00

Naturalna zawartość arsenu w organizmach zwierzęcych zależy od środowiska i badanych tkanek [52]. Szkoda i in. [51] wykazali w mięśniach ryb słodkowodnych wyższe stężenia arsenu, ale nieprzekraczające limitów dopuszczalnej zawartości tego pierwiastka. W przypadku ryb (karp, pstrąg) średnia zawartość arsenu w mięśniach kształtowała się na poziomie 0,228

mg/kg, natomiast w wątrobie 0,002 mg/kg. Istotne jest to, że w badaniach kontrolnych ryb pochodzących z importu wykazano, że zawierają one znacznie większe stężenia arsenu niż ryby słodkowodne hodowane w Polsce: łosoś – od 0,10 mg/kg do 3,97 mg/kg, panga – od 0,04 mg/kg do 0,08 mg/kg, pstrąg – od 0,98 mg/kg do 1,54 mg/kg, węgorz – od 0,93 mg/kg do 1,03 mg/kg, łupacz – od 6,48 mg/kg do 27,53, dorsz – od 7,97 mg/kg do 30,24 mg/kg. W świetle obowiązujących unormowań prawnych ryby, w których zawartość arsenu przekraczała 4 mg/kg zostały uznane jako nieprzydatne do spożycia. W innych badaniach Szkoła i in. [53] stwierdzili stężenie arsenu w próbach mięśni i wątroby karpia na poziomie od 0,016 mg/kg do 0,040 mg/kg. Zawartości te nie różniły się w ciągu trzech lat prowadzonych badań (1995–1997) i były niższe od obowiązujących limitów. Z kolei Duma i in. [2] wykazali, że akumulacja arsenu w mięsie ryb pochodzących z województwa podkarpackiego za cały okres badań (2002–2010) wynosiła 0,037 mg/kg (tab. 3). W badaniach Szkoła i in. [4] wykazano zawartość arsenu w mięsie ryb na poziomie 0,121 mg/kg, a najwyższe maksymalne stężenie analizowanego pierwiastka wyniosło 1,542 mg/kg. Z kolei Rudy [41] w przeprowadzonych w rejonie Polski południowo-wschodniej (okolice województw podkarpackiego i lubelskiego) badaniach w latach 2002–2006 w żadnej grupie wiekowej w tkankach karpia nie stwierdził obecności arsenu w ilości powyżej 0,001 mg/kg (tab. 2). Natomiast Tkaczewska i Migdał [9] wykazali zawartość arsenu w tkankach ryb pochodzących ze wszystkich badanych hodowli na poziomie mniejszym niż 0,1 mg/kg.

Zanieczyszczenie wód łożyskami ma miejsce zazwyczaj w pobliżu zakładów produkcyjnych, które uwalniają nieoczyszczone ścieki. Związki łożyskami w wyniku wytrącania i sedymentacji substancji nierozpuszczalnych w wodzie ulegają akumulacji w mule i osadach rzecznych. Rolnictwo, głównie poprzez stosowanie nawozów azotowych zawierających Pb, wpływa również na stan zanieczyszczenia łożyskami wód powierzchniowych, rzek i jezior. Z danych przedstawionych przez Państwowy Instytut Geologiczny w latach 1990–1991 wynika, że największe skażenie osadów łożyskami występuje m.in. w okolicach Legnicy, Konstancina, Mysłowic oraz Oświęcimia [54]. Zaobserwowano, że koncentracja łożyskami w tkankach ryb zmniejsza się wraz z ich wiekiem. Tłumaczy się to większą aktywnością i zapotrzebowaniem na tlen i energię młodszych ryb. Dodatkowo u starszych ryb lepiej funkcjonują mechanizmy obronne, dlatego eliminacja związków szkodliwych jest szybsza [9, 11].

Średnia zawartość łożyskami w mięsie ryb z województwa podkarpackiego w latach 2002–2010 wynosiła 0,055 mg/kg (tab. 3). Należy stwierdzić, że wartość ta jest dużo niższa od maksymalnego dopuszczalnego stężenia łożyskami [2], które zgodnie z rozporządzeniem Komisji (UE) 2015/1005 [55]

nie powinno przekraczać dla mięsa ryb wartości 0,30 mg/kg Pb świeżej masy. W badaniach Staszowskiej i in. [12] przeciętna zawartość ołowiu w mięsie analizowanych gatunków ryb wahała się od 0,0429 mg/kg do 0,2349 mg/kg. Wykazano, że mięśnie ryb dziko żyjących (zarówno morskich, jak i słodkowodnych) charakteryzowały się istotnie większą zawartością ołowiu, w porównaniu z mięsem ryb pochodzących z akwakultury. W mięśniach ryb z akwakultury wykazano akumulację Pb na poziomie 0,0432 mg/kg. Z kolei mięśnie ryb morskich i słodkowodnych dziko żyjących zawierały zbliżoną zawartość ołowiu (odpowiednio 0,1419 mg/kg i 0,1644 mg/kg). Istotnie najwięcej ołowiu zawierały mięśnie śledzi i płoci (odpowiednio 0,2349 mg/kg i 0,2145 mg/kg), następnie dorszy i okoni (odpowiednio 0,1171 mg/kg i 0,1030 mg/kg), najmniej natomiast pstrągów tęczowych i karpia (około 0,043 mg/kg). Istotne jest, że w badanych mięśniach ocenianych gatunków nie stwierdzono przekroczenia dopuszczalnego limitu zawartości ołowiu, poza jedną próbką płoci, w której stężenie ołowiu wynosiło 0,3437 mg/kg [12]. Staniak [10] podaje, że średnie stężenie tego pierwiastka w mięsie ryb wynosi 0,016 mg/kg, a najwyższe 0,190 mg/kg. Z kolei Szkoda i in. [4] stwierdzili w mięśniach ryb zawartość Pb na poziomie 0,016 mg/kg, a maksymalna wykazana wartość osiągnęła poziom 0,190 mg/kg i nie przekroczyła najwyższej dopuszczalnej zawartości rtęci. Rudy [41] w przeprowadzonych badaniach w rejonie Polski południowo-wschodniej (okolice województw podkarpackiego i lubelskiego) w latach 2002-2006 wykazał zawartość ołowiu w mięsie karpia w latach 2002-2005 na poziomie 0,060 mg/kg. Stężenie to nieznacznie tylko wzrosło w roku 2006 o 13%. Ponadto zawartość ołowiu w mięsie była wysoko skorelowana z wiekiem ryb. Ilość tego metalu była najmniejsza w tkance mięśniowej karpia najmłodszych 0,042 mg/kg i wzrastała w mięsie uzyskanym z kolejnych grup wiekowych karpia odpowiednio o 36% i 55% (tab. 2). W innych badaniach Rudy [49] wykazał stężenie Pb w mięsie karpia na poziomie 0,061 mg/kg. Niski stopień akumulacji Pb w mięsie ryb wykazali również Grela i in. [56], odpowiednio: w mięsie karpia – 0,05 mg/kg, leszcza – 0,02 mg/kg, szczupaka – 0,03 mg/kg i sandacza – 0,04 mg/kg. W badaniach Tkaczewskiej i Migdała [9] zawartość ołowiu w tkankach ryb ze wszystkich badanych hodowli była mniejsza niż 0,05 mg/kg.

W największych ilościach metale ciężkie odkładają się w tkankach i organach miękkich [11]. Drąg-Kozak i in. [11] największą koncentrację ołowiu wykazali w śledzionie dwuletnich pstrągów jesienią (14,28 mg/kg), następnie w jelicie jednorocznych ryb pobranych wiosną (13,26 mg/kg). Najmniej ołowiu zanotowano w sercu jednorocznych pstrągów złowionych jesienią i wiosną – odpowiednio 0,03 mg/kg oraz 0,04 mg/kg. Również w mięśniach koncentracja była mała i nie przekroczyła wartości 0,46 mg/kg u pstrągów jednorocznych i 0,39 mg/kg u dwuletnich.

Tab. 2. Zawartość pierwiastków toksycznych w mięsie karpia w zależności od wieku (mg/kg) [41]

Metale ciężkie	do 2 lat		2-3 lat		powyżej 3 lat	
	\bar{x}	X_{\max}	\bar{x}	X_{\max}	\bar{x}	X_{\max}
Pb	0,042	0,053	0,057	0,063	0,065	0,078
Cd	0,008	0,012	0,015	0,017	0,020	0,021
Hg	0,005	0,007	0,008	0,012	0,014	0,017
As	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Objaśnienie; ns – nie stwierdzono obecności powyżej 0,001 mg/kg

Spośród metali ciężkich największe zagrożenie dla człowieka stanowią: ołów, kadm, rtęć oraz cynk [4, 6, 10, 16, 17, 18]. Pierwiastki te są zaliczane do priorytetowych zanieczyszczeń żywności, ponieważ stwarzają największe zagrożenie dla zdrowia ludzkiego, zarówno ze względu na ich właściwości toksykologiczne i powszechność występowania [5]. Kadm wprowadzany jest do środowiska głównie w procesach przemysłowych [37], dlatego występuje w dużych ilościach w rejonach skażenia przemysłowego, znajduje się również w dymie papierosowym, w wodzie wodociągowej, w glebie i żywności [16, 49].

Najwyższe koncentracje kadmu odnotowano w powietrzu atmosferycznym ($5,23 \text{ ng/m}^3$) i w glebie (290 mg/kg) w pobliżu hut cynku i ołowiu zlokalizowanych w województwie śląskim, a także w roślinach [57]. Głównymi docelowymi organami kumulującymi kadm są wątroba i część korowa nerek [7, 24, 25], a także trzustka, jelita, gruczoły oraz płuca. Ilość kadmu w organizmach zwiększa się z wiekiem, ponieważ okres jego połowicznego zaniku w organizmie wynosi ok. 20-30 lat. Średnio na tydzień człowiek z pożywieniem wprowadza do organizmu od 0,2 do 0,4 mg Cd, przy dopuszczalnych granicach określonych przez WHO na poziomie 0,4-0,5 mg [25].

Średnie stężenie Cd w mięsie ryb w latach 2002-2010 pochodzących z województwa podkarpackiego wynosiło $0,007 \text{ mg/kg}$ (tab. 3) [2]. Brucka-Jastrzębska i Protasowicki [58] określili poziom kadmu w tkankach i narządach karpia hodowanych w wodach województwa zachodniopomorskiego, ze szczególnym uwzględnieniem rzeki Odry. Badania zostały przeprowadzone na 5-miesięcznych karpkach. Według tych autorów stężenie badanego pierwiastka kształtowało się na poziomie od $0,004 \text{ }\mu\text{g/g}$ do $0,053 \text{ }\mu\text{g/g}$. Najwyższą zawartość kadmu wykazano w przypadku wątroby ($0,053 \text{ }\mu\text{g/g}$), skrzeli ($0,039 \text{ }\mu\text{g/g}$) i nerek ($0,031 \text{ }\mu\text{g/g}$), natomiast najniższą w mięśniach ($0,004 \text{ }\mu\text{g/g}$), skórze ($0,022 \text{ }\mu\text{g/g}$) i przewodzie pokarmowym ($0,029 \text{ }\mu\text{g/g}$). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zawartość badanego pierwiastka (Cd) mieściła się w granicach norm fizjologicznych określonych dla ryb karpowatych. Również w ba-

daniach Szkody i in. [4] nie stwierdzono przekroczenia najwyższych dopuszczalnych zawartości, wynoszących dla kadmu zgodnie z rozporządzeniem Komisji (UE) Nr 488/2014 [59] 0,05 mg/kg. Akumulacja Cd w badanych mięśniach ryb osiągnęła poziom 0,001 mg/kg, a wykazana wartość maksymalna wyniosła 0,012 mg/kg.

W badaniach Tkaczewskiej i Migdała [9] mięśnie ryb z hodowli położonej w województwie śląskim, w dolinie górnej Wisły, u podnóży Beskidu Śląskiego, u zbiegu rzek Brynicy i Wisły zawierały średnio 0,014 mg kadmu na kg masy ciała, natomiast próby pochodzące z pozostałych badanych hodowli cechowały się zawartością tego pierwiastka mniejszą niż 0,010 mg/kg.

Rudy [41] w przeprowadzonych badaniach w rejonie Polski południowo-wschodniej (okolice województw podkarpackiego i lubelskiego) w latach 2002-2006 wykazał podobną zawartość kadmu w mięsie karpia w latach 2002-2004 oraz 2006 i wahała się w granicach 0,009-0,010 mg/kg. Stężenie Cd w tej tkance wzrosło o 67% w roku 2005 i osiągnęło poziom 0,015 mg/kg. Ponadto według tego autora wraz z wiekiem karpia wzrastało stężenie kadmu w mięsie z poziomu 0,008 mg/kg w grupie do 2 lat o 87% w grupie od 2 do 3 lat i o 150% w grupie powyżej 3 lat (tab. 2). O zwiększającej się akumulacji kadmu wraz z wiekiem ryb w większości tkanek i organów, w przeciwieństwie do ołowiu, podkreśla literatura [11]. Rudy [49] w innych badaniach wykazał zawartość Cd w mięsie karpia na poziomie 0,011 mg/kg.

Poziom akumulacji Cd w mięsie ryb był również przedmiotem badań Greli i in. [56], którzy wykazali w mięsie karpia, leszcza, szczupaka i sandacza stężenie tego pierwiastka na niskim poziomie 0,001 mg/kg. W badaniach Drąg-Kozak i in. [11] najwięcej kadmu odnotowano w śledzionie dwuletnich pstrągów jesienią (1,65 mg/kg), w jelicie jesienią (1,18 mg/kg) oraz w nerkach jednorocznych ryb wiosną (1,16 mg/kg). Najmniej Cd odnotowano w mięśniach jednorocznych ryb (0,003 mg/kg). Nie stwierdzono przekroczenia dopuszczalnego poziomu kadmu w mięsie ryb. Fakt ten jest korzystny z punktu widzenia konsumenta, ponieważ 2-letnie pstrągi tęczowe są przeznaczone do spożycia.

Tab. 3. Zawartość pierwiastków toksycznych w mięsie ryb pozyskanych na terenie województwa podkarpackiego w poszczególnych latach (mg/kg) [2]

Rok	Metale ciężkie			
	As	Cd	Pb	Hg
2002	0,014	0,003	0,022	0,009
2003	<0,05	0,008	0,058	0,012
2004	<0,05	0,009	0,066	0,005
2005	<0,05	0,019	0,053	0,016
2006	<0,05	0,01	0,052	0,017
2007	<0,05	0,004	0,019	0,022
2008	<0,05	0,007	0,067	0,030
2009	0,014	0,003	0,111	0,009
2010	0,010	0,003	0,043	0,015
– x	0,037	0,007	0,055	0,015

5. Podsumowanie

Ryby stanowią jeden z podstawowych składników diety człowieka już od najdawniejszych czasów. Są zalecanymi składnikami diety, dostarczają pełnowartościowego białka, witamin, soli mineralnych oraz kwasów tłuszczowych, szczególnie omega-3. Coraz większe zanieczyszczenie środowiska sprawia, że organizmy wodne poza cennymi składnikami odżywczymi są również źródłem substancji szkodliwych. W mięsie ryb wykazuje się często podwyższoną zawartość metali ciężkich, a w szczególności rtęci. Oceny wyników zawartości ołowiu, kadmu i rtęci w żywności dokonuje się zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) Nr 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. wraz z późniejszymi zmianami, ustalającym najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych. Z obszernej literatury dotyczącej pobierania i rozmieszczania metali ciężkich w ciele ryb wynika, że ich kumulacja w tkance mięśniowej jest stosunkowo niewielka. W największych ilościach pierwiastki te odkładają się w tkankach i organach miękkich: wątroba, nerki, śledziona, przewód pokarmowy i skrzel. Z przedstawionego piśmiennictwa wynika, że ryby na ogół nie wykazują przekroczenia dopuszczalnych zawartości metali ciężkich. Występujący na niskim poziomie stopień akumulacji pierwiastków toksycznych w rybach nie stwarza zagrożeń dla zdrowia konsumentów.

Literatura

1. Horoszewicz E., Pieniak-Lendzion K., Niedziółka R., Łukasiewicz M. *Porównanie zawartości wybranych metali w tkance mięśniowej oraz narządach wewnętrznych koziolków i tryczków*, Acta Scientiarum Polonorum, Zootechnica., 9, 1 (2010), s. 15-20
2. Duma P., Pawlos M., Rudy M. *Zawartość metali ciężkich w wybranych produktach spożywczych województwa podkarpackiego*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna., 46 (2012), s. 94-100
3. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1881/2006 z dnia 19 grudnia 2006 r. ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (L 364/5 20.12.2006)
4. Szkoła J., Nawrocka A., Kmiecik M., Żmudzki J. *Badania kontrolne pierwiastków toksycznych w żywności pochodzenia zwierzęcego*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych., 48 (2011), s. 475-484
5. Bartodziejska B., Gajewska M., Czajkowska A. *Oznaczenie poziomu zanieczyszczeń metalami ciężkimi żywności pochodzącej z samodzielnej produkcji rolnej techniką spektrometrii absorpcji atomowej*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych., 43 (2010), s. 38-44
6. Nierzwicki W. *Jakość żywności. Wydanie II zmienione*, Wyższa Szkoła Turystyki i Hotelarstwa w Gdańsku., Gdańsk. 2010
7. Heś M., Nadolna J. *Ocena zawartości wybranych metali ciężkich w kaskach błyskawicznych dla niemowląt i małych dzieci*, Nauka Przyroda Technologie., 4, 2, 18 (2010), s. 1-10
8. Bosch A.C., O'Neill B., Sigge G.O., Kerwathb S.E., Hoffmann L.C. *Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review*, Journal of the Science of Food and Agriculture., 96 (2016), s. 32-34
9. Tkaczewska J., Migdał W. *Porównanie wydajności rzeźnej, zawartości podstawowych składników odżywczych oraz poziomu metali ciężkich w mięśniach pstrąga tęczowego (oncorhynchus mykiss) pochodzącego z różnych rejonów Polski*, Żywność. Nauka Technologia Jakość., 5, 84 (2012), s. 177-186
10. Staniak S. *Źródła i poziom zawartości ołowiu w żywności*, Polish Journal of Agronomy., 19 (2014), s. 36-45
11. Drąg-Kozak E., Łuszczek-Trojnar E., Popek W. *Koncentracja metali ciężkich w tkankach i organach pstrąga tęczowego (Oncorhynchus mykiss) w zależności od wieku i sezonu*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych., 48 (2011), s. 161-169
12. Staszowska A., Skalecki P., Florek M., Litwińczuk A. *Wpływ gatunku i środowiska życia ryb na zawartość ołowiu oraz oszacowanie jego pobrania z tkanki mięśniowej*, Żywność. Nauka Technologia Jakość., 6, 91 (2013), s. 60-68
13. Richardson B.J. *Bioaccumulation of heavy metals in commercially important marine fishes from Mumbai Harbor, India*, Marine Pollution Bulletin., 81 (2014), s. 218-224
14. El-Moselhy Kh.M., Othman A.I., Abd El-Azem H., El-Metwally M.E.A. *Bioaccumulation of heavy metals in some tissues of fish in the Red Sea, Egypt*, Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences., 1 (2014), s. 97-105

15. Protasowicki M., Ciemniak A., Mamińska M. *Metale ciężkie w Minogu Rzecznym *Lampetra fluviatilis* (L. 1758)*, Środkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska. Rocznik Ochrona Środowiska., 13 (2011), s. 1223-1232
16. Skrabka-Błotnicka T. *Higiena żywności*, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu., Wrocław 2001
17. Skrabka-Błotnicka T., Masłowski B. *Bezpieczeństwo żywności*, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu, Wrocław 2008
18. Kumirska J., Gołębiowski M., Paszkiewicz M., Bychowska A. *Skrypt z ochrony środowiska. Analiza żywności*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego., Gdańsk 2010
19. Wuana R.A., Okieimen F.E. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation, International Scholarly Research Notices, Ecology., 2011 (2011), s. 1-20
20. Afshan S., Ali S., Ameen U.S., Farid M., Bharwana S.A., Hannan F., Ahmad R. *Effect of Different Heavy Metal Pollution on Fish*, Research Journal of Chemical and Environmental Sciences., 2, 1 (2014), s. 74-79
21. Manahan S.E. Toksykologia środowiskowa. Aspekty chemiczne i biochemiczne., Wydawnictwo Naukowe PWN., Warszawa 2010
22. Staniskiene B., Matusевичius P., Budreckiene R., Skibniewska K.A. *Distribution of heavy metals in tissues of freshwater fish in Lithuania*, Polish Journal of Environmental Studies., 15, 4 (2006), 585-591
23. Cielecka E., Dereń K. *Jakość żywności dla niemowląt i małych dzieci*, Problemy Higieny i Epidemiologii., 92, 2 (2011), s. 187-192
24. Nieć J., Baranowska R., Dziubanek G., Rogala D. Narażenie środowiskowe dzieci na metale ciężkie zawarte w glebach z placów zabaw, boisk, piaskownic i terenów przedszkoli z obszaru Górnego Śląska, Journal of Ecology and Health., 17, 2 (2013), s. 55-62
25. Ociepa-Kubicka A., Ociepa E. *Toksyczne oddziaływanie metali ciężkich na rośliny, zwierzęta i ludzi*, Inżynieria i Ochrona Środowiska., 15, 2 (2012), s. 169-180
26. Alturiqui A.S., Albedair L.A. Evaluation of some heavy metals in certain fish, meat and meat products in Saudi Arabian markets, Egyptian Journal of Aquatic Research., 38 (2012), s. 45-49
27. Akan J.C., Abdulrahman F.I., Sodipo O.A., Chiroma Y.A. Distribution of Heavy Metals in the Liver, Kidney and Meat of Beef, Mutton, Caprine and Chicken from Kasuwan Shanu Market in Maiduguri Metropolis, Borno State, Nigeria, Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology., 2, 8 (2010), s. 743-748
28. Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C., Egwurugwu, J.N. *Heavy metal pollution and human biotoxic effects*, International Journal of Physical Sciences., 2, 5 (2007), s. 112-118
29. Elnabris K.J., Muzyed S.K., El-Ashgar N.M. Heavy metals concentrations in some commercially important fishes and their contribution to heavy metals exposure in Palestinian people of Gaza Strip (Palestine), Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences., 13 (2013), s. 44-51

30. Mania M., Wojciechowska–Mazurek M., Starska K., Rebeniak M., Postupolski J. *Ryby i owoce morza jako źródło narażenia człowieka na metylortęć*, Roczniki Państwowego Zakładu Higieny., 63, 3 (2012), s. 257-264
31. Petricorena Z.C. *Chemical composition of fish and fishery products*, Handbook of Food Chemistry., 10 (2014), s. 1-28
32. Pirestani S., Ali Sahari M., Barzegar M., Seyfabadi S.J. *Chemical compositions and minerals of some commercially important fish species from the South Caspian Sea*, International Food Research Journal., 16 (2009), s. 39-44
33. Gil M., Głodek E., Rudy M., Stanisławczyk R., Zin M. *Technologia żywności i żywienia*, Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów 2014
34. Wimalasena S., Jayasuriya M.N.S. *Nutrient analysis of some fresh water fish*, Journal of the National Science Council of Sri Lanka., 24, 1 (1996), s. 21-26
35. Polak-Juszczak L. *Składniki mineralne w przetworzonej żywności pochodzenia morskiego*. Inżynieria Rolnicza., 5, 93 (2007), s. 331-337
36. Sikorski Z. E. *Ryby i bezkręgowce morskie pozyskiwanie właściwości i przetwarzanie*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne., Warszawa 2004
37. Benzer, S., Arslan H., Uzel N., Gül A., Yilmaz M. *Concentrations of metals in water, sediment and tissues of Cyprinus carpio L., 1758 from Mogan Lake (Turkey)*, Iranian Journal of Fisheries Sciences., 12, 1 (2013), s. 45-55
38. Boszke L., Głosińska G., Siepak J. *Some aspects of speciation of mercury in a water environment*, Polish Journal of Environmental Studies., 11, 4 (2002), s. 285-298
39. Michalska A. *Analiza zawartości rtęci w środowisku na terenie województwa śląskiego*, Problemy Ekologii., 14, 4 (2010), s. 165-168
40. Steżycka E., Bzdęga J., Pawlikowska K., Siwicki A. *Zawartość rtęci w rybach z Wisły w latach 1998–2002*, Problemy Higieny i Epidemiologii., 86, 1 (2005), s. 27-29
41. Rudy M. *Zawartość zanieczyszczeń środowiskowych w tkankach w zależności od wieku zwierząt i składu chemicznego mięsa*, Wydawnictwo Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów 2010
42. Leśniewska E., Szyrkowska M.I., Paryjczak T. *Główne źródła rtęci w organizmach ludzi nie narażonych zawodowo*, Środkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska., 28, 11 (2009), s. 403-419
43. Biłyk A., Nowak-Piechota G. *Zanieczyszczenie środowiska substancjami powodującymi zakłócenie funkcji endokrynologicznych organizmu*, Ochrona Środowiska., 3, 26 (2004), s. 29-35
44. Rozporządzenie Komisji (UE) NR 420/2011 z dnia 29 kwietnia 2011 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (L 111/3 30.4.2011)
45. Li P., Feng X., Qiu G. *Methylmercury Exposure and Health Effects from Rice and Fish Consumption: A Review*, International Journal of Environmental Research and Public Health., 7 (2010), s. 2666-2691
46. Gochfeld M. *Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption*, Ecotoxicology and Environmental Safety., 56 (2003), s. 174

47. Bełdowska M., Zawalich K., Kwaśniak J., Falkowska L. *Rtęć w rybach w polskiej strefie brzegowej Bałtyku*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych., 31 (2007), s. 394
48. Rocznik Statystyczny, Ochrona Środowiska., GUS. Warszawa. 2002.
49. Rudy M. *Bioakumulacja metali ciężkich w tkankach zwierząt*, Monografia nr 26. Towaroznawstwo i higiena produktów rolno-spożywczych. Wydawnictwo Amal Serwis., Warszawa 2008
50. Łoźna K., Biernat J. *Występowanie arsenu w środowisku i w żywności*, Roczniki Państwowego Zakładu Higieny., 59, 1 (2008), s. 19-31
51. Szkoda J., Żmudzi J., Nawrocka A., Kmiecik M. *Arsen w żywności zwierzęcego pochodzenia – ocena narażenia*, Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych., 41 (2009), s. 128-134
52. Niedzielski P., Siepak M., Siepak J. *Występowanie i zawartości arsenu, antymonu i seleniu w wodach i innych elementach środowiska*, Śródkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska., 15, s. 317-341
53. Szkoda J., Żmudzi J., Żelazny J. *Pierwiastki śladowe w tkankach karpia*, Bromatologia i Chemia Toksykologiczna., 32, 4 (1999), s. 311-316
54. Krzywy I., Krzywy E., Pastuszek-Gabinowska M., Brodkiewicz A. *Ołów – czy jest się czego obawiać?*, Annales Academiae Medicae Stetinensis. Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie., 56, 2 (2010), s. 118-128.
55. Rozporządzenie Komisji (UE) 2015/1005 z dnia 25 czerwca 2015 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów ołowiu w niektórych środkach spożywczych (L 161/9 26.6.2015)
56. Grela E.R., Pisarski R.K., Kowalczyk-Vasilev E., Rudnicka A. *Zawartość składników odżywczych, mineralnych i profil kwasów tłuszczowych w mięsie wybranych gatunków ryb w zależności od terminu odłowu*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość., 4, 71 (2010), s. 63-72
57. Kozłowska A., Mikołajczyk A., Boroń M., Kasperczyk S., Pawlas N. *Narażenie na ołów a stężenie we krwi kadmu, seleniu i wartości morfologii*, Medycyna Środowiskowa – Environmental Medicine., 18, 2 (2015), s. 17-25
58. Brucka-Jastrzębska E., Protasowicki M. *Levels of selected metals in tissues and organs of 5-month-old carp (Cyprinus carpio L.)*, Acta Scientiarum Polonorum, Piscaria., 5, 2 (2006), s. 3-16
59. Rozporządzenie Komisji (UE) NR 488/2014 z dnia 12 maja 2014 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów kadmu w środkach spożywczych (L 138/75 13.5.2014)

Bioakumulacja metali ciężkich w rybach

Streszczenie

Ryby oraz przetwory rybne są ważnym elementem zbilansowanej diety człowieka. Stanowią cenne źródło wysokowartościowego białka, niezbędnych aminokwasów oraz tłuszczów, dostarczają również wielu makro- i mikroelementów. Coraz większe zanieczyszczenie środowiska sprawia, że organizmy wodne poza cennymi składnikami odżywczymi są również źródłem substancji szkodliwych. Ryby zajmując jedno z ostatnich ogniw w łańcuchu troficznym ekosystemu wodnego mogą akumulować znaczne ilości metali ciężkich. Metale ciężkie to pierwiastki wysoce toksyczne dla organizmów żywych. Ocena stopnia skażenia ekosystemów wodnych metalami ciężkimi nie może ograniczyć się tylko do określania ich stężeń w wodzie, ale również w organizmach żywych bytujących w środowisku wodnym. Dlatego celem niniejszej pracy było przedstawienie na podstawie piśmiennictwa koncentracji metali ciężkich w tkankach ryb. W pracy zwrócono również uwagę na skutki narażenia ludzi i zwierząt na pierwiastki toksyczne związane ze spożywaniem zanieczyszczonej żywności. Członkostwo Polski we Wspólnocie Europejskiej obliguje nasz kraj do prowadzenia stałego nadzoru i kontroli pozostałości substancji szkodliwych w środkach spożywczych. Dodatkowo w pracy przedstawiono regulacje prawne dotyczące maksymalnych dopuszczalnych poziomów metali ciężkich w tkankach ryb w aspekcie przydatności do spożycia.

Słowa kluczowe: metale ciężkie, bioakumulacja, ryby

Bioaccumulation of heavy metals in fish

Abstract

Fish and their preserves are important elements of balanced diet of human. They constitute to valuable source of high quality white, essential amino acids and fats. They also get many micro and macroelements. The more polluted environment causes, that water organisms are, apart from valuable nutritionist, sources of harmful substances. Being on one of last links in trophic chain of water ecosystem fish may accumulate considerable amounts of heavy metals. Heavy metals are highly toxic chemical elements for living organisms. The assessment of pollution of water ecosystems by heavy metals cannot be reduced only to determining their concentrations in water, but also on living organisms, which live in them. That is why the aim of the present work was to present concentration of heavy metals in fish tissues based on writing. Results of exposing people and animals to toxic chemical elements, which are connected with eating of polluted food, was also taken into consideration in the presented work. Membership of Poland in European Union obligates our country to conduct constant supervision and control of remains of substances, which are harmful in food. In addition the work presents legal regulations, concerning maximum acceptable levels of heavy metals in fish tissues in aspect of usefulness to eat.

Key words: heavy metals, bioaccumulation, fish

Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* izolowanych z materiału roślinnego

1. Wstęp

Grzyby z rodzaju *Fusarium* są najczęściej występującymi patogenami grzybowymi na świecie. Najpowszechniejsze gatunki występujące w naszym klimacie to *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. oxysporum* oraz *F. sporotrichioides*. Z powodu wysokiej patogeniczności i toksyczności są one przyczyną ogromnych strat gospodarczych [1]. Mogą bytować w glebie, na szczątkach organicznych, a także na przetworzonych produktach spożywczych. Tolerują zmiany temperatury oraz mogą rozwijać się w warunkach małego potencjału wodnego. Grzyby z rodzaju *Fusarium* powszechnie występują na zbożach, stanowiąc poważny problem [2]. Uprawa monokultur bez tradycyjnego płodozmianu, oszczędnościowe systemy uprawy oraz jednostopniowy zbiór plonów przyczynia się do wzrostu porażenia upraw rolniczych [3]. Rośliny mogą być porażane przez patogeniczne grzyby *Fusarium* w różnych fazach rozwojowych, powodując choroby przed- i powschodowe, tj. fuzaryjna zgorzel podstawy źdźbła i korzeni, zamieranie ziarna, zgorzel siewek, fuzariozy kłosów i wiech owsa czy fuzariozę kłosów pszenicy (FHB) [4, 5]. W świetle badań właściwie zaplanowane zabiegi agrotechniczne uznawane są za najważniejszy czynnik zapobiegający rozwojowi grzybowych patogenów. Dobór odmian mniej podatnych na zakażenia przez patogeny odgrywa kluczową rolę w uprawach ekologicznych. Niemniej istotna jest też chemiczna ochrona roślin, która polega m.in. na stosowaniu fungicydów bezpośrednio zwalczających patogeny oraz herbicydów, które pośrednio mogą wpływać na ograniczenie rozwoju chorób grzybowych. Zastosowanie fungicydów zmniejsza porażenie kłosów przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, lecz nie zawsze redukuje w znaczący sposób zawartość metabolitów wtórnych wytwarzanych przez te grzyby w ziarnie [6]. Uzyskane plony mogą być zanieczyszczone niezwykle niebezpiecznymi dla ludzi i zwierząt mikotoksynami. Niektóre z toksyn grzybowych wywierają również działanie fitotoksyczne, przejawiające się wzmożoną patogenicznością grzybów. Takie porażone uprawy mają obniżoną zarówno wartość handlową jak i konsumpcyjną, powodując tym samym również straty ekonomiczne [1].

¹ izapodg@gmail.com, Katedra Biotechnologii, Żywności Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, <http://www.up.lublin.pl/>

2. Cel pracy

Celem pracy jest przedstawienie głównych zagrożeń związanych z patogenicznymi grzybami z rodzaju *Fusarium* oraz omówienie metod izolacji DNA patogenów z materiału roślinnego i ich identyfikacji.

3. Mikotoksyny produkowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium*

Mikotoksyny są to metabolity wtórne pochodzące ze szlaków przemiany materii grzybów pleśniowych. Współczesne definicje toksyn wytwarzanych przez drobnoustroje są różne. Niektóre z nich podają, że mikotoksyny są to organiczne substancje produkowane przez mikroorganizmy, które wykazują szkodliwy wpływ na komórki lub tkanki innych organizmów. Inne natomiast formułują stwierdzenie, że mikotoksynami nazywa się składniki lub produkty mikroorganizmów, które wyekstrahowane i wprowadzone do zwierzęcego gospodarza (bez zasiedlenia) mogą wywołać wystąpienie objawów chorobowych [7]. Spożycie żywności zawierającej toksyny grzybowe oraz kontakt z zarodnikami może mieć poważne konsekwencje dla zdrowia, powodując zatrucia – mikotoksykozy. Głównymi objawami mikotoksykoz są zaburzenia krzepliwości krwi, zaburzenia odporności organizmu oraz procesów trawienia, apatia czy zmęczenie. Badania wykazały, że większość ludzi zjada z pokarmem niewielkie ilości mikotoksyn. Systematyczne pobieranie przez dłuższy okres czasu może prowadzić do ciężkich problemów zdrowotnych. Niektóre toksyny grzybowe są podejrzewane o wywoływanie nowotworów, podczas gdy inne mogą niszczyć wątrobę, nerki, układ rozrodczy lub nerwowy. Mogą być także przyczyną ostrych i przewlekłych zatruc (w tym śmiertelnych), powodować alergie, grzybicę, choroby układu oddechowego, pokarmowego, a także liczne choroby związane z osłabieniem układu odpornościowego. Masowe zatrucia śmiertelne mają charakter wyjątkowy i zazwyczaj lokalny, natomiast długotrwały kontakt konsumenta, nawet z bardzo niskimi stężeniami poszczególnych mikotoksyn może prowadzić do przewlekłych chorób trudnych do ustalenia diagnostycznie [8].

Grzyby z rodzaju *Fusarium* produkują mikotoksyny w okresie wegetacji roślin, ale także podczas ich zbioru, transportu i przechowywania. Najbardziej znane toksyny fuzaryjne to: zearalenon, bowerycyna, związki z grupy trichotecenów (deoksyniwalenol – DON, niwalenol – NIV), moniliformina i fumonizyna [9]. Przez swoje właściwości, trichoteceny są szczególnie niebezpieczne i mają zdolność wnikania do makroorganizmów przez przewód pokarmowy, drogą inhalacji i przez skórę. W wysokich stężeniach mogą spowodować silne uszkodzenia narządów wewnętrznych [10]. Mniejsze dawki nie powodują początkowo reakcji organizmu, ulegają kumulacji w tkankach, a wystąpienie fuzariotoksykozy charakteryzuje się

zróżnicowanym nasileniem [7]. Z uwagi na powszechne występowanie i wielokierunkowy sposób działania wobec różnych organizmów mikotoksyny fuzaryjne stanowią bezpośrednie zagrożenie dla zwierząt i człowieka z racji obecności w łańcuchu pokarmowym. Na poziomie komórkowym trichoteceny odpowiedzialne są za hamowanie biosyntezy białka, redukcję aktywności enzymów, zaburzenia w przepuszczalności błon cytoplazmatycznych, zaburzenia w podziałach komórkowych, indukowanie aberracji chromosomowych i zaburzenia w przebiegu cyklu komórkowego [11]. Mikotoksyny te posiadają także działanie fitotoksyczne przejawiające się hamowaniem kiełkowania nasion, hamowaniem wzrostu korzeni i pędów, redukcji świeżej masy organów roślinnych, chlorozami, więdnieniami i nekrozami. Zatrucie ludzi czy zwierząt mikotoksynami wytwarzanymi przez *Fusarium* następuje głównie w wyniku spożycia zakażonej żywności, np. zbóż, warzyw, orzechów, nasion roślin strączkowych, owoców czy przypraw [1]. Produkty zbożowe są podstawą codziennej diety każdego człowieka, dlatego też niezwykle istotne jest sprawdzanie jakości surowców do produkcji, czyli ziarna i mąki, na obecność mikotoksyn. Kraje Unii Europejskiej zalecają, ażeby zawartość DON w ziarnie pszenicy nie przekraczała wartości 1,75 mg/kg, a w mące 0,75 mg/kg [3].

Procesy unieczynnienia mikotoksyn i ich eliminacji są kosztowne oraz czas- i pracochłonne, dlatego też najbardziej celowe jest zwrócenie uwagi na zapobieganie ich powstawaniu. Zapobieganie tworzeniu się mikotoksyn obejmuje dwa etapy. Pierwszy etap to działania agrotechniczne, do których można zaliczyć:

- dobór odpowiednich odmian mniej podatnych na porażenie przez toksynotwórcze grzyby;
- właściwą ochronę fitosanitarną upraw dla zmniejszenia możliwości porażenia przez grzyby;
- zapobieganie inwazji owadów uszkadzających nasiona i przenoszących materiał infekcyjny grzybów;
- właściwy zbiór.

Przestrzeżenie prawidłowej agrotechniki i ochrony roślin zmniejsza możliwość infekcji toksynotwórczymi grzybami. Drugi etap zapobiegania powstawania mikotoksyn to właściwe przechowywanie, odpowiednio do wymagań składowania, zbóż, warzyw i owoców [3].

4. Izolacja DNA grzybów z materiału roślinnego

Istnieje wiele metod izolacji DNA, ale wszystkie polegają na zniszczeniu struktur komórkowych i wyodrębnieniu materiału genetycznego z mieszaniny zanieczyszczeń i inhibitorów reakcji enzymatycznych. W celu wyizolowania DNA grzybów z tkanek roślinnych, pierwszym etapem jest homogenizacja, czyli mechaniczne zniszczenie struktur komórkowych. Najczęściej stosowaną metodą homogenizacji jest ucieranie tkanki w ciekłym azocie. Izolacja materiału genetycznego musi zapewnić wysoką jakość preparatu DNA, który będzie wykorzystywane w następnych etapach badań. Głównym celem izolacji materiału genetycznego jest otrzymanie (z maksymalną wydajnością) wysokocząsteczkowego DNA. Powinno to przebiegać z jednoczesnym oczyszczeniem preparatu DNA z białek oraz inhibitorów enzymów, które mogą stwarzać problemy podczas dalszej pracy z DNA, czyli reakcji PCR. Istnieje wiele różnych metod izolacji kwasów nukleinowych i wciąż opracowywane są nowe procedury. Ich celem jest dostarczenie DNA w jak największej ilości oraz najlepszej czystości i jakości. Nowe metody izolacji mają być efektywne, wydajne, szybkie oraz stosunkowo tanie [12]. Przygotowując się do izolacji DNA należy przestrzegać kilku podstawowych zasad. Wszystkie odczynniki (roztwory wyjściowe i robocze) powinno się sporządzać używając odczynników o największej dostępnej czystości, oraz wody podwójnie destylowanej i dejonizowanej. Wszystkie odczynniki oraz woda używana do ich sporządzania powinny być sterylizowane [13].

Obecnie metody izolacji można podzielić na 3 główne grupy:

- izolacja DNA z zastosowaniem mieszaniny fenol/chloroform (stosowane do odbiałczania preparatów);
- izolacja DNA, która przebiega z wysoleniem białek z otrzymanych lizatów komórek;
- izolacja DNA z wykorzystaniem odpowiedniego nośnika, do którego DNA będzie się wiązać, następnie odmycie zanieczyszczeń i uwolnienie związanego DNA [12].

Jedną z najbardziej popularnych metod izolacji DNA jest ta, w której wykorzystuje się mieszaninę związków chloroform/fenol. Wykorzystanie rozpuszczalników organicznych zwiększa efektywność oddzielania kwasów nukleinowych od związanych z nimi białkami. W przypadku, gdy kwasy nukleinowe izolowane są z mieszanin cząsteczek (np. z lizatów komórkowych), po ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym należy wprowadzić dodatkowe etapy, które podniosą efektywność izolacji kwasów nukleinowych. Takim etapem może być zastosowanie enzymów proteolitycznych, np. proteinazy K. Po etapie ekstrakcji DNA znajduje się w rozcieńczonym i zanieczyszczonym roztworze wodnym. Dlatego też przeprowadza się etap zagęszczania, który połączony jest z usuwaniem

zanieczyszczeń małowcząsteczkowych. Zagęszczanie kwasów nukleinowych osiąga się przez wytrącanie cząsteczek etanolem lub izopropanolem. Następnie precipitat DNA odzyskuje się przez wirowanie i rozpuszczanie otrzymanego po wirowaniu osadu w odpowiednim buforze. Wytrącone kwasy nukleinowe należy przemyć w 70% roztworze etanolu i pozostawić w temperaturze pokojowej w celu odparowania składników ciekłych z próbki. Po wysuszeniu otrzymane próbki kwasów nukleinowych powinny być łatwo rozpuszczalne w małej ilości buforu o niskiej sile jonowej [13].

5. Metody identyfikacji grzybów strzępkowych

Do metod wykorzystywanych przy identyfikacji grzybów można zaliczyć tradycyjne techniki oparte na obserwacjach makro- i mikroskopowych, biochemiczne testy diagnostyczne oraz metody biologii molekularnej. Obserwację cech morfologicznych najczęściej przeprowadza się po przygotowaniu czystych mikrokultur na odpowiednich podłożach oraz poprzez hodowlę grzybów na szalkach Petriego na tych samych podłożach. W obserwacjach mikroskopowych zwraca się uwagę na następujące cechy morfologiczne:

- grzybnia – podzielona septami lub jednokomórkowa;
- trzonki zarodnionośne i zarodnie – ich sposób ułożenia, wielkość, obecność lub brak kolumelli;
- konidiofory – kształt, sposób ułożenia, rozgałęzienia;
- zarodniki wewnętrzne lub zewnętrzne – kształt, wielkość, barwa;
- obecność i typ struktur szczególnych.

Morfologię kolonii po tygodniowej hodowli na podłożu agarowym określa się poprzez:

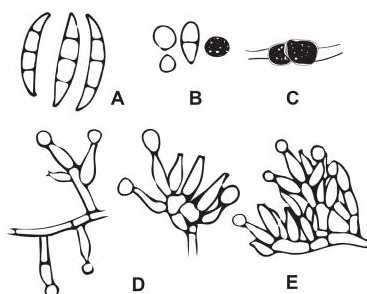
- wygląd i zabarwienie grzybni, zmiany barwy w czasie zarodnikowania, barwę grzybni od spodu;
- obecność stref koncentrycznych;
- struktura powierzchni kolonii;
- brzeg kolonii;
- szybkość namnażania;
- zmiana zabarwienia podłoża;
- obecność kropelek wody na grzybni powierzchniowej;
- zapach.

Fusarium culmorum tworzą obfitą, watowatą, jasną grzybnię, która w miarę dojrzewania może przybierać kolor fioletoworóżowy lub czerwono fioletowy. Patogen ten nie tworzy stadium doskonałego. Konidiofory występują pojedynczo lub skupieniach, mogą być rozgałęzione, na nich powstają komórki konidiotwórcze, tzw. fialidy [2]. *F. culmorum* wytwarza krótkie, grube, z mocno wygiętą częścią grzbietową makrokonidia. Makrokonidia przedzielone są zazwyczaj 3-ma lub 4-ma przegrodami. Grzyb ten

nie tworzy natomiast mikrokonidiów. Chlamydospory mogą występować pojedynczo, w łańcuszkach i skupieniach [1].

Fusarium graminearum na pożywce PDA (agar glukozowo-ziemniaczany) rośnie bardzo szybko, grzybnia jest obfita, wełnista, gęsta i bardzo puszysta. Strzępki grzybni przybierają barwę od białej, przez różową do karminowej, a nawet jasnobrązowej. Rewers hodowli jest zwykle karminowoczerwony [9]. *F. graminearum* wytwarza dwa typy konidiów: makrokonidia i chlamydospory. Makrokonidia są cienkie i długie, o kształcie sierpowatym i prostym, z pięcioma lub sześcioma przegrodami. Chlamydospory są okrągłe, występują w grzybni pojedynczo, w skupieniach lub łańcuszkach [1].

Fusarium poae wytwarza głównie mikrokonidia, które są okrągłe, bez przegród. Makrokonidia oraz chlamydospory tworzone są bardzo rzadko. Na podłożu PDA patogen ten rozwija się bardzo szybko, rośnie obficie, przybiera kolor od białego do różowego. Rewers hodowli jest białoróżowy, karminowoczerwony, czasami przybiera barwę żółtą do jasnobrązowej. Cechą charakterystyczną *F. poae* jest zapach kolonii przypominający zapach kwiatów lub dojrzałych brzoskwiń [9].



A - makrokonidia
 B - mikrokonidia
 C - chlamydospory
 D, E - konidiofory z monofialidami

Rysunek 1. Makrokonidia, mikrokonidia, chlamydospory oraz konidiofory z monofialidami grzyba *F.poae* [9]

Fusarium sporotrichioides na podłożu PDA rozwija się szybko, grzybnia jest obfita i wełnista oraz bardzo gęsta, czasem mączysta. Strzępki grzybni przybierają barwę od białoróżowej z żółtym odcieniem, do koloru jasnobrązowego. Rewers młodej hodowli jest różowy, później zmienia barwę na karminowoczerwony lub brązowy. Mikrokonidia tworzone są licznie, o kształcie owalnym, gruszkowatym lub przypominającym cytryny, z maksymalnie 2 przegrodami. Makrokonidia występują bardzo licznie, są krótkie, sierpowate, kilkukomórkowe. Chlamydospory występują obficie

w starszych kulturach, są interkalarne, ułożone w łańcuszkach i skupieniach, gładkie, kuliste lub owalne, jasnobrązowe [9].

Biochemiczne metody identyfikacji grzybów polegają na określeniu ich zdolności do asymilacji, fermentacji czy rozkładu określonych związków. Cechy biochemiczne ustala się na podstawie reakcji chemicznych, zachodzących w odpowiednio dobranych pożywkach wzrostowych. Wynik testu odczytuje się makroskopowo przez obserwację wzrostu, zmianę zabarwienia pożywki powstałą na skutek metabolizmu drobnoustrojów, wywołanie reakcji barwnej poprzez wprowadzenie odczynnika reagującego z metabolitem wytwarzanym przez badany organizm. Po określonym czasie dokonuje się odczytu testów [14].

Zastosowanie tradycyjnych metod identyfikacji wymaga dużej wiedzy oraz doświadczenia w pracy z grzybami, dlatego identyfikacja ta jest niezwykle trudna i wiąże się z częstymi błędami popełnianymi w trakcie wykonywania oznaczeń. Stosowanie technik molekularnych, w porównaniu z konwencjonalnymi, jest natomiast o wiele dokładniejszą i mniej pracochłonną metodą, która w sposób jednoznaczny określa przynależność do gatunku [15].

5.1. Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* metodą PCR

W obecnych czasach techniki umożliwiające wczesne wykrycie obecności patogena i określenie jego zdolności do tworzenia mikotoksyn mają coraz większe znaczenie. Są to podstawowe elementy profilaktyki ochrony produktów spożywczych i paszowych przed toksynami. Metody molekularne opierają się na analizie struktury DNA. Pozwalają one na łatwiejszą, szybszą i dokładniejszą identyfikację patogenów w badanych próbach [16]. Największe znaczenie w identyfikacji patogenów grzybowych zyskała łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR – *Polymerase Chain Reaction*). Jest to technika, przy użyciu której możemy powielić dowolny fragment DNA o długości od kilku do kilkuset tysięcy nukleotydów. Łańcuchową reakcją polimerazy wykorzystujemy często w sytuacji, kiedy dysponujemy niewielką ilością materiału badanego. Metoda PCR została wynaleziona w 1983 roku przez Kary’ego Mullisa z kalifornijskiej firmy Cetus. Za to osiągnięcie w roku 1993 Mullis otrzymał Nagrodę Nobla. Łańcuchowa reakcja polimerazy znalazła wiele zastosowań m.in. w klasyfikacji izolatów grzybów czy w badaniach interakcji gospodarz-patogen. Szczególny rozwój tej techniki nastąpił po 1988 roku, kiedy wykorzystano po raz pierwszy enzym polimerazę z bakterii *Thermus aquaticus* (*Taq*), wykazującą stabilność w wysokich temperaturach [17, 18].

Aby reakcja PCR doszła do przebiegu i nastąpiło powielenie badanego fragmentu DNA musimy posiadać odpowiednie składniki reakcji, bez których doświadczenie się nie uda. Te elementy to:

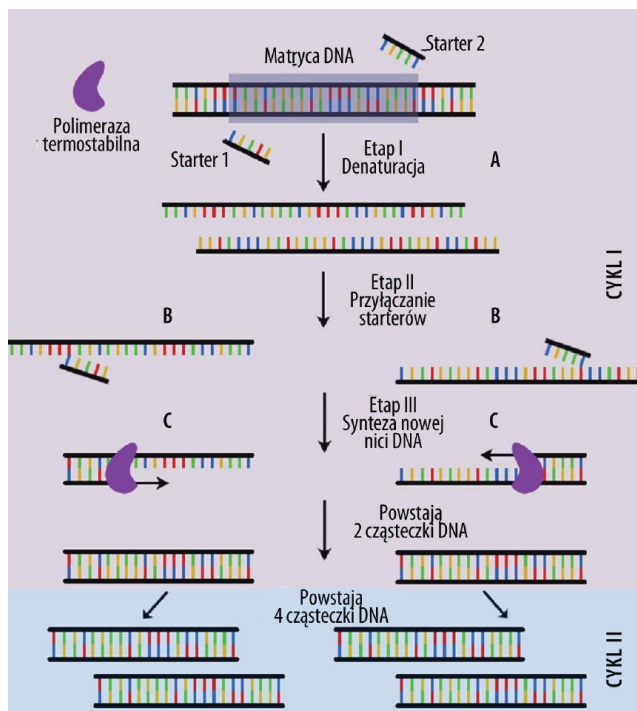
- wyzolowana, o odpowiedniej czystości nić DNA;

- środowisko reakcji, które zapewniają bufor, jony magnezowe oraz odpowiedniej czystości woda;
- primery - inaczej startery, czyli kilku do kilkunastu nukleotydowe sekwencje flankujące znany lub nieznaną odcinek DNA;
- dNTP – wolne nukleotydy;
- termostabilna (nie ulegająca degradacji w wysokich temperaturach) polimeraza DNA;
- opcjonalnie: substancje stabilizujące polimerazę (w gotowych zestawach, tzw. kitach, substancje stabilizujące znajdują się zazwyczaj w buforach dostarczanych razem z polimerazą) [19].

Reakcja PCR przebiega w termocyklerze – specjalnym urządzeniu służącym do sterowania temperaturą. Probówki znajdujące się w termobloku raz są podgrzewane, a raz oziębiane. Sterowanie temperaturą możliwe jest dzięki wprowadzeniu do pamięci termocyklera określonego programu, zazwyczaj podanego w opisie metodyki, na podstawie której powielamy badany DNA. W temperaturze około 95°C dochodzi do **denaturacji podwójnej nici DNA**, przez co rozdzielona się ona na dwie nici. Jest to wynik pęknięcia wiązań wodorowych pomiędzy zasadami azotowymi (purynami i pirymidynami). W temperaturze niższej, ściśle określonej dla danej pary starterów stosowanych w reakcji (najczęściej w przedziale pomiędzy 45-65°C), następuje ich asocjacja do matrycy. Kolejne podwyższenie temperatury do około 72°C powoduje przyłączenie się polimerazy DNA do miejsca asocjacji starterów z matrycą DNA. Powstały kompleks rozpoczyna syntezę nici komplementarnej do matrycy. Po zakończeniu pierwszego cyklu reakcji następuje kolejny, czyli: denaturacja, przyłączanie starterów oraz synteza nici DNA. Po ostatnim cyklu, w temperaturze 72°C, przez okres zazwyczaj 5 minut następuje końcowe wydłużanie. Zakres zmiany temperatury w urządzeniu zależy od kilku czynników m.in. od długości odcinka DNA, który planujemy powielić, od długości starterów oraz optimów temperaturowych enzymów (polimeraz). Okresowe zmiany temperatury wywołują różnego typu reakcje chemiczne, które zachodząc cyklicznie (np. 35 cykli reakcji PCR), doprowadzają do powielenia, określonego przez **primery (startery)** fragmentu DNA. Gdyby **wydajność reakcji PCR** była stuprocentowa, po n cyklach reakcji z jednej cząsteczki można by uzyskać 2 do n -tej potęgi cząsteczek DNA. W praktyce wydajność reakcji PCR jest nieco mniejsza. Nie zmienia to jednak faktu, że PCR pozwala na geometryczne zwielokrotnienie pożądanego odcinka łańcucha DNA oraz to, że metoda ta jest bardzo czuła [19].

Produkt otrzymany po reakcji PCR poddajemy dalszej analizie. Badany DNA przenosimy na żel agarozowy lub poliakrylamidowy i poddajemy rozdzielowi elektroforetycznemu. Metody te pozwalają określić zarówno obecność, jak i wielkość i ilość powstałych produktów. Rozdziału dokonujemy w obecności bromku etydyny. Zdolność bromku etydyny zarówno do wnikanania pomiędzy zasady azotowe DNA jak i emitowanie promie-

niowania pod wpływem światła UV, pozwoliło na wykorzystanie go jako znacznik do wizualizacji efektów reakcji PCR. Obecność lub brak prążka o określonej wielkości świadczy odpowiednio o obecności lub braku wykrywanego mikroorganizmu w badanej próbce. Otrzymane wyniki archiwizujemy, a następnie poddajemy dalszej analizie, statystycznej [21].



Rysunek 2. Schemat powielania fragmentu DNA metodą PCR [20].

Poza wieloma wspomnianymi zaletami PCR istnieją również słabe strony metody. Zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy do prób uzyskanych bezpośrednio z materiału roślinnego często wiąże się z trudnościami z powodu obecności inhibitorów, które mogą znacząco spowolnić reakcje PCR lub całkowicie ją zahamować. Inhibitorami mogą być zarówno związki organiczne, i jak i nieorganiczne różnego pochodzenia. W ten sposób może dojść do sytuacji, kiedy pomimo obecności patogenu w badanej próbce wynik reakcji będzie fałszywie negatywny. Dlatego na podstawie standardowej procedury PCR powstało wiele modyfikacji, które pozwalają polepszyć możliwości badawcze [22].

6. Podsumowanie

Metody identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów oparte na technice PCR, w porównaniu z klasycznymi metodami identyfikacji mikroorganizmów, są znacznie dokładniejsze, pozwalają zmniejszyć nakład pracy ludzkiej oraz czas wykonywania oznaczenia. Metoda PCR może być stosowana do wczesnego wykrywania grzybów z rodzaju *Fusarium* nawet jeśli objawy obecności patogenu nie są jeszcze widoczne na roślinie. Toksynotwórcze grzyby z rodzaju *Fusarium* są niezwykle groźnymi patogenami, dlatego ich identyfikacja jest istotna, w celu podjęcia odpowiednich zabiegów ochronnych uniemożliwiających rozprzestrzenienie się patogena w środowisku.

Literatura

1. Suchorzyńska M., Misiewicz A. *Mikotoksynotwórcze grzyby fitopatogeniczne z rodzaju Fusarium i ich wykrywanie technikami PCR*. Postępy Mikrobiologii, 3 (48) (2009), s. 221-230
2. Kisielewska E., Kordowska- Wiater M. *Ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i mikrobiologii żywności*, Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Lublinie (1999)
3. Chełkowski J. *Mikotoksyny, grzyby toksykotwórcze i miko toksykozy*, wersja on-line: www.cropnet.pl/mycotoxin
4. Wagacha J. M., Muthomi J.W. *Fusarium culmorum: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat*, Crop Protection 26 (2007), s. 877-885
5. Scherm B., Balmas V., Spanu F., Pani G., Delogu G., Pasquali M., Migheli Q. *Fusarium culmorum: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat*, Molecular Plant Pathology, 14 (4) (2013), s. 323-341
6. Lenc L., Kuś J., Sadowski Cz. *Fusarium spp. on ears and kernels of winter wheat in different cropping systems*, Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 56 (4) (2011), s. 32-36
7. Selwet M. *Negatywne aspekty występowania wybranych mikotoksyn w paszach*, Wiadomości Zootechniczne, R. XLVIII, 1 (2010), s. 9-13
8. Jarzynka S., Dąbkowska M., Netsvyetayeva I., Swoboda-Kopec E. *Mikotoksyny – niebezpieczne metabolity grzybów pleśniowych*, Medycyna Rodzinna, 4 (2010), s. 113-119
9. Wolny-Koładka K. *Grzyby z rodzaju Fusarium – występowanie, charakterystyka i znaczenie w środowisku*, Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych, Tom 63, Nr 4 (305) (2014), s.623-633
10. Perkowski J. *Nutritional aspects and health consequences of mycotoxins occurrence*, Mycotoxins and dioxins and the environment (2000), s. 29-38
11. Kawa-Rygielska J. *Jednoczesna identyfikacja trichotecenów typu A i B oraz zearalenonu w produktach kukurydzianych*. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 6 (67) (2009), s. 112-118
12. Kłyszajko-Stefanowicz L. *Ćwiczenia z biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN (2003), s. 366-381

13. Słomski R. *Analiza DNA, teoria i praktyka*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań (2008), s. 44-53
14. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. *Mikrobiologia techniczna*, tom 1, Wyd. PWN, Warszawa 2008
15. Barszczewski W., Robak M. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCRbased techniques, *Food Microbiology*, 2 (21) (2004), s. 227-231
16. Bzducha A. *Szybkie metody identyfikacji mikroorganizmów w żywności*, *Medycyna Weterynaryjna*, 7 (63) (2007), s.773-777
17. Więckowicz M. Molekularne metody identyfikacji mikroorganizmów w złożonych ekosystemach, *Postępy Mikrobiologii*, 1 (48) (2009), s. 67-73
18. Reszka A., Ziemińska A., Wiechetek A. *Metody i techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej*. *Środowisko. Czasopismo techniczne*, 2 (106) (2009), s. 102-114
19. Słomski R., Szalata M., Wielgus K. *Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), Przykłady analiz DNA*, Praca zbiorowa pod red. Słomski R., wyd. AR im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań 2004
20. Kazubek M., Długosz A., Pawlik K. *Zastosowanie technik PCR w toksykologii*. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 64 (2010), s. 482-489
21. Golińska B., Narożna D., Mądrzak C.J. Zastosowanie metod molekularnych do wykrywania, identyfikacji i charakterystyki grzybów z rodzaju *Fusarium*, *Biotechnologia*, 3(2002), s. 165-177
22. Chołuj J., Przewodowski W. Technika PCR i jej modyfikacje w identyfikacji patogenów ziemiaka, *Ziemiak Polski*, 3 (2014), s. 40-45

Identyfikacja grzybów z rodzaju *Fusarium* metodą PCR

Streszczenie

Grzyby należące do rodzaju *Fusarium* są czynnikami wywołującymi poważne choroby roślin, głównie zbóż. Istotnym problemem, jaki stwarza obecność tych patogenów w uprawach rolniczych i uzyskiwanych z nich produktach jest zdolność do tworzenia mikotoksyn z grupy trichotecenów: deoksynivalenolu (DON) i niwalenolu (NIV). Toksyny te zostały uznane za najniebezpieczniejsze dla zdrowia i życia ludzi oraz zwierząt gospodarskich. Tradycyjna identyfikacja poszczególnych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* jest utrudniona ze względu na dużą zmienność cech morfologicznych. W związku z powyższym ogromne znaczenie zyskały metody molekularne oparte na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR).

Słowa kluczowe: *Fusarium*, mikotoksyny, PCR

PCR identification of *Fusarium* species

Abstract

Fungi belonging to the genus *Fusarium* are factors that cause serious diseases of plants, especially cereals. A major problem, caused by the presence of these pathogens in agricultural crops and products derived from them, is the ability to produce mycotoxins including the trichothecenes: deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV). These toxins have been recognized as the most dangerous for health and life of humans and animals. The traditional identification of the individual species of fungi of the genus *Fusarium* is difficult due to the high variability of morphological features. Accordingly, molecular methods based on polymerase chain reaction (PCR) gained great importance.

Keywords: *Fusarium*, mycotoxins, PCR

Kamil Myszczyński¹, Tomasz Molcan², Łukasz Pauksto³,
Jan Paweł Jastrzębski⁴

Przegląd wybranych metod sekwencjonowania wysokoprzepustowego: przebieg analiz i zastosowań

1. Wstęp

Pierwsze lata XXI wieku uświadomiły genetykom, że poznanie genomu organizmu nie będzie wystarczającym osiągnięciem do rozwiązania problemów takich jak, funkcjonowanie organizmu czy etiologia chorób genetycznych. Projekt Human Genome Project pochłonął setki milionów dolarów, zaangażowanych w niego było tysiące naukowców, jednakże okazał się jedynie preludium do współczesnych wyzwań naukowych. Genom organizmu w zależności od jego złożoności posiada zróżnicowaną wielkość materiału genetycznego. Idąc prostym tokiem rozumowania, człowiek jako organizm najbardziej rozwinięty, powinien charakteryzować się największą ilością genów w swoich komórkach, jednakże tak nie jest. Homo sapiens jest organizmem diploidalnym, co znaczy, że każda komórka ludzka posiada podwójną ilość materiału genetycznego upakowanego w strukturach zwanych chromosomami. Istnieją, w szczególności w świecie roślinnym, organizmy o kilku-, a nawet kilkunastokrotnym zestawie chromosomów. Rekordzistami pod względem genetycznego upakowania są niektóre gatunki ryb, których haplotyp jest powielony w komórkach około 100-krotnie (np. karp). Rezultaty Human Genome Project dostarczyły wielu odpowiedzi na nurtujące naukowców pytania. Z drugiej jednak strony stały się źródłem kolejnych hipotez napędzając przy tym rozwój technik sekwencjonowania materiału genetycznego. Wysokoprzepustowe metody sekwencjonowania zaczęto dynamicznie rozwijać wraz z ideą medycyny spersonalizowanej, a konsorcja zajmujące się sekwencjono-

¹ kamil.myszczyński@gmail.com, Katedra Botaniki i Ochrony Roślin, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, www.uwm.edu.pl

² tomasz.molcan@gmail.com, Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, www.uwm.edu.pl

³ pauk24@gmail.com, Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, www.uwm.edu.pl

⁴ bioinformatyka@gmail.com, Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, www.uwm.edu.pl

waniem materiału genetycznego postawiły sobie za cel zsekwencjonowanie całego genomu ludzkiego za koszt mniejszy niż 1000 dolarów amerykańskich [1].

W poniższym opracowaniu przedstawiono krótką charakterystykę trzech wiodących metod sekwencjonowania wysokoprzepustowe. W pracy przedstawione zostały możliwości wykorzystania tych metod w badaniach genetycznych oraz podstawowe informacje dotyczące zarówno eksperymentów laboratoryjnych jak i analiz bioinformatycznych.

2. Sekwencjonowanie genomowe

Obserwowany w ostatnich latach spadek cen wysokoprzepustowego sekwencjonowania materiału genetycznego oraz postęp technologiczny, przyspieszający „odczytywanie materiału genetycznego”, przyczynił się do wykorzystywania sekwencjonowania genetycznego w medycynie oraz diagnostyce medycznej. Wysoka przepustowość metod sekwencjonowania następczej generacji umożliwiła poznanie sekwencji wszystkich egzonów bądź też całego genomu organizmu [2]. Czynniki te przyczyniły się do rozwoju nowej metody diagnostycznej a mianowicie sekwencjonowania genomowego. Sekwencjonowanie genomowe (ang. *Whole Genome Sequencing*, WGS) jest metodą bazującą na poznaniu sekwencji genomu całego organizmu, łącznie z informacją genetyczną pochodzącą z mitochondriów a w przypadku roślin chloroplastów [3-5]. Metoda sekwencjonowania genomowego dostarcza informacji na temat indywidualnej zmienności genetycznej osobnika [3]. Sekwencjonowanie genomowe generuje ogromną ilość danych, które po szczegółowych analizach bioinformatycznych dostarcza istotnych informacji na temat osobnika. W zależności od celu badań, analizy mogą dotyczyć całego genomu (WGS), wszystkich egzonów organizmu (ang. *Whole Exome Sequencing*, WES), identyfikacji genów oraz innych wybranych analiz genetycznych [2].

2.1. Przebieg eksperymentu z wykorzystaniem sekwencjonowania wysokoprzepustowego

Przebieg eksperymentu z wykorzystaniem metody sekwencjonowania genomowego przedstawiono na podstawie postępowania zalecanego dla sekwencjonowania przy użyciu zestawu firmy Illumina (jeden z liderów na rynku sekwencjonowania wysokoprzepustowego).

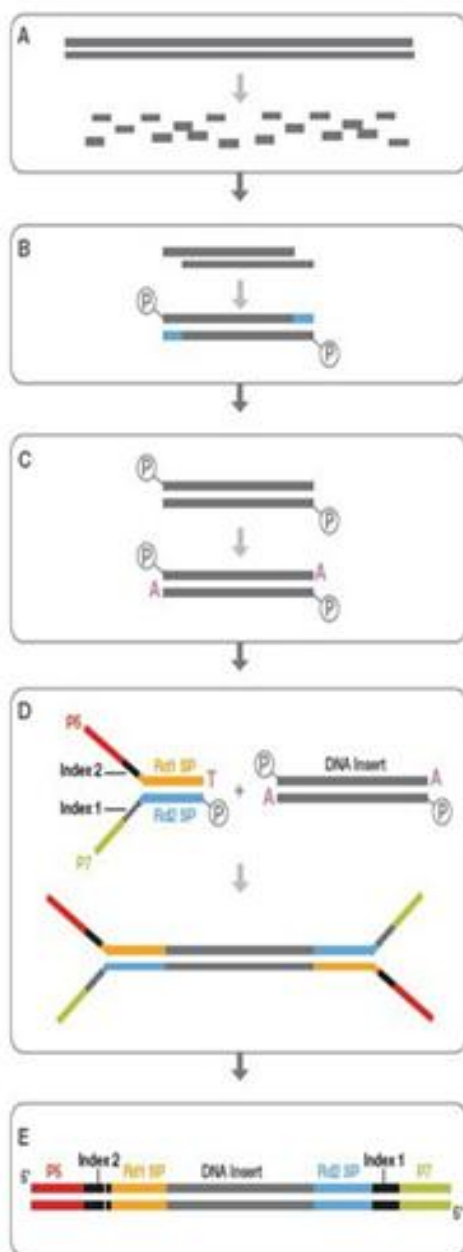
2.1.1. Analiza laboratoryjna

Analiza laboratoryjna rozpoczyna się od pobrania próbek z materiału biologicznego, a kolejnym krokiem jest izolacja materiału genetycznego. Izolacja DNA przebiega najczęściej z wykorzystaniem komercyjnie dostęp-

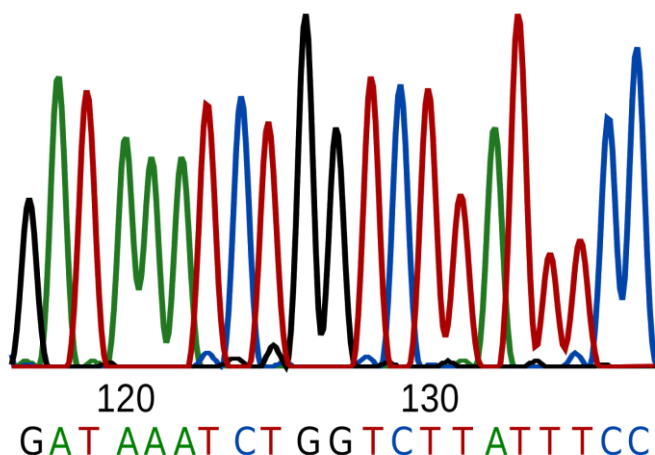
nych zestawów. W tym celu najczęściej wykorzystywana jest precipitacja DNA, po wcześniejszym uwolnieniu materiału genetycznego z komórek. Metoda ta polega na wstępnym oddzieleniu białek od kwasów nukleinowych, wskutek denaturacji białek, a następnie zatężeniu wyizolowanego DNA poprzez odwirowanie i ponowne rozpuszczenie w buforze (np. TE) lub wodzie dejonizowanej. Przed przystąpieniem do kolejnych analiz należy sprawdzić jakość oraz ilość wyizolowanego materiału genetycznego. Jakość wyizolowanego materiału genetycznego sprawdzana jest poprzez elektroforezę w 1% żelu agarozowym, tworząca wyraźny prążek po zakończeniu rozdziału świadczący o braku degradacji materiału genetycznego [5].

Kolejnym krokiem analizy laboratoryjnej jest fragmentacja wyizolowanego materiału genetycznego. Otrzymane fragmenty DNA wykorzystywane są następnie do przygotowania biblioteki. Przygotowanie biblioteki DNA jest kluczowym elementem prawidłowego przeprowadzenia sekwencjonowania genomowego. W tym celu z otrzymanych fragmentów DNA usuwane są lepkie końce wskutek działania egzonukleaz [6, 7]. Następnie do końców 3' nici DNA przyłączana jest adenina, kluczowa do przyłączenia adaptera. Każdy adapter zawiera na końcu 5' tyminę, konieczną do ligacji adaptera do adeniny znajdującej się na końcu 3' fragmentów DNA. Przyłączone adaptery zawierają na swoich końcach unikatowe sekwencje komplementarne do starterów używanych podczas amplifikacji DNA [7-9]. Tak przygotowane fragmenty nanosi się na płytkę (ang. *flowcell*) zawierającą przytwierdzone startery. Przytwierdzone fragmenty poddawane są następnie amplifikacji, koniecznej do otrzymania wystarczającej ilości matrycy DNA, pozwalającej na dokładniejsze pokrycie podczas analizowania sekwencji. W wyniku amplifikacji w obrębie pojedynczego fragmentu nici DNA tworzone są sektory (ang. *Polymerase generated colonies*). Poszczególne sektory zawierające około 1000 kopii powielanego fragmentu DNA. Przygotowana w ten sposób biblioteka wykorzystywana jest w metodzie sekwencjonowania genomowego [6, 7]. Schemat przedstawiający przygotowanie biblioteki wykorzystywanej w sekwencjonowaniu genomowym przedstawiono na rysunku 1.

Seqwencjonowanie przygotowanej biblioteki odbywa się jednocześnie dla wszystkich sektorów. Podczas sekwencjonowania wykorzystywane są nukleotydy wyznakowane znacznikami fluorescencyjnymi. W wyniku przyłączenia nukleotydów w czasie syntezy komplementarnej nici DNA, każdorazowo następuje uwalnianie znaczników fluorescencyjnych. Uwolnione z każdego sektora znaczniki rejestrowane są przez detektor (rys. 2). Po zakończeniu rejestracji widm fluorescencyjnych następuje usunięcie znaczników, umożliwiając przyłączenie kolejnych nukleotydów w następnym cyklu sekwencjonowania [7, 11].



Rysunek 1. Schemat przedstawiający proces przygotowywania biblioteki wykorzystywanej do sekwencjonowania genomowego: A) fragmentacja DNA, B) usunięcie lepkich końców, C) przyłączenie adeniny na końcach 3', D) przyłączenie adapterów końcowych dla prawidłowego procesu amplifikacji, E) amplifikacja fragmentów DNA [11]



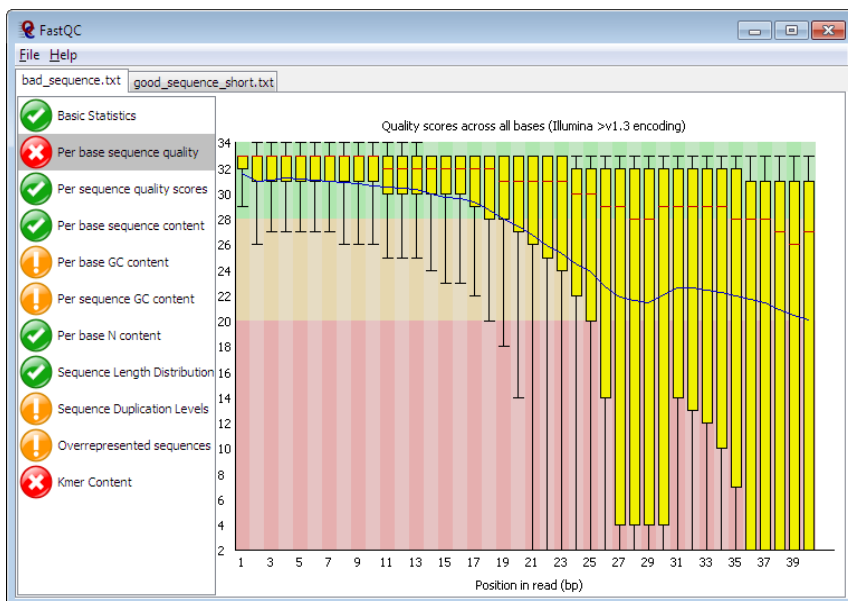
Rysunek 2. Schemat przedstawiający odczytywanie sekwencji nukleotydowej na podstawie detekcji widm fluorescencji. Kolorem czarnym zaznaczono guaninę, zielonym alaninę, czerwonym oznaczono tyminę natomiast kolorem niebieskim cytozynę [12]

2.1.2. Analiza bioinformatyczna

Drugim etapem eksperymentu związanego z sekwencjonowaniem genomowym jest bioinformatyczna analiza danych. Generowane w czasie sekwencjonowania, krótkie odczyty (ang. *reads*) najczęściej zapisywane są w formacie FASTQ. Pliki te stanowią dane początkowe wykorzystywane w procesie analizy danych [14].

Pierwszym krokiem analizy bioinformatycznej jest ocena jakości otrzymanych odczytów. Weryfikacja wykonywana jest pod kątem występowania w sekwencjach nukleotydów niesprecyzowanych (N), zawartości nukleotydów guaninowych i cytozynowych (ang. GC content), występowania duplikacji, adapterów, nukleotydów o niskiej jakości odczytu oraz rozkładu długości sekwencji (rys. 3) [15].

Po sprawdzeniu jakości sekwencji, zalecane jest usunięcie odczytów nie spełniających kryteriów jakościowych takich jak: sekwencje pochodzące z procesu przygotowywania biblioteki (np. adapterów) oraz sekwencje o niskiej jakości. Z sekwencji należy także usunąć ewentualne zanieczyszczenia na przykład pochodzące z innych organizmów niż organizm badany. Kontaminacje te mogą pojawiać się wskutek zanieczyszczenia materiału genetycznego lub wynikają z sekwencjonowania jednocześnie na tym samym sekwencjonatorze prób pochodzących z różnych organizmów [15].



Rysunek 3. Przykładowy raport oceny jakości odczytów wygenerowany przez program FastQC [16]

Kolejny krok analizy bioinformatycznej zależy od dostępności genomu blisko spokrewnionego gatunku (tzw. genom referencyjny) do badanego organizmu. W przypadku gdy jest on dostępny wykonywane jest mapowanie odczytów do sekwencji genomu referencyjnego (rys. 4). W przypadku gdy genom referencyjny nie jest dostępny należy wykonać składanie genomu metodą *de novo*. Metody składania genomu są procesami skomplikowanymi obliczeniowo, wymagającymi wykorzystania komputerów „dużej mocy obliczeniowej”. Złożoność obliczeń wynika z analizowania wszystkich sekwencji na raz oraz występowanie wielu izoform sekwencji tych samych genów. Istotne znaczenie dla złożoności obliczeń ma także wielkość genomu. Większy genom wymaga większej mocy obliczeniowej oraz znacząco wydłuża czas trwania analizy [17, 18].

Metoda mapowania do genomu referencyjnego polega na dopasowaniu odczytów do znanej sekwencji referencyjnej. Programami najczęściej wykorzystywanymi w tym celu są: Bowtie [19] oraz BWA [20]. Składanie genomu metodą *de novo* polega na tworzeniu grup odczytów o podobnym układzie sekwencji nukleotydowej i odczytywaniu powstałych sekwencji konsensusowych (tzw. kontigów). Programami wykorzystywanymi do składania genomu metodą *de novo* są: Velvet [21] oraz SOAPdenovo [22].

Spośród uzyskanych danych pochodzących w procesie mapowania, największe znaczenie ma pokrycie sekwencji (głębokość sekwencjonowania, ang. *sequencing depth*). Parametr ten opisuje średnią liczbę odczy-

tów, w których nukleotydy z określonej pozycji występują w sekwencji. Opisując parametr pokrycia na poziomie całego genomu, wartość ta wyrażona jest jako średnia lub też mediana wartości pokrycia dla poszczególnych nukleotydów. Należy także pamiętać że wyższe pokrycie oznacza dłuższe sekwencje konsensusowe otrzymane w czasie mapowania sekwencji genomowych [23].



Rysunek 4. Mapowanie odczytów do genu referencyjnego. Odczyty (różnokolorowe) zostały dopasowane do genu referencyjnego (kolor zielony). Rozkład oraz liczebność zmapowanych odczytów jest miarą poziomu ekspresji danego genu. Opracowanie własne na podstawie [18]

Analiza WGS, dostarcza wielu dodatkowych informacji na temat badanego organizmu, takich jak: poznanie pełnej sekwencji genomu organizmów dla których genom nie był wcześniej znany, poznanie genomu mitochondrialnego (mitogenomu) lub też chloroplastowego w przypadku roślin. Ponadto poznanie genomu w genomice populacyjnej umożliwia identyfikację chorób dziedzicznych, charakteryzowaniu mutacji przyczyniających się do rozwoju nowotworów a także pozwalają na poznanie przyczyn rozwoju stanów chorobowych [24].

3. Sekwencjonowanie transkryptomu

RNA-seq jest metodą sekwencjonowania transkryptomu (całościowe RNA badanych komórek ulegających ekspresji w danych warunkach, odzwierciedlających aktywność genów). Metoda ta jest alternatywą dla stosowanych przez ostatnią dekadę mikromacierzy ekspresyjnych. Badania dotyczące transkryptomu są jednym z największych wyzwań we współczesnej genetyce.

Ekspresja mierzona technologią macierzową opierała się o kilkudziesięcionukleotydowe sondy, które w procesie hybrydyzacji wiązały sekwencję RNA transkryptów aktywnych w badanych komórkach. Niedoskonałością tej metody było zastosowanie jej jedynie w eksperymentach dotyczących organizmów o dobrze poznanym genomie. Wyniki tego typu ekspery-

mentów były w dużej mierze uzależnione od specyficzności zastosowanych sond oraz wysyceniu mapy genowej danego gatunku. Wraz z nadejściem metod sekwencjonowania okazało się, że mikromacierz ekspresyjna jako metoda wysokoprzepustowa jest ograniczona jedynie do wyznaczania profili ekspresji genów, nie dając informacji o polimorfizmach pojedynczego nukleotydu (SNP – single nucleotide polymorphism), alternatywnym splicingu czy ekspresji alleli genów [26]. Rozwój technologii sekwencjonowania wysokoprzepustowego okazał się dużym krokiem naprzód w dziedzinie genetyki. Dzięki tym metodom realne stało się badanie „screeningowe” całych transkryptomów gatunków słabo poznanych genetycznie [27]. Metoda RNA-seq w dużej mierze nie różni się od sekwencjonowania DNA. Poziom ekspresji szacowany jest na podstawie liczby odczytów przyrównanych do konkretnych transkryptów. Transkrypt w żywej komórce stanowi integralną część materiału genetycznego, a jego długość waha się w granicach od kilkudziesięciu do tysiący nukleotydów. W przypadku sekwencjonowania genomu ilość dopasowanych odczytów nie ma tak dużego znaczenia, natomiast w sekwencjonowaniu transkryptomów jest miarą poziomu ekspresji. Wiąże się to z zastosowaniem krótszych sekwencji, najczęściej 100 pz (w sekwencjonowaniu genomowym standardem jest 250 pz), które obciążone są mniejszym prawdopodobieństwem wystąpienia błędu podczas procesu sekwencjonowania [28].

Podstawowymi informacjami uzyskiwanymi z eksperymentu RNA-seq jest poziom oraz różnice ekspresji genów pomiędzy porównywanymi obiektami (kontrola – próba badana). Oprócz ekspresji genów możliwe jest szczegółowe określenie, która z izoform lub miejsc rozpoczęcia transkrypcji (ang. *transcription start site*, TSS) genu wykazuje poziom ekspresji. Każdy z genów może być dodatkowo zbadany pod kątem alternatywnego splicingu, polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide variant*, SNV lub ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP – w badaniach populacyjnych) lub innego rodzaju mutacji. Dużą część sekwencjonowanego transkryptomu stanowią sekwencje niekodujące, których funkcja nie jest jeszcze poznana. Przypuszcza się, że pełnią one głównie role regulacyjne, warunkując wiele procesów metabolicznych w organizmie. Oprócz wymienionych zalet metody najbardziej atrakcyjna wydaje się możliwość badania transkryptów nie posiadających referencyjnych danych genomowych w bazach danych. Podstawowy podział badań RNA-seq obejmuje wykorzystanie genomu referencyjnego (np. genom człowieka, myszy, świni, *Arabidopsis thaliana*) [29-32] lub asemblacje transkryptomów *de novo* (np. słonia, kaczki czy melona) [33-35]. Drugi podział stanowi zastosowanie technologii pojedynczych sekwencji (single-end) lub par sekwencji (paired-ends). Metoda paired-ends, wykorzystująca sparowane sekwencje oddzielone 150-800 nukleotydowym insertem, jest prefe-

rowana w analizach RNA-seq. Badanie transkryptomu metodą RNA-seq podobnie jak w sekwencjonowaniu DNA obejmuje dwie części: eksperyment laboratoryjny oraz analizę bioinformatyczną. O ile różnice w części laboratoryjnej dotyczą głównie badanego materiału genetycznego (RNA zamiast DNA), oraz zastosowanie zestawu dedykowanego do przygotowania bibliotek RNA, o tyle w badaniach transkryptomowych częściej wykorzystywane są sekwenatory HiSeq niż MiSeq [36].

3.1. Analiza laboratoryjna

Eksperyment laboratoryjny wymaga skrupulatnego doboru grupy kontrolnej oraz grupy badanej. Każdy obiekt badawczy powinien zostać poddany sekwencjonowaniu w przynajmniej dwóch powtórzeniach biologicznych. Duże projekty transkryptomowe opierają się przynajmniej o kilkanaście powtórzeń biologicznych, które umożliwiają zastosowanie precyzyjnych testów statystycznych. W zależności od postawionych celów w badaniach, ważne jest też oszacowanie liczby odczytów (sekwencji nukleotydowych) potrzebnych do pokrycia transkryptomu danego gatunku. Ocenia się, że około 30 mln odczytów w zupełności wystarcza dla przeprowadzenia analizy różnic ekspresji transkryptomu (np. kurczaka) [37]. W przypadku, gdy celem jest odszukanie nowych alternatywnych form splicingowych, wielkość próby powinna wynosić minimum 100 mln sekwencji dla tego organizmu. Wyizolowany materiał genetyczny musi zostać poddany analizie jakości. W tym celu standardem jest ocena integralności RNA (parametr RIN), przy użyciu Bioanalyzera. RNA o dobrej jakości (RIN >8) podobnie jak w sekwencjonowaniu genomu, wykorzystane jest do przygotowania bibliotek. Jeszcze przed znakowaniem materiału genetycznego dochodzi do fragmentacji materiału genetycznego. Następnie do krótkich odcinków RNA (100 pz) przyłączane są sekwencje adaptorowe, które na zasadzie komplementarności łączą badane RNA z sondami znajdujące się na płytce sekwenatora (flowcell). Następnie na zasadzie sekwencjonowania przez syntezę dobudowywane są komplementarne nukleotydy, w wyniku czego uwalniany jest sygnał fluorescencyjny. Sygnały świetlne są odbierane przez detektory i przetwarzane na dane cyfrowe [38,39].

3.2. Analiza bioinformatyczna

Dane cyfrowe zapisane są w formacie FASTQ. W przypadku sekwencji paired-ends są to dwa pliki, zawierające sparowane sekwencje RNA oddzielone ustalonym na etapie analizy laboratoryjnej insertem. Zadaniem bioinformatyka jest w zależności od typu eksperymentu (*de novo* lub z referencją) wykorzystanie narzędzi komputerowych w celu określenia zmienności transkryptomowej badanego obiektu. Pierwszym krokiem

podobnie jak w analizie sekwencjonowania genomu jest kontrola jakości (usunięcie adaptorów, sekwencji o niskiej jakości – PHRED < 20, końców poliadenylowych).

W przypadku analizy *de novo* niezbędnym krokiem jest rekonstrukcja nieznanego (badanego) transkryptomu wyłącznie z samych odczytów. Proces ten nazywa się asemblacją *de novo*. Podczas tego procesu krótkie 100-nukleotydowe odczyty łączą się w długie sekwencjekonsensusowe (transkrypty), przy zachowaniu odpowiednich parametrów identyczności oraz długości pokrycia. Wszystkie transkrypty grupowane są w transkryptom referencyjny w pliku FASTA. Następnie transkryptom ten zostaje poddany mapowaniu pojedynczym próbom eksperymentu. Wartości poziomów ekspresji dla poszczególnych genów są bezpośrednio ilościami przyrównań (alignment) odczytów do ich sekwencji transkryptomicznej. W celu porównania wyników mapowania porównywanych bibliotek RNA eksperymentów, dane poddawane zostają normalizacji. W wyniku tego procesu uzyskuje się wartości ekspresji (RPKM, FPKM, TMM lub normalizedcount), uwzględniające wielkość próby. Wyniki FPKM powtórzeń biologicznych dla warunku badanego oraz kontroli są grupowane, a następnie porównywane [40].

Jednym z najbardziej istotnych czynników eksperymentu RNA-seq jest liczba powtórzeń biologicznych, która warunkuje użycie odpowiednich testów statystycznych. Przy większej liczbie powtórzeń biologicznych istnieje możliwość wykorzystania bardziej precyzyjnych testów, narażonych na mniejszą liczbę błędów (falsepositive, trueneegative). W wyniku eksperymentu uzyskuje się listę genów scharakteryzowanych wartościami: zmienności ekspresji (foldchange) oraz istotności statystycznej (p-value, q-value). Interpretacja wyników zależy w dużej mierze od specyficzności badanych tkanek (komórek, organizmów), jednakże jako standard uznaje się krotność zmiany większą niż 2 (foldchange>2) oraz prawdopodobieństwo popełnienia błędu statystycznego mniejszą niż 5% (q-value<0.05) [41]. Najpopularniejszymi narzędziami do asemblacji *de novo* są programy Trinity [42] oraz SOAPdenovo. Wartości ekspresji wyliczane są w programie RSEM [43] oraz eXpress [44]. W przypadku statystyk stosuje się metody mniej restrykcyjne – edgeR [45], limma [46] lub bardziej DEseq [47], cufflinks [48]. Analizy RNA-seq transkryptomów organizmów o poznanym genomie (np. człowiek, mysz, świnia, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*) wykorzystują sekwencje referencyjne tych organizmów. W odróżnieniu do wyżej opisywanej metody *de novo*, mapowaniu poddawany jest genom referencyjny. W kolejnym kroku wykorzystując program Tophat (identyfikacja splicingu exon-exon), rekonstruowany jest transkryptom badanego organizmu. Dalsza metodyka jest analogiczna do zastosowanej w asemblacji *de novo*. Metodyka RNA-seq

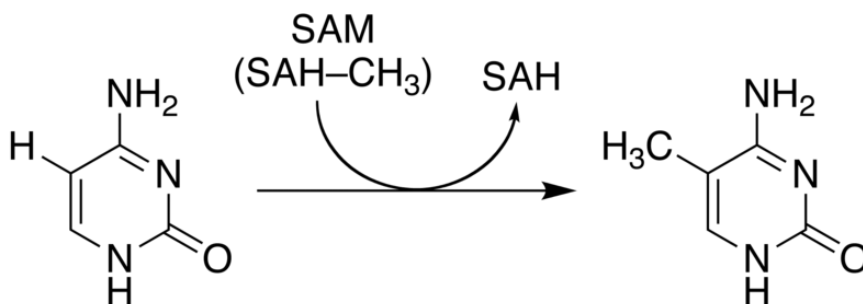
jest wykorzystywana jako narzędzie screeningowe w badaniach transkrypcyjnych. Geny wykazujące różnice ekspresji w analizie RNA-seq, muszą zostać zwalidowane dodatkowo w analizie laboratoryjnej q-PCR [40].

4. Sekwencjonowanie metylomu

Wysokoprędkostowe techniki sekwencjonowania DNA znalazły również zastosowanie w dynamicznie rozwijającej się od początku XXI wieku epigenetyce. Dziedzienie genetyki, zajmującej się dziedzicznymi zmianami ekspresji genów, które nie powstały wskutek zmian w sekwencji DNA. Mechanizmy epigenetyczne są biochemicznymi modyfikacjami DNA oraz białek histonowych stanowiących strukturalną podstawę chromatyny [49, 50]. Zadaniem epigenetyki jest zrozumienie działania oraz sposobu dziedziczenia modyfikacji chromatyny. Modyfikacje epigenetyczne stanowią część prawidłowego rozwoju komórki, a anomalie w programowaniu epigenetycznym są skorelowane z występowaniem takich chorób jak: nowotwory, choroby autoimmunologiczne, choroby układu krążenia, choroby neuropsychiatryczne, zapalenia [51].

Jedną z poznanych dotychczas modyfikacji epigenetycznych jest metylacja DNA. Występowanie metylacji powoduje zmianę funkcjonowania DNA. W komórce metylacja jest wykorzystywana w przebiegu jej normalnego rozwoju m.in. w piętnowaniu rodzicielskim, wyciszaniu sekwencji powtórzonych oraz wyłączaniu drugiego chromosomu X w komórkach żeńskich. Metylacja bierze udział w wielu procesach związanych z rozwojem organizmów, przede wszystkim w wytwarzaniu i utrzymywaniu odpowiedniej specyfikacji tkankowej. Dotychczas udowodniono, że wzrost metylacji w części promotorowej genu może prowadzić do zahamowania ekspresji tego genu. Zatem metylacja poszczególnych fragmentów chromatyny związana jest z częściową lub całkowitą inaktywacją transkrypcyjną [52].

Proces metylacji DNA polega na przyłączeniu grup metylowych do zasad azotowych nukleotydów za pośrednictwem metylotransferazy. Metylacji może ulegać cytozyna lub adenina. Jednak metylacje adeniny zaobserwowano jedynie u prokariotów. Metylacja zachodzi przy piątym atomie węgla pierścienia aromatycznego (rys. 5). Przy czym ten mechanizm w organizmie człowieka zachodzi jedynie gdy cytozyna sąsiaduje z guaniną tworząc dinukleotyd (CpG). Zagęszczenie CpG w obrębie genomu nazywane jest wyspą CpG. W genomie człowieka występuje około 29 000 wysp CpG. Są one zlokalizowane w około 60% promotorów genów. Dinukleotydy CpG występują również poza wyspami CpG. Ich rolą jest stabilizacja struktury chromosomów i ochrona przed obcym DNA [50, 53].



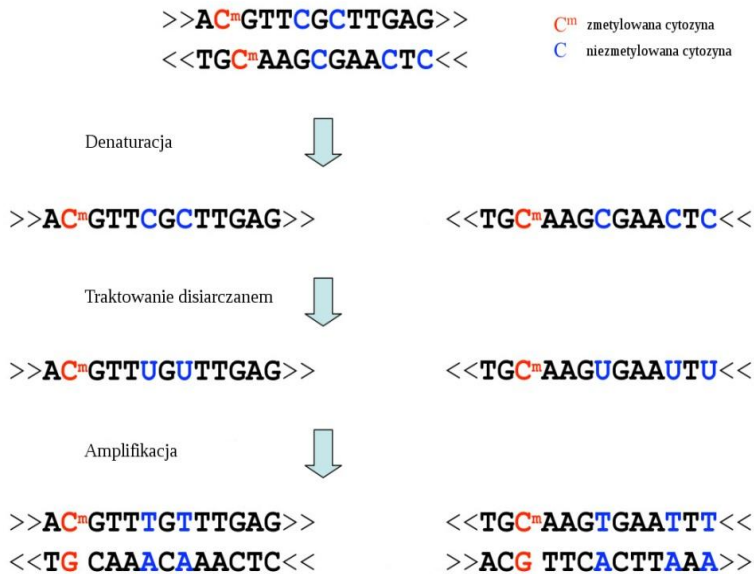
Rysunek 5. Metylacja cytozyny do metylocytozyny. Reakcja przebiega za pośrednictwem metylotransferazy. Przy piątym atomie węgla pierścienia aromatycznego cytozyny dochodzi do podstawienia grupy metylowej [53]

4.1. Analiza laboratoryjna

Obecnie wysokoprzepustowe sekwencjonowanie DNA jest wykorzystywane w celu otrzymywania profilu metylacji – metylomu. Tego typu analizy są szczególnie interesujące w połączeniu z analizą transkryptomu, ponieważ umożliwiają zweryfikowanie wpływu metylacji na profil ekspresji genów. Dotychczasowe wyniki takich analiz potwierdzają współzależność zmian w profilu metylacji oraz transkrypcji [54-56].

Złotym standardem identyfikacji profilu metylomu jest sekwencjonowanie całego genomu z wykorzystaniem disiarczanu (WGBS – Whole Genome Bisulfite Sequencing) [57, 58]. W DNA traktowanym disiarczanem dochodzi do konwersji cytozyny w uracyl, natomiast zmetylowana cytozyna nie ulega tego typu konwersji. W skutek czego w sekwencji nukleotydowej pojawiają się cząsteczki uracylu w miejsce niezmetylowanych cząsteczek cytozyny. O pozostałych w sekwencji cytozynach wiadomo, że ulegają metylacji (rys. 6) [59].

Procedura laboratoryjna WGBS poza wprowadzeniem disiarczanu do analizy przebiega w podobny sposób jak w przypadku, wcześniej opisanego, sekwencjonowania genomowego. DNA jest fragmentowane, dodawane są adaptory, następnie fragmenty DNA poddawane są działaniu disiarczanu w warunkach denaturujących. Otrzymane w ten sposób odcinki DNA poddawane są amplifikacji po czym sekwencja nukleotydowa poszczególnych fragmentów odczytywana jest przy pomocy sekwenatora. Wynikiem sekwencjonowania WGBS są miliony odczytów, które następnie są poddawane analizie bioinformatycznej [57].



Rysunek 6. Schemat przebiegu sekwencjonowania z wykorzystaniem disiarczaniu. Pierwszym etapem jest denaturacja – oddzielenie nici DNA od siebie. Następnie sekwencje nukleotydowe traktowane są disiarczaniem, w wyniku czego dochodzi do konwersji cytozyn (zaznaczonych niebieskim kolorem) do uracylu. Zmetylowane nukleotydy cytozynowe (zaznaczone kolorem czerwonym) nie ulegają metylacji. Końcowym etapem sekwencjonowania WGBS jest amplifikacja. Nici DNA, które były komplementarne względem siebie po przeprowadzeniu amplifikacji z uprzednim zastosowaniem disiarczaniu różnią się sekwencjami nukleotydowymi [60].

4.2. Analiza bioinformatyczna

Pomimo wielu podobieństw w stosunku do sekwencjonowania genomu, bioinformatyczna analiza odczytów z sekwencjonowania metylomu jest bardziej wymagająca. Wynika to z faktu, iż otrzymane sekwencje różnią się od genomowych sekwencji referencyjnych ze względu na zachodzenie konwersji z cytozyny do uracylu. Pierwszym etapem analizy bioinformatycznej danych WGBS jest dopasowanie otrzymanych odczytów do genomu referencyjnego. Do analiz bioinformatycznych metylomu stosowane są dedykowane do tego zadania programy, m.in. takie jak: BS-SEEKer[61], Bismark[62], B-SOLANA[63]. Programy tego typu zwykle opierają się na algorytmach stosowanych w analizie bioinformatycznej genomu jednak wprowadzają dodatkowo konwersję wsteczną aby umożliwić alignment sekwencji genomowej do sekwencji metylomowej [64]. Wynikiem pierwszego etapu analizy bioinformatycznej jest plik zawierający współrzędne alignmentów oraz umiejscowienia dopasowanej sekwencji na genomie referencyjnym. Podczas alignmentu sekwencji

należy zwrócić szczególną uwagę na błędy niedopasowania, ponieważ ich występowanie może prowadzić do błędnej identyfikacji miejsca występowania metylacji. Kolejnym etapem analizy danych jest segmentacja profili metylacji. Polega na odszukaniu w otrzymanych sekwencjach odcinków o podobnych lub istotnie różniących się wzorcach metylacji [65]. Poprzez analizy porównawcze tych samych segmentów pomiędzy różnymi próbkami (np. komórka zdrowa i komórka nowotworowa) można określić kierunek zmian metylacji wywarły poprzez badany czynnik. Następnie przeprowadzane są analizy wyższego rzędu mające na celu interpretację uzyskanych wyników.

Badanie zależności epigenetycznych w tym metylomu jest bardziej skomplikowane od analiz genomowych. Wynika to głównie z dużo większej zmienności epigenomu. Pojedynczy epigenom różni się wraz z wiekiem, pomiędzy tkankami, zmienia się pod wpływem warunków środowiska oraz chorób. Szczegółowe analizy epigenetyczne mogą dostarczyć cennych informacji w jaki sposób wyżej wymienione czynniki wpływają na organizm. Ponadto anormalne profile metylacji są skoregowane z występowaniem różnego rodzaju nowotworów. Zatem Przyspieszone, dzięki wprowadzeniu sekwencjonowania wysokoprzepustowego, badania epigenetyczne pozwolą lepiej poznać mechanizmy zachodzące w komórkach organizmu w stanie chorobowym lub lepiej zrozumieć wpływ środowiska na nie [66].

5. Podsumowanie

Wprowadzenie technik wysokoprzepustowych do badań biologicznych pozwoliło lepiej zrozumieć rolę jaką pełni genom, transkryptom oraz epigenom w funkcjonowaniu komórki oraz całego organizmu. Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe umożliwia bardziej dogłębną i szerszą analizę mechanizmów powstawania stanu chorobowego na poziomie subkomórkowym. Szczególnie interesująca jest perspektywa integracji kilku metod sekwencjonowania wysokoprzepustowego do jednoczesnej analizy badanych próbek na wielu płaszczyznach np. transkryptomu i metylomu jednocześnie.

Obecnie platformy sekwencjonowania wysokoprzepustowego są stale rozwijane co skutkuje skróceniem czasu sekwencjonowania oraz wydłużeniem długości pojedynczych odczytów przy jednoczesnym obniżaniu kosztów analizy. Ten nieustający trend z pewnością przyczyni się w przyszłości do otrzymania pełnego molekularnego obrazu funkcjonowania procesów biologicznych.

Literatura

1. <http://www.frontlinegenomics.com/2377/the-next-generation-sequencing-revolution-a-view-from-the-inside/>
2. Van El C.G., Cornel M.C., Borry P., Hastings R.J., Fellmann F., Hodgson S.V., Howard H.C., Cambon-Thomsen A., Knoppers B.M., Meijers-Heijboer H., Scheffer H., Tranebjaerg L., Dondorp W., de Wert G.M. *Whole-genome sequencing in health care: recommendations of the European Society of Human Genetics*, *European Journal of Human Genetics*, 6 (2013), s. 580-584
3. Ng P.C., Kirkness E.F. *Whole genome sequencing*, *Methods in Molecular Biology*, 628 (2010), s. 215-226
4. Mardis E.R., Wilson R.K. *Cancer genome sequencing: a review*. *Human Molecular Genetics*. 18 (2009), s. 163-168
5. http://chem.pg.edu.pl/documents/175361/28234382/izolacja_dna_z_kom_zwierzej.pdf
6. Ridley M. *Genome*, Harper Perennial, New York (2006), ISBN 0-06-019497-9
7. Kozarewa I., Ning Z., Quail M.A., Sanders M.J., Berriman M., Turner D.J. *Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+C)-biased genomes*, *Nature Methods*, 4 (2009), s. 291-295
8. Rhodes J., Beale M.A., Fisher M.C. *Illuminating choices for library prep: a comparison of library preparation methods for whole genome sequencing of *Cryptococcus neoformans* using Illumina HiSeq*, *PLoS One*, 11 (2014), s. e11350
9. Van Dijk E.L., Jaszczyszyn Y., Thermes C. *Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias*, *Experimental Cell Research*, 322 (2014), s. 12-20
10. Katsuoaka F., Yokozawa J., Tsuda K., Ito S., Pan X., Nagasaki M., Yasuda J., Yamamoto M. *An efficient quantitation method of next-generation sequencing libraries by using MiSeq sequencer*, *Analytical Biochemistry*, 466 (2014), s. 27-29
11. <http://www.medsci.cn/3g/shownews.asp?id=30300&page=2>
12. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/18/DNA_sequence.svg/2000px-DNA_sequence.svg.png
13. Quail M.A., Kozarewa I., Smith F., Scally A., Stephens P.J., Durbin R., Swerdlow H., Turner D.J. *A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system*, *Nature Methods*, 12 (2008), s. 1005-1010
14. Cock P.J.A., Fields C.J., Goto N., Heuer M.L., Rice P.M. *The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants*, *Nucleic Acids Research*, 6 (2010), s. 1767-1771
15. Guo Y., Ye F., Sheng Q., Clark T., Samuels D.C. *Three-stage quality control strategies for DNA re-sequencing data*, *Briefings in Bioinformatics*, (2013), s. 1-11
16. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
17. Puckelwartz M.J., Pesce L.L., Nelakuditi V., Dellefave-Castillo L., Golbus J.R., Day S.M., Cappola T.M., Dorn G.W., Foster I.T., McNally E.M. *Supercomputing for the parallelization of whole genome analysis*, *Bioinformatics*, 12 (2014), s.1-7
18. Li R., Zhu H., Ruan J., Qian W., Fang X., Shi Z., Li Y., Li S., Shan G., Kristiansen K., Li S., Yang H., Wang J., Wang J. *De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing*, *Genome Research*, 2 (2010), s. 265-272

19. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L. *Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome*, *Genome Biology*, 10 (2009), s.R25
20. Li H., Durbin R. *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform*, *Bioinformatics*, 25 (2009), s.1754-60
21. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. *Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*. *Bioinformatics*, 28 (2012), s.1647-1649
22. Zerbino D.R., Birney E. *Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs*, *Genome Research*, 5 (2008), s. 821-829
23. Luo R., Liu B., Xie Y., Li Z., Huang W., Yuan J., He G., Chen Y., Pan Q., Liu Y., Tang J., Wu G., Zhang H., Shi Y., Liu Y., Yu C., Wang B., Lu Y., Han C., Cheung D.W., Yiu S.M., Peng S., Xiaoqian Z., Liu G., Liao X., Li Y., Yang H., Wang J., Lam T.W., Wang J. *SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler*, *Gigascience*, 1 (2012), s. 1-6
24. <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/hiseq-x-30x-coverage-technical-note-770-2014-042.pdf>
25. <http://www.illumina.com/techniques/sequencing/dna-sequencing/whole-genome-sequencing.html>
26. Knytl M., Kalous L., Ráb P. *Karyotype and chromosome banding of endangered crucian carp, *Carassius carassius* (Linnaeus, 1758) (Teleostei, Cyprinidae)*, *Comparative Cytogenetics*, 7 (2013), s.205-215
27. Myszczyński K., Paukszto Ł., Molcan T., Jastrzębski J.P. *Badania ekspresji genów kluczem do poznania funkcjonalności organizmów - porównanie wiodących metod wysokopręstowych*, *Nowoczesne trendy w medycynie*, Fundacja na rzecz promocji nauki i rozwoju, (2015), s.158-172
28. Riedmaier I., Benes V., Blake J., Bretschneider N., Zinser C., Becker C., Meyer H H., Pfaffl M W. *RNA-sequencing as useful screening tool in the combat against the misuse of anabolic agents*, *Anal Chem*, 15 (2012), s. 6863-6868
29. Ng S.Y., Soh B.S., Rodriguez-Muela N., Hendrickson D.G., Price F., Rinn J.L., Rubin L.L. *Genome-wide RNA-Seq of Human Motor Neurons Implicates Selective ER Stress Activation in Spinal Muscular Atrophy*, *Cell Stem Cell*, 17 (2015), s.569-584
30. White R.R., Milholland B., MacRae S.L., Lin M., Zheng D., Vijg J. *Comprehensive transcriptional landscape of aging mouse liver*, *BMC Genomics*, 16 (2015), s.1-15
31. Ramayo-Caldas Y., Mach N., Esteve-Codina A., Corominas J., Castelló A., Ballester M., Estellé J, Ibáñez-Escriche N, Fernández AI, Pérez-Enciso M, Folch J. M. *Liver transcriptome profile in pigs with extreme phenotypes of intramuscular fatty acid composition*, *BMC Genomics*, 13 (2012), s.1-18
32. Zhang X., Rosen B.D., Tang H., Krishnakumar V., Town C.D. *Polyribosomal RNA-Seq Reveals the Decreased Complexity and Diversity of the Arabidopsis Translatome*, *PLoS ONE*, 10 (2015), s.e0117699
33. Hou Z-C., Sterner K.N., Romero R., Than N.G., Gonzalez J.M., Weckle A., Xing J., Benirschke K., Goodman M., Wildman D.E. *Elephant Transcriptome Provides*

- Insights into the Evolution of Eutherian Placentation*. Genomebiology and evolution, 5 (2012), s.713-725
34. Zhu F., Yuan J.M., Zhang Z.H., Hao J.P., Yang Y.Z., Hu S.Q., Yang F.X., Qu L.J., Hou Z.C. *De novo transcriptome assembly and identification of genes associated with feed conversion ratio and breast muscle yield in domestic ducks*, Animal Genetics, 6 (2015), s.636-645
 35. Kim H.A., Shin A.-Y., Lee M.-S., et al. *De Novo Transcriptome Analysis of Cucumismelo L. var. makuwa*, Molecules and Cells. 39 (2016), s.41-148
 36. Li S., Tighe S.W., Nicolet C.M. *Multi-platform and cross-methodological reproducibility of transcriptome profiling by RNA-seq in the ABRF Next-Generation Sequencing Study*, Nature biotechnology, 32 (2014), s.915-925
 37. Wang, Y., Ghaffari, N., Johnson, C.D., Braga-Neto, U.M., Wang, H., Chen, R., Zhou, H. *Evaluation of the coverage and depth of transcriptome by RNA-Seq in chickens*, BMC Bioinformatics, 12 (2011), s1-7
 38. <http://www.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing.html>
 39. Hitzemann R., Bottomly D., Darakjian P., Walter N., Iancu O., Searles R., Wilmot B. and McWeeney S. *Genes, behavior and next-generation RNA sequencing*, Genes, Brain and Behavior, 12 (2013), s. 1-12
 40. Aanes H., Winata C., Moen L.F., Østrup O., Mathavan S., Collas P. *Normalization of RNA-Sequencing Data from Samples with Varying mRNA Levels*, PLoS ONE, 9 (2014), s. e89158
 41. Liao W., Jordaan G., Nham P., Phan R.T., Pelegrini M., Sharma S. *Gene expression and splicing alterations analyzed by high throughput RNA sequencing of chronic lymphocytic leukemia specimens*, BMC Cancer, 15 (2015), s.1-14
 42. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. *Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome*, Nat Biotechnol, 15(2011), s.644-652
 43. Li B., and Dewey C.N. *RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome*, BMC Bioinformatics, 12 (2011), s.1-16
 44. Forster S.C., Finkel A.M., Gould J.A., Hertzog P.J. *RNA-eXpress annotates novel transcript features in RNA-seq data*, Bioinformatics, 29 (2013), s. 810-812
 45. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*, Bioinformatics, 26 (2010), s. 139-140
 46. Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies*, Nucleic Acids Research, 43 (2015), s. e47
 47. Anders S. and Huber W. *Differential expression analysis for sequence count data*, Genome Biology, 11 (2010), s. R106
 48. Kim S., Park J., Kim J.H. *RNAseq-based Transcriptome Analysis of Burkholderia glumae Quorum Sensing*, The Plant Pathology Journal, 29 (2013), s.249-259
 49. Trapnell C., Williams B.A., Pertea G., Mortazavi A.M., Kwan G., van Baren M.J., Salzberg S.L., Wold B., Pachter L. *Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation*, Nature Biotechnology (2010), s. 511-515

50. Waddington C. *Canalization of development and the inheritance of acquired characters*, Nature., 150 (1942), s. 563-565
51. Gruber B. M. *Epigenetyka a etiologia chorób neurodegradacyjnych*, Postępy HigMedDosw., 65 (2011), s. 542-551
52. Banerjee D., Shah S. P. *Array Comparative Genomic Hybridization: Proto-cols and Applications*, Methods in Molecular Biology., 973 (2013), s. 1-13
53. Paluszczak J., Baer-Dubowska, *Epigenom i nowotwory: nowy cel terapeutyczny i możliwości diagnostyczne. Postęp w ocenie jakości substancji i produktów leczniczych.*, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2010, s. 297-316
54. Colot V., Rossignol J.L. *Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device*, BioEssays., 21 (1999), s. 402-411
55. Churko J.M., Mantalas G.L., Snyder M.P., Wu J.C. *Overview of high throughput sequencing technologies to elucidate molecular pathways in cardiovascular diseases*, Circ Res., 112 (2013), s. 1613-1623
56. Almamun M., Levinson B.T., van Swaay A.C., Johnson N.T., McKay S.D., Arthur G.L., Davis J.W., Taylor K.H. *Integrated methylome and transcriptome analysis reveals novel regulatory elements in pediatric acute lymphoblastic leukemia*, Epigenetics, 10 (2015), s. 882-890
57. Ronnerblad M., Andersson R., Olofsson T., Douagi I., Karimi M., Lehmann S., Hoof I., de Hoon M., Itoh M., Nagao-Sato S., Kawaji H., Lassmann T., Carnici P., Hayashizaki Y., Forrest A.R.R., Sandelin A., Ekwall K., Arner E., Lennartsson A. *Analysis of the DNA methylome and transcriptome in granulopoiesis reveals timed changes and dynamic enhancer methylation*, Blood, 123 (2014), s. 79-89
58. Murphy S.K., Yang H., Moylan C.A., Pang H., Dellinger A., Abdelmalek M.F., Garrett M.E., Ashley-Koch A., Suzuki A., Tillmann H.L., Hauser M.A., Diehl A.M. *Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease*, Gastroenterology, 145 (2013), s. 1076-1087
59. Hirst M. *Epigenomics: Sequencing the methylome*, Methods in molecular biology, 973 (2013), s. 39-54
60. Farlik M., Sheffield N. C., Nuzzo A., Datlinger P., Schonegger A., Klughammer J., Bock C. *Single-Cell DNA methylome sequencing and bioinformatic inference of epigenomic cell-state dynamics*, Cell Rep., 10 (2015), s. 1386-1397
61. Xi Y., Li W. *BSMAP: whole genome bisulfite sequence MAPPING program*, BMC Bioinformatics., 10 (2009), s. 232-241
62. Chen P. Y., Cokus S. J., Pellegrini M. B. S. *Seeker: precise mapping for bisulfite sequencing*, BMC Bioinformatics., 11 (2010)
63. Kreuger F., Andrews S.R. *Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-seq applications*, Bioinformatics., 27 (2011), s. 1571-1572
64. Kreck B. *B-SOLANA: An approach for the analysis of two-base encoding bisulfite sequencing data*, Bioinformatics., (2011) published online: doi:10.1093/bioinformatics/btr660
65. Kreuger F., Kreck B., Franke A., Andrews S.R. *DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data*, Nature Methods., 9 (2012), s. 145-151
66. Liu H., Liu X., Zhang S., Lv J., Li S., Shang S., Jia S., Wei Y., Wang F., Su J., Wu Q., Zhang Y. *Systematic identification and annotation of human methylation marks based on bisulfite sequencing methylomes reveals distinct roles of cell*

type-specific hypomethylation in the regulation of cell identity genes, *Nucleic Acids Res.*, 8 (2016), s. 75-94

67. Brandbury J. *Human Epigenome Project – Up and running*, *PLoS Biol.*, 1 (2003), s. 316-319

Przegląd wybranych metod sekwencjonowania wysokoprzepustowego: przebieg analiz i zastosowań

Streszczenie

Genomika jest młodą dziedziną nauki, powstałą niewiele ponad 10 lat temu, pomimo to została okrzyknięta jedną z wiodących w XXI wieku. Obecnie genomika oraz jej pokrewne nauki dostarczają odpowiedzi na pytania dotyczące funkcjonowania organizmów, przyczyn zmienności genetycznych oraz etiologii chorób. Przy czym jest to jedynie załóżek rozwoju genomiki. Dynamiczny postęp tej nauki jest akcelerowany poprzez powstawanie coraz nowszych technologii analitycznych. Jednym z głównych narzędzi, które przyczyniły się do wzrostu genomiki oraz nauk pokrewnych, jest wysokoprzepustowe sekwencjonowanie materiału genetycznego.

W niniejszym opracowaniu przedstawiono porządek eksperymentu z wykorzystaniem sekwencjonowania nowej generacji obejmujący pracę laboratoryjną oraz analizę bioinformatyczną danych. W pracy został ujęty przebieg doświadczenia dla trzech, obecnie najbardziej dynamicznych gałęzi sekwencjonowania wysokoprzepustowego, mianowicie: sekwencjonowania genomowego, transkryptomowego oraz sekwencjonowania metylomu.

Słowa kluczowe: sekwencjonowanie wysokoprzepustowe, genomika, transkryptomika, epigenetyka, bioinformatyka

Survey of the selected high-throughput sequencing methods: the process of analyses and applications

Abstract

Genomics is a young field of science which occurred a little over 10 years ago, however it has been named one of the leading sciences of the XXI century. Nowadays genomics and its related sciences answer the questions concerning functioning of the organisms, reasons of genetic variability and etiology of diseases. While it is only the tip of the iceberg in terms of genomics development. Dynamic development of the science is accelerated by emergence of new analytic technologies. One of the major tools which contributed to growth of genomics and related sciences is high-throughput sequencing of genetic material.

In this study the order of next-generation sequencing research is presented including laboratory testing and bioinformatics analyses of data. The research pipeline for three, nowadays most dynamic branches of high-throughput sequencing is shown, including: sequencing of genome transcriptome and methylome.

Keywords: high-throughput sequencing, genomics, transcriptomics, epigenetics, bioinformatics

Zastosowanie metod chromatograficznych w analizie zawartości substancji psychoaktywnych w próbkach moczu, krwi i płynu z jamy ustnej

1. Wstęp

1.1. Sytuacja prawna

W polskim ustawodawstwie funkcjonuje „Wykaz środków odurzających i substancji psychotropowych”, jest to lista wszystkich substancji, których posiadanie, produkcja, przetwarzanie, przewóz i obrót są nielegalne w Polsce bez posiadania odpowiedniego zezwolenia regulowanego ustawą o przeciwdziałaniu narkomanii [9]. Od czasu opublikowania ustawy pojawiły się aktualizacje wykazu o nowe substancje (w 2011 oraz 2015 roku) oraz nowelizacja samej ustawy, która weszła w życie 25 sierpnia 2010 roku. Należy zauważyć, że istnieją substancje zawarte w wyżej wymienionym wykazie, które są dostępne (do 31.12.2016 roku) dla osób pełnoletnich bez recepty w aptekach i punktach aptecznych. W ustawie wymieniono trzy takie substancje będące składnikami leków: kodeina, dekstrometorfan oraz pseudoefedryna. Lista substancji nie zawiera natomiast niektórych leków psychoaktywnych dostępnych na receptę np. tramadol. W związku z mnogością różnych nowych substancji zawartych w tzw. dopalaczach nie możliwe jest umieszczenie ich w tym wykazie. Sytuację dobrze obrazuje ilość syntetycznych pochodnych kannabinoidów, których liczba z roku na rok ciągle wzrasta [7].

1.2. Rodzaje substancji psychoaktywnych

Do substancji psychoaktywnych możemy zaliczyć takie związki jak alkohol etylowy, nikotyna, opiaty, różnego rodzaju psychostymulanty (amfetamina, metamfetamina), kannabinoidy, steroidy, a także środki zastępcze czyli tzw. dopalacze. W niniejszej pracy skupiono się głównie na

¹ beata.kocyan@gmail.com, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny, www.sum.edu.pl

² aknapik14@gmail.com, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny, www.sum.edu.pl

³ martna.kozłowska@gmail.com, Wydział Lekarski w Katowicach, Śląski Uniwersytet Medyczny, www.sum.edu.pl

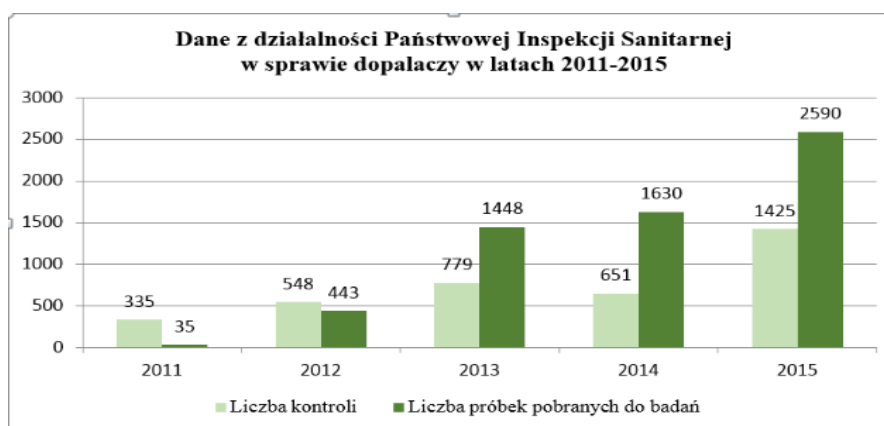
tych ostatnich substancjach ponieważ zatrucia tymi właśnie substancjami należą do coraz częstszych i niosą ze sobą bardzo poważne konsekwencje dla życia i zdrowia ludzi. Dopalmace są to substancje nie objęte wykazem środków odurzających i substancji psychoaktywnych. Swoim działaniem mają naśladować działanie klasycznych substancji psychoaktywnych. Możemy je podzielić na środki o działaniu pobudzającym, uspokajającym i naśladowującym działanie marihuany. Jedną z cech łączących wszystkie typy substancji jest wywoływanie uzależnienia psychicznego o sile zależnej od typu zażywanej substancji. Dodatkowym kryterium podziału jest pochodzenie substancji. Wyróżniamy dopalmace pochodzenia naturalnego wytwarzane z roślin takich jak np.: szałwia wieszcza *Salvia divinorum*, muchomor czerwony *Amanita Muscaria* czy drzewo kratom *Mitragyna speciosa* oraz pochodzenia syntetycznego będące efektem syntezy w laboratoriach. Wiele z syntetycznych dopalmaczy to analogi receptorów kannabinoidowych powstałych w trakcie badań nad ich wykorzystaniem do celów medycznych czy przemysłowych. Istotnym zagadnieniem jest kwestia uzależnień. Większość związków zawartych w „dopalmaczach” nie jest przebadana w tym kierunku, jednak istnieje wiele doniesień o większym potencjale uzależniającym „dopalmaczy” niż „klasycznych” narkotyków. W trakcie badań na zwierzętach dowiedziono, że istnieje korelacja pomiędzy czasem wystąpienia efektów działania substancji psychoaktywnej, poziomem odczuwanej przyjemności a wystąpieniem uzależnienia. Substancje po których efekt był odczuwalny natychmiastowo oraz takie po których odczuwano większą przyjemność szybciej wywoływały uzależnienie. Wyróżniamy tutaj zależność psychiczną (związaną z trudnym do przezwyciężenia dążeniem do przyjmowania danego środka) oraz zależność fizyczną (brak środka powoduje negatywny efekt) [5].

1.3. Dane statystyczne

Dane epidemiologiczne dotyczące używania dopalmaczy są alarmujące. Średnia krajowa liczba podejrzeń zatruc dopalmaczami w 2014 roku wynosiła 6,29 a w 2015 już 18,92 na 100 tysięcy mieszkańców co daje trzykrotny wzrost w skali roku. Najwięcej zatruc notowano w województwach łódzkim, lubuskim i śląskim [3]. Na przestrzeni lat 2011 do 2015 znacząco wzrosła liczba podmiotów oferujących dopalmace co skutkowało zwiększoną ilością przeprowadzonych kontroli. Dane z działalności Państwowej Inspekcji Sanitarnej ilustruje Tabela nr 1 oraz Wykresy 1 oraz 2.

Tabela 1. Opracowanie własne na podstawie danych ze strony Głównego Inspektora Sanitarnego w Warszawie, dostęp 01.06.2016r. <http://gis.gov.pl/zdrowie/dopalacze/dane-statystyczne>

Rok	Liczba kontroli	Liczba pobranych próbek do badań	Liczba podmiotów oferujących dopalacze	Liczba zawiadomień skierowanych do organów ścigania.
2011	335	35	11	24
2012	548	443	103	43
2013	779	1448	134	71
2014	651	1630	204	79
2015	1425	2590	224	135



Wykres 1. Opracowanie własne na podstawie danych Głównego Inspektora Sanitarnego w Warszawie, dostęp 01.06.2016 r. <http://gis.gov.pl/zdrowie/dopalacze/dane-statystyczne>



Wykres 2. Opracowanie własne na podstawie danych ze strony Głównego Inspektora Sanitarnego w Warszawie, dostęp 01.06.2016 r. <http://gis.gov.pl/zdrowie/dopalacze/dane-statystyczne>

1.4. Dostępność

Istnieje wiele możliwości nabycia dopalaczy. Z badań przeprowadzonych w 2011 roku przez Główny Inspektorat Sanitarny wynika, że 56% uczniów nabywa środki w sklepach z dopalaczami, 36% od koleżanek i kolegów, około 11% od dilerów a tylko 6% kupuje środki za pośrednictwem sklepów internetowych. Obecnie szacuje się, że około 70% użytkowników kupuje dopalacze w sklepach internetowych. Dodatkowym kryterium sprawiającym, że coraz więcej młodych ludzi sięga po dopalacze jest ich stosunkowo niska cena w porównaniu z klasycznymi narkotykami [3].

2. Podział i diagnostyka dopalaczy

2.1. Typy substancji wraz z ich efektem biologicznym

2.1.1. Pochodne kannabinoidów

Częstym składnikiem dopalaczy, zwłaszcza mieszanek ziołowych typu „Spice”, są syntetyczne kannabinoidy. Z racji dużego podobieństwa tych substancji do receptorów kannabinoidowych (CB1, CB2) wykazują działanie podobne do tetrahydrokannabinolu, głównego składnika aktywnego marihuany i haszyszu, jednak ich spożycie jest bardziej niebezpieczne [4]. Efekty działania mieszanek zawierających tego typu związku pojawiają się już po 10 minutach i utrzymują się przez około 6 godzin. Są to znaczne przyspieszenie tętna, suchość w ustach, przekrwienie spojówek oraz zmiany nastroju i percepcji [7]. Mogą powodować zaburzenia oddychania i utratę przytomności [4].

2.1.2. Pochodne piperazyny

Są to substancje o działaniu stymulującym i halucynogennym, spośród których głównie stosowane są benzylopiperazyna (BZP) i 1-(3-trifluorometylofenylo) piperazyna (TMPP). Połączenie tych dwóch substancji wywołuje działanie zbliżone do 3,4-Metylenodioksymetamfetaminy (MDMA), mają jednak więcej efektów ubocznych. Benzylo-piperazyna jest stymulantem OUN osiagającym 10% mocy amfetaminy. Do jej skutków ubocznych należą tachykardia, hipertonia, podwyższona temperatura, drgawki, depresja układu oddechowego oraz szczególnie groźne komorowe zaburzenia rytmu serca. Może powodować zachowanie agresywne [7]. TMPP w małych dawkach wywołuje słabe działanie empatogenne, natomiast w większych dawkach może powodować tachykardię, odczyny skórne, biegunkę, wymioty a także bóle mięśni i głowy czy psychozy.

2.1.3. Pochodne metkationu

Należą one do podrodziny pochodnych amfetaminy. Mefedron, pierwszy narkotyk zsyntetyzowany z tej grupy i również częsty składnik dopalaczy, wykazuje stosunkowo krótkie działanie, utrzymujące się 2-3 godziny. Do efektów odbieranych jako pozytywne zaliczają się poprawienie nastroju i stymulacja, lecz mefedron powoduje również zaburzenia widzenia, uczucie zmęczenia, problemy z koncentracją i pamięcią. Zaobserwowano ponadto wzrost ciśnienia i tachykardię, a także objawy świadczące o negatywnym wpływie na układ krążenia.

2.2. Diagnostyka dopalaczy

Mnogość różnych wariantów strukturalnych i chemicznych substancji stosowanych w dopalaczach wymusza na laboratoriach toksykologicznych wdrożenie procedur pozwalających na szybką diagnostykę związków zawartych w otrzymywanych próbkach. Zawartość substancji aktywnych w różnych preparatach jest bardzo niska dlatego metody stosowane rutynowo w tego typu oznaczeniach powinny się charakteryzować dużą precyzją i czułością. Najlepszą metodą analityczną wydaje się być chromatografia gazowa lub cieczowa w połączeniu ze spektrofotometrią mas. Ze względu na znaczną ilość substancji w poniższym opracowaniu zdecydowano się omówić diagnostykę tylko wybranych „dopalaczy”.

2.2.1. Przygotowanie próbek

Jednym z kluczowych problemów związanych z toksykologiczną analizą materiałów biologicznych jest niestabilność leków i ich metabolitów, spowodowana aktywnością enzymów, wpływem pH roztworu i temperatury przechowywania czy bezpośrednim działaniem związanym z wykonywaniem analizy. Właściwe przygotowanie próbek biologicznych, mające na celu izolację analitów z próbek, usunięcie interferentów i przekształcenie analitów w formę ułatwiającą rozdzielenie i detekcję, jest kluczowe dla prawidłowego przebiegu analizy. Najczęściej stosowanymi metodami izolacji analitów są ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE), przeprowadzana w warunkach pH, w których analit występuje w formie niezjonizowanej, oraz ekstrakcją do fazy stałej (SPE). Próbkę krwi pełnej wymagają procesów odbiałczenia i wirowania poprzedzających ekstrakcję SPE. Możliwe jest również wykorzystanie metody podwójnej ekstrakcji ciecz-ciecz, której produkt poddaje się mieszaniu, wytrząsaniu, wirowaniu, wymrażaniu. Tak wyizolowane warstwy organiczne odparowuje się w strumieniu azotu, a następnie ekstrakty rozpuszcza w mieszaninie acetonitryl : woda. Na stabilność substancji mają wpływ antykoagulanty stosowane przy pobieraniu próbki krwi. EDTA, kwas mrówkowy, kwas octowy, fluorek sodu,

heparyna, szczawian potasu oraz akrylan metylu mogą stabilizować anality w próbkach krwi. Izolacja analitów z płynu z jamy ustnej przeprowadzana jest przy użyciu metody mikroekstrakcji na upakowanym sorbencie (MEPS). Jest to metoda umożliwiająca szybką izolację substancji psychoaktywnych z próbek biologicznych znajdujących zastosowanie przy analizie materiałów pobieranych w niewielkich ilościach. Wstępne przygotowanie próbki do ekstrakcji obejmuje wirowanie w obniżonej temperaturze, filtrację oraz stosowanie ultradźwięków.

2.2.2. Syntetyczne pochodne kannabinoidów

Syntetyczne kannabinoidy najczęściej są sprzedawane pod postacią mieszanek ziołowych do palenia, kadzidełek a także jako aromatyczne mieszanki kwiatów tzw. „potpourri”. Skład podawany przez producentów zazwyczaj zawiera różne ekstrakty roślinne i znacząco odbiega od wyników analiz toksykologicznych. Przez długi czas (mieszanki tego typu są w sprzedaży od 2002 roku) nie było dokładnie wiadomo jakie substancje wywołują efekt psychoaktywny, dopiero badania niemieckiej formy THC Pharma potwierdziły obecność syntetycznych kannabinoidów w tych dopuszczonych do legalnego obrotu produktach. Analiza związków zawartych w „dopalaczach” niesie ze sobą pewne trudności. Zawartość substancji aktywnych zazwyczaj wynosi od 0,1-1,0% wagowego, dodatkowo produkty te są bogate w substancje, które mogą maskować obecność kannabinoidów jak np. gliceryna czy amidy kwasów tłuszczowych. Najlepszą metodą analityczną jest zastosowanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrofotometrią mas. Dzięki zastosowaniu technik łączonych możemy identyfikować substancje ze względu na ich czas retencji oraz elementy strukturalne co jest dużo bardziej korzystne w przypadku substancji nowych, dla których nie określono jeszcze wzorców. W wyżej wymienionych badaniach (niemiecka firma THC Pharma) stosowano chromatografię kolumnową, strukturę ustalano na podstawie wysokorozdzielczej (HRMS) i tandemowej (MS2) spektrofotometrii mas a dalsze analizy prowadzono z zastosowaniem jądrowego rezonansu magnetycznego (nMR) w tym technik korelacyjnych H,H-COSY, H,C-HSQC i HMBC.

2.2.3. Pochodne piperazyny

Do identyfikacji substancji z grupy piperazyn stosowana jest z dużym powodzeniem chromatografia cieczowa. Metabolity pochodnych piperazyny w osoczu krwi mogą być wykrywane i identyfikowane metodą chromatografii cieczowej połączonej ze spektrometrią mas (LC-MS), dzięki czemu możliwe jest badanie farmakokinetyki tych związków [1]. Chromatografia przy użyciu jako fazy stałej mrówczanu lub octanu amonu

oraz aminonitrylu w gradiencie fazowym, przeprowadzana w warunkach 20°C oraz detekcja fragmentografią mas (SIM) charakteryzuje się >90% dokładnością w określaniu ilości substancji [10]. Oznaczane są BZP, TMPP oraz ich hydroksylowe metabolity – odpowiednio izomery OH-BZP oraz OH-TMPP. Anality te, stosunkowo dobrze rozdzielone, eluują w kolejności TFMPP, p-OH-TFMPP, BZP i OH-BZP ze stosunkowo wysokim rozdziałem. W celu usprawnienia separacji izomerów m-OH-BZP oraz p-OH-BZP obniża się pH buforu octanowego poprzez dodanie kwasu octowego do osiągnięcia optymalnego pH=4 [8]. Poszczególne pochodne piperazyny mogą być dokładnie zidentyfikowane przy użyciu wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej z diodowym detektorem UV (HPLC-DAD). Analiza spektrum UV jest szczególnie istotna w rozróżnianiu izomerów TMPP oraz CPP, których identyfikacja metodą spektrometryczną jest utrudniona. Wykazano, iż BZP posiada podobne spektrum UV do amfetaminy, lecz znacząco odmienne od TMPP oraz CPP, które ponadto wykazują odmienne maksima UV w zależności od stereoisomeru [2]. W przypadku analizy metabolitów BZP w moczu chromatografią gazową i detekcją metodą fragmentografii mas, możliwa jest ich identyfikacja wyłącznie na podstawie czasu retencji oraz masy. Na podstawie tych dwóch parametrów określa się izomery metabolitu OH-BZP (m-OH-BZP i p-OH-BZP) [8]. Jako fazy stałej używa się helu wysokiej czystości o prędkości przepływu 1ml/min w gradiencie temperatury sięgającej 250C. Zaleca się stosowanie kombinacji metod GC-MS oraz LC-MS w celu uzyskania jak najbardziej wiarygodnych wyników analizy.

2.2.4. Pochodne metkationu

Opracowano metodę chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) pozwalającą na rozdział substancji takich jak kokaina i jej metabolity, amfetamina, katynony a także inne środki znajdujące się w dopalaczach. Jest to metoda bardzo szybka, trwająca zaledwie 11 minut, znajdująca zastosowanie w potwierdzeniu obecności i półilościowym oznaczaniu substancji psychoaktywnych w próbkach moczu. W celu przyspieszenia badania przesiewowego ocenia się jedynie substancje wyjściowe, gdyż wytworzenie wzorców ich metabolitów, przy niewielkich o nich danych znacznie wydłużyłoby proces analizy. Wysokie dawki przyjmowanych substancji umożliwiają jednak ich identyfikację w moczu. Bufor fazy ruchomej składa się z mrówczanu amonu i kwasu mrówkowego o stężeniach odpowiednio 25mM oraz 0,5%. Niskie pH zwiększa szybkość analizy przy zachowanej dokładności metody, stąd preferowane jest pH=3. Próbkę moczu wiruje się, a supernatant rozpuszcza w dejonizowanej wodzie w stosunku 1:9. W moczu występują związki wpływające na elucję

niektórych substancji, na co wskazuje wzmocnienie lub osłabienie sygnału związane z supresją jonową. Najsilniejsze osłabienie obserwuje się przy 3,4-metylenedioksympirowalerionie (MDPV), medetronie, bufedronie i innych katynonach, choć inne, takie jak etylon czy butylon wykazują wzmocnienie. Efekt ten jednak można wyeliminować poprzez przygotowanie próbek metodami opisanymi wyżej, takimi jak ekstrakcja w fazie stałej [6].

3. Wnioski

Od czasu kiedy na rynku pojawiły się „dopalacze” (2002 r.) notujemy znaczny postęp w metodach pozwalających poznać ich skład. Obecnie Narodowy Instytut Leków [5] do analiz toksykologicznych dopalaczy stosuje 4 techniki analityczne:

- spektrometrię masową;
- magnetyczny rezonans jądrowy (NRM);
- chromatografię gazową;
- dyfraktometrię rentgenowską.

Zastosowanie technik łączonych pozwala szybciej i trafniej identyfikować substancje ponieważ analiza wykonywana jest w oparciu o różne cechy danej substancji. W analizach nie oznacza się substancji tylko ze względu na czas retencji, ale także ze względu na właściwości strukturalne. Niestety zastosowanie wszystkich wspomnianych technik jest możliwe tylko w wyspecjalizowanych ośrodkach dysponujących odpowiednią aparaturą. W analizie związków dla których nie istnieją wzorce nic nie zastąpi doświadczonego i wykwalifikowanego toksykologa. Ważnym kryterium jest także koszt wykonania jednego badania. Idealnym rozwiązaniem byłaby metoda szybka, nie wymagająca wieloetapowego przygotowania próbek, która w dodatku mogłaby być wykonywana w warunkach Szpitalnych Oddziałów Ratunkowych czy szpitalnych laboratoriów.

Literatura

1. Antia U., Tingle M., Russell B. *Validation of an LC–MS Method for the Detection and Quantification of BZP and TFMPP and their Hydroxylated Metabolites in Human Plasma and its Application to the Pharmacokinetic Study of TFMPP in Humans*, J Forensic Sci, 55 (2010)
2. Elliott S. *Investigation of the First Deaths in the United Kingdom Involving the Detection and Quantitation of the Piperazines BZP and 3-TFMPP*, Journal of Analytical Toxicology, 32 (2008)
3. Główny Inspektorat Sanitarny, Raport w sprawie „dopalaczy” – nowych narkotyków, Warszawa, Październik 2011

4. Kalicki B., Sołtan E., Bartosiewicz L., Żuber J., Jung A., *Dopalacze- problem przeszłości czy zagrożenie dnia dzisiejszego?*, *Pediatrics i Medycyna Rodzinna*, 7 (2011)
5. Narodowy Instytut Leków, *Nowe Substancje Psychoaktywne – substancje aktywne farmakologicznie wykryte w tzw. „dopalaczach”- środkach zastępczych*
http://www.nil.gov.pl/images/dokumenty/Charakterystyki_zwiAzkOw_wykrtych_w_DOPALACZACH-2016.pdf dostęp: 01.06.2016 r.
6. O'Byrn P. *Screening of Stimulants Including Designer Drugs in Urine Using a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry System*, *Journal of Analytical Toxicology Advance Access*, 2013
7. Szukalski B., Błachut D. *Zmodyfikowane kannabinoidy- nowe groźne narkotyki*, *Problemy kryminalistyki* 268 (kwiecień-czerwiec) 2010
8. Tsutsumi H. *Development of simultaneous gas chromatography–mass spectrometric and liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometric determination method for the new designer drugs, N-benzylpiperazine (BZP), 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) and their main metabolites in urine*, *Journal of chromatography B*, Volume 819, Issue 2 (2005), s. 315-322
9. Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii. (Dz. U. z 2012 r. poz. 124)
10. Zuba D., Byrska B. *Prevalence and co-existence of active components of 'legal highs'*, *Wiley Online Library*, 2012

Zastosowanie metod chromatograficznych w analizie zawartości substancji psychoaktywnych w próbkach moczu, krwi i płynu z jamy ustnej

Streszczenie

W obliczu zwiększającej się ilości przypadków zatrucé tzw. dopalaczami czyli środkami zawierającymi różne substancje psychoaktywne nie ujętymi w wykazie środków odurzających i substancji psychotropowych, szybka analiza materiałów biologicznych pod kątem wyżej wymienionych substancji staje się niezwykle ważna. Pacjenci przyjmowani do Szpitalnych Oddziałów Ratunkowych z powodu zatrucé dopalaczami najczęściej są przywożeni w stanie niemożliwym do kontaktu oraz zebranie wywiadu co dodatkowo wydłuża proces diagnostyczny. Zwykle na obecność toksyn pobiera się krew lub mocz pacjenta, w ostatnim czasie wzrasta zainteresowanie nowymi materiałami do badań takimi jak np. płyn z jamy ustnej czy łzy. Dzięki możliwości zastosowania do badań materiałów tego typu nie ma konieczności wykonywania inwazyjnych procedur. W pracy skupiono się na wykorzystaniu do takiej identyfikacji metod chromatograficznych wraz z detektorami, a także na zagadnieniu odpowiedniego przygotowania próbek do analizy toksykologicznej.

Słowa kluczowe: dopalacze, chromatografia, toksykologia

Chromatography methods in the detection of psychoactive substances in blood, urine and oral fluid

Abstract

Facing the rising amount of cases of intoxication with designer drugs- agents containing a variety of psychoactive substances which are not included in the list of psychotropic substances, the fast analysis of biological material regarding mentioned substances becomes exceedingly important. Patients admitted to emergency departments due to designer drugs intoxication are predominantly brought in a state which renders contact and medical history collection impossible, what additionally prolongs the diagnosis process. Although ordinarily blood or urine samples are taken for toxicological analysis, a growing interest in the examination of other materials, such as fluid from oral cavity or tears, has recently arised. The possibility of the usage of such materials eliminates the necessity of performing invasive procedures. The article focuses on liquid and gas chromatography application in such indentification as well as on the issue of adequate sample preparation for toxicological analysis.

Keywords: designer drugs, chromatography, toxicology

Pułapki ilościowego oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych

1. Wstęp

Techniki separacyjne takie jak chromatografia gazowa, wysokosprawna chromatografia cieczowa czy techniki elektromigracyjne są w chwili obecnej podstawowymi technikami wykorzystywanymi w badaniach żywności czy w oznaczeniach klinicznych. Połączenie rozdziału na kolumnie z jednoczesną detekcją sprawia, że charakteryzują się wysoką selektywnością, a zastosowanie czułego detektora pozwala na oznaczenia istotnych składników śladowych takich jak np. antyoksydanty, witaminy czy ksenobiotyki. Tematyka prezentowanego artykułu dotyczy wykorzystania technik chromatograficznych do oznaczania kwasu liponowego, istotnego antyutleniacza mitochondrialnego.

2. Co to jest kwas α -liponowy

Kwas liponowy – to ośmiowęglowy, nasycony kwas tłuszczowy, znany również jako kwas 6,8-ditiooktanowy, kwas α -liponowy, tiooktan, ALA [3, 27]. Stosowane nazwy systematyczne to kwas 1,2-ditioolano-3-pentanowy [4], kwas 1,2-ditioolano-3-walerianowy, kwas δ -[3-(1,2-ditiacyklopentylo)]-pentanowy.

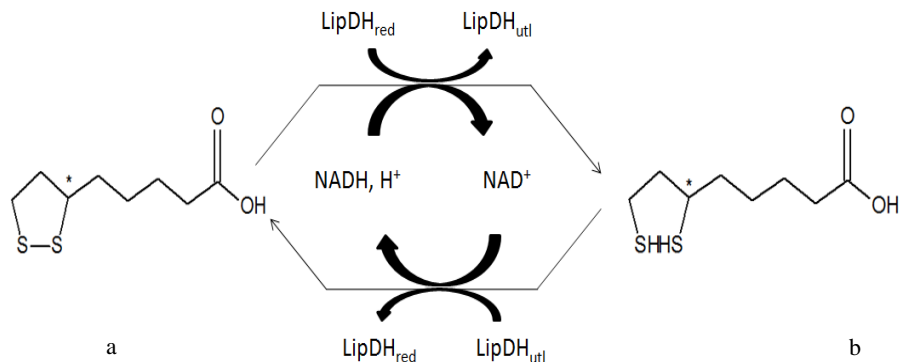
Cząsteczka kwasu liponowego składa się z pięcioczłonowego, heterocyklicznego pierścienia z ugrupowaniem disulfidowym. Pięciowęglowy łańcuch boczny z grupą karboksylową przyłączony jest do pierścienia w pozycji α względem atomu siarki (rys. 1) [17].

Jest to związek wszechobecny. Występuje we wszystkich komórkach organizmów, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych, głównie w formie utlenionej jako kwas liponowy (LA) i zredukowanej jako kwas dihydroliponowy (DHHLA) (Rys. 1). Stanowi ważny element mitochondrialnego łańcucha oddechowego.

¹ Joanna Karpińska, joasia@uwb.edu.pl, Instytut Chemii, Uniwersytet w Białymstoku.

² Urszula Kotowska, ukrajew@uwb.edu.pl, Instytut Chemii, Uniwersytet w Białymstoku.

³ Justyna Kapelewska, j.kapelewska@uwb.edu.pl, Instytut Chemii, Uniwersytet w Białymstoku.



Rysunek 1 Układ redoks LA/DHLA; a – kwas liponowy (LA); b – kwas dihydroliponowy (DHLA)¹

Kwas liponowy (LA) obecnie jest uważany za uniwersalny antyoksydant i istotny kofaktor szlaków energetycznych [3]. W mitochondriach forma utleniona i zredukowana kwasu liponowego tworzy układ redoks (rys 1). Reakcja redukcji kwasu liponowego zachodzi przy udziale mitochondrialnej dehydrogenazy lipoamidowej (LipDH) w obecności zredukowanej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADH). Proces ten stanowi odwracalny układ redoks. W obecności utlenionej formy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD⁺) kwas dihydroliponowy ponownie zostaje utleniany do kwasu liponowego³. Wartość potencjału redoks pary LA/DHLA wynosząca $E^{\circ}LA/DHLA = -0,32$ V³ sprawia, że kwas liponowy bierze udział w regeneracji utlenionych form innych antyoksydantów komórkowych takich jak kwas askorbowy, tokoferol, glutation i koenzym Q102 [28].

Z powodu umiarkowanej długości bocznego łańcucha z grupą karboksylową, wykazuje ograniczoną rozpuszczalność w wodzie. Lepiej rozpuszcza się w tłuszczach oraz rozpuszczalnikach organicznych [23, 25]. Cecha ta sprawia, że jest pośrednikiem pomiędzy lipofilnymi antyutleniaczami takimi jak tokoferol czy koenzym Q₁₀ a hydrofilowymi (witamina C i glutation) [7]. Kwas liponowy oraz kwas dihydroliponowy biorą udział w dezaktywacji wolnych rodników takich jak HO[•], NO[•], NO₂[•] oraz zmniejszają aktywność nadtlenku azotu, wodoru a także podchlorynów. Reakcja „zmiatania” rodnika hydroksylowego HO[•] przez kwas liponowy powoduje ostateczne unieszkodliwienie rodnika.

Ze względu na zdolności do chelatowania jonów metali przejściowych, kwasy liponowy oraz dihydroliponowy biorą udział w detoksyfikacji organizmów. LA tworzy stabilne kompleksy z kationami Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} oraz Cu^{2+} . DHLA z kolei chelatuje kationy: Pb^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} oraz Fe^{3+} (kompleks z Fe^{3+} jest stabilniejszy niż z Fe^{2+})^{2,6,7}. Dodatkowo, pochodne kwasu liponowego mogą tworzyć kompleksy z Cd^{2+} .

Kwas liponowy jest istotnym czynnikiem regulacyjnym szeregu komórkowych szlaków metabolicznych. Jest związkiem pośrednio wpływającym na syntezę glutationu¹. Wchodzi w skład kompleksu znajdującego się w mitochondriach wątroby, który powoduje rozkład glicyny do CO_2 i NH_3 ⁶. Kwas liponowy pełni rolę koenzymu w oksydacyjnej dekarboksylacji kwasu pirogronowego do acetylo-CoA. Jest częścią kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Jego zadaniem jest przeniesienie grupy acylowej na CoA. Podobne zadanie spełnia w kompleksie dehydrogenazy 2-okso-glutaranowej [32]. Ponad to, bierze udział w metabolizmie takich aminokwasów jak: leucyna, walina i izoleucyna. Pełni rolę kofaktora w wieloenzymatycznym kompleksie dehydrogenazy α -ketokwasów o rozgałęzionych łańcuchach.

Ze względu na swoje cenne znalazł zastosowanie w farmakoterapii, medycynie oraz kosmetologii. W kosmetologii stosowany jest głównie w środkach do pielęgnacji i ochrony skóry. Jego rolą jest działanie przeciwzmarszczkowe, nawilżające, fotoochronne, ujędrniające i przeciwzapalne. W kosmetykach stosowany jest na poziomie stężeń 1-7%. Używa się go w takich produktach jak kremy, sera, lotiony i maseczki do stosowania na skórze twarzy, dekoltu, ciała i oczu. Niekiedy także używa się go w podkładach, środkach do pielęgnacji ust, płynach do kąpieli.

Stosuje się go także w wielu terapiach m.in. w zatruciu metalami ciężkimi oraz grzybami, chorobach wątroby, cukrzycy, neuropatii cukrzycowej oraz infekcji wirusem HIV [35].

Kwas liponowy może być dostarczany dla organizmu wraz z pożywieniem lub poprzez suplementację.

Naturalnymi źródłami LA są produkty pochodzenia zwierzęcego, jak również roślinnego. Znajdziemy go głównie w podrobach tj. nerki, wątroba oraz w takich warzywach jak: szpinak, pomidory czy brukselka pod postacią ϵ -amidu lizyny. Postać ta w połączeniu z aminokwasami, poprzez wiązania peptydowe, tworzy reszty lipoilowe. Reszty te są składnikami wielu enzymów np. dehydrogenazy pirogronianowej. Ugrupowania lipoilowe znajdziemy w mitochondriach, a w przypadku roślin również w chloroplastach.

Zawartość kwasu liponowego w produktach spożywczych jest rzędu kilku mikrogramów na gram – wyższa w produktach pochodzenia roślinnego. Natomiast w produktach pochodzenia zwierzęcego znajdziemy go

głównie w podrobach. Poziom LA w komórkach niektórych bakterii np. *Escherichia coli B*, *Bacillus subtilis* jest bardzo wysoki. Zawartość kwasu liponowego w różnych próbkach zestawiono w tabeli 1.

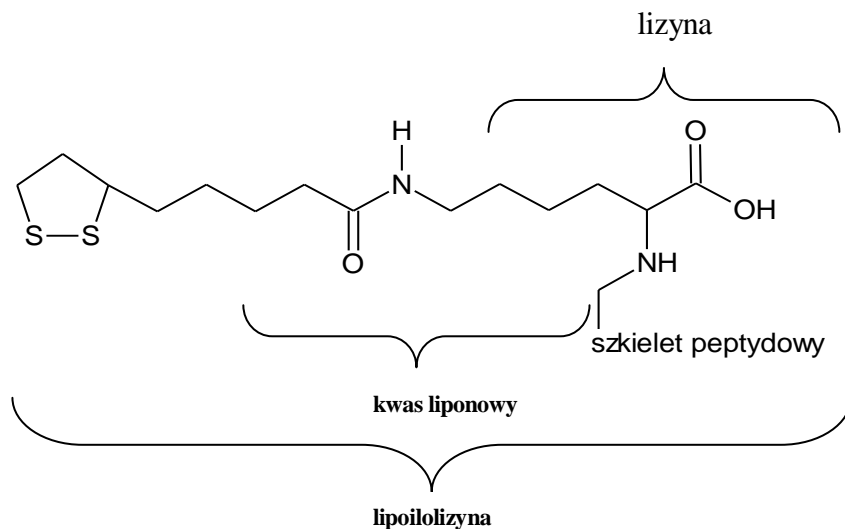
Tabela 1. Poziom kwasu liponowego w próbkach zwierzęcych i roślinnych

Próbka	Zawartość kwasu liponowego [$\mu\text{g/g}$]
Nerki wołowe	2,64
Serce wołowe	1,51
Wątroba wołowa	0,86
Szpinak	3,15
Zielony groszek	0,39
Ziemniak	4,20
Brokuły	0,94
Pomidory	0,56
Brukselka	0,39
Żółtko jaja kurzego	0,05
<i>Aerobacter vinelandii</i> (pałeczka jelitowa)	34,96
<i>Bacillus subtilis</i> (laseczka sienna)	17,65
<i>Escherichia coli B</i> (pałeczka okrężnicy)	2,3-11,8

3. Pułapka 1 – przygotowanie próbki do analizy

Ze względu na coraz szersze wykorzystanie kwasu liponowego, jak również coraz lepsze zrozumienie jego roli, niezbędna staje się wiedza dotycząca jego zawartości w produktach spożywczych, oszacowanie poziomu dziennego spożycia wraz z całodzienną dietą jak również oznaczenia w próbkach klinicznych.

Oznaczanie kwasu liponowego jest złożonym zadaniem analitycznym. Do analizy ilościowej kwasu liponowego wykorzystuje się techniki separacyjne, głównie chromatografię cieczową ale również gazową oraz techniki elektromigracyjne [18]. Wymaga to starannego przygotowania próbek: oddzielenia od matrycy, oczyszczenia a następnie zagęszczenia. Dodatkowo, kwas liponowy w układach biologicznych występuje w trzech formach: kowalencyjnie związany poprzez wiązanie peptydowe z resztą ϵ -aminową lizyny (rys. 2), luźno związany wiązaniami wodorowymi z kompleksami białkowymi oraz w postaci wolnego kwasu liponowego.



Rysunek 2. Struktura ugrupowania lipoilowego.

Wydzielanie kwasu liponowego z próbek rzeczywistych możliwe jest za pomocą różnych technik ekstrakcyjnych np. ekstrakcji ciecz-ciało stałe (SPE) [19], czy ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) [9]. W procedurze opartej na technice SPE wykorzystano kolumnę ekstrakcyjną C₁₈. Zatrzymany złożu kwas liponowy wymywano dichlorometanem a następnie uzyskany ekstrakt suszono strumieniem azotu w temperaturze 40°C.

Większość procedur izolacji kwasu liponowego wykorzystuje ekstrakcję ciecz ciecz z użyciem różnych rozpuszczalników. Do tego celu najczęściej używany jest dichlorometan, metanolowy roztwór kwasu octowego, octan etylu [22, 7], acetonitryl [37] lub eter dietylowy [24]. Zaproponowano procedurę dyspersyjnej ekstrakcji cieczowej wykorzystującą chloroform jako rozpuszczalnik ekstrahujący, zaś acetonitryl jako fazę dyspersyjną [33]. Nadmiar rozpuszczalnika jest odparowywany w atmosferze gazu obojętnego.

W przypadku oznaczania całkowitej zawartości kwasu liponowego konieczne jest rozerwanie wiązania peptydowego z lizyną. Wówczas niezbędne jest włączenie do procesu przygotowania próbki etapu hydrolizy, najczęściej kwasem siarkowym lub łagodniejszą enzymatyczną, np. subtylizyną A i pronazą E w odpowiednich proporcjach [29]. Należy pamiętać, że hydroliza enzymatyczna jest procesem wymagającym długiego czasu inkubowania, nawet do 24 godzin. Proces hydrolizy kwasowej jest znacznie szybszy. Prowadzony jest najczęściej w wysokich temperaturach, w obecności kwasów nieorganicznych (kwas siarkowy, solny) co może powodować rozkład samego analitu a przez to być źródłem błędów.

4. Pułapka 2 – oznaczenie ilościowe

Końcowym etapem procedury oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych jest analiza chromatograficzna. Jak już było wspomniane wcześniej, podstawową techniką analityczną jest chromatografia cieczowa z różnymi technikami detekcji (elektrochemiczną, spektrofotometryczną w zakresie UV, fluorymetryczną, chemiluminescencyjną czy spektrometrii mas). Wykorzystanie detektorów spektrofotometrycznych bądź fluorymetrycznych wymaga modyfikacji cząsteczki kwasu liponowego, gdyż nie zawiera ona grup chromoforowych ani też fluoroforowych. Widmo UV kwasu liponowego (LA) posiada dwa pasma absorpcji: słabsze przy 330 nm i intensywniejsze przy 210 nm. Natomiast widmo absorpcji zredukowanej formy, kwasu dihydroliponowego nie zawiera charakterystycznych pasm, jedynie jedno niespecyficzne przy 198 nm. Dlatego też, w literaturze niewiele jest opisanych procedur wykorzystujących bezpośredni pomiar absorbancji do bezpośredniej detekcji kwasu liponowego [2]. Zaproponowana przez Aboul-Enein metoda oznaczania charakteryzuje się wysokimi wartościami wykrywalności (4,4 $\mu\text{gLA/mL}$) i oznaczalności (16,8 $\mu\text{gLA/mL}$). Z tego względu autorzy wykorzystali ją do oznaczenia zawartości LA w preparacie farma-ceutycznym.

Analiza żywności bądź próbek klinicznych wymagają znacznie czulszych metod analitycznych. Kryteria czułości i selektywności spełniają metody chromatograficzne sprzężone z detektorami elektrochemicznymi bądź spektrometrii mas. Wykorzystanie detektora kulometrycznego pozwoliło na oznaczenie kwasu liponowego w zakresie 0,01-1 $\mu\text{gLA/mL}$ (granica wykrywalności 0,03 $\mu\text{gLA/mL}$) [30]. Użycie detektora z elektrodą diamentową domieszkowaną borem umożliwiło oznaczenie kwasu liponowego w zakresie 0,01-60 $\mu\text{gLA/mL}$ z granicą oznaczalności na poziomie 3,00 ngLA/mL .

Zbadano przebieg reakcji utlenienia i redukcji kwasu liponowego na grafitowej elektrodzie modyfikowanej ftalocyjanią kobaltu za pomocą technik woltamperometrycznych oraz możliwości ich wykorzystania w analizie ilościowej [11]. Stwierdzono, że za pomocą techniki różnicowej woltametrii pulsowej można oznaczyć kwas liponowy w zakresie stężeń 0,1-3,9 $\mu\text{gLA/mL}$ (granica wykrywalności 0,25 ngLA/mL). Dodatkową korzyścią z wykorzystania detektorów elektrochemicznych jest możliwość jednoczesnego oznaczania oby form – utlenionej (LA) i zredukowanej (DHLA) kwasu liponowego [20].

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej prac wykorzystujących jako technikę detekcji spektrometrię mas. Do badań farmakokinetycznych zaproponowano metodę HPLC z tandemowym detektorem mas oznaczania

kwasu liponowego w osoczu szczurów laboratoryjnych [38]. Zakres liniowości zaproponowanej metody wynosił 0,005-5 $\mu\text{gLA/mL}$.

Wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z detektorem MS z elektrorozpylaniem wykorzystano do oznaczenia kwasu liponowego w suplementach diety w zakresie 0,005-1 $\mu\text{gLA/mL}$ (granica wykrywalności 0,003 $\mu\text{gLA/mL}$) [10].

Pomimo tego, że detektory elektrochemiczne czy spektrometrii mas charakteryzują się wysoką czułością pozwalającą na uzyskiwanie niskich granic oznaczalności, nie są zbyt często wykorzystywane w analityce kwasu liponowego. Podstawowym ograniczeniem jest cena. Zestawy LC-MS ciągle są bardzo drogie a przez to nie są powszechnie dostępne. Również koszt zakupu detektorów elektrochemicznych jest wysoki, do tego dochodzą koszty ich eksploatacji. Poza tym ich użycie ogranicza się do związków o właściwościach redoks, co dodatkowo zniechęca do ich nabywania.

Wykorzystanie spektrofotometrycznych lub fluorymetrycznych technik detekcji wymaga wprowadzenia do cząsteczki kwasu liponowego grup chromoforowych lub fluoroforowych. Pozwala to na oznaczanie tego analitu z dobrą czułością w złożonych matrycach. Wprowadzenie dodatkowego etapu do procedury analitycznej nie jest pozbawione wad. Wydłuża procedurę analityczną i dodatkowo może być źródłem błędów. Wykorzystanie reakcji derywatyzacji wymaga od analityka starannej walidacji, określenia wydajności wykorzystywanego procesu.

Kwas liponowy w cząsteczce posiada dwie grupy funkcyjne: grupę karboksylową oraz ugrupowanie disiarczkowe. Analityczne wykorzystanie reakcji grupy karboksylowej jest niestety trudne. Ugrupowanie to w kwasie liponowym jest niereaktywne i wymaga przeprowadzenia w chlorek kwasowy bądź amid, a następnie przeprowadzenie w odpowiednie pochodne. Cały proces musi być przeprowadzany w środowisku niewodnym, najlepiej w atmosferze gazu obojętnego. Bardziej reaktywne są ugrupowania sulfidowe. W cząsteczce kwasu liponowego występuje w postaci połączenia disulfidowego. Ażeby wprowadzić ugrupowanie znacznikowe, należy przeprowadzić reakcję redukcji w celu rozerwania połączenia S-S. Do tego celu wykorzystywany jest najczęściej tetra borowodorek sodu (NaBH_4) czy tributylfosfina [16]. Następnie przeprowadza się właściwą reakcję derywatyzacji z odczynnikami spektrofotometrycznym bądź fluorometrycznym. W analityce kwasu liponowego wykorzystano reakcje z monobromobimananem [36], pochodnymi kumaryny (4-bromometylo-6,7-dimetoksykumaryną), bromkiem 1-benzyl-2-chloropirymidyniowym, tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylocholinowym (CMQT) [12], 2-(4-aminofenyl)-6-metylobenzotiazolem [13], 4-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolo-7-siarczanem amonowym, pochodnymi pirenu: N-

(1-pireno)jodoacetamidem i N-(1-pirenometylo)jodoacetamidem. Opisane metody derywatywacji wraz z charakterystyką analityczną zebrano w tabeli 2.

Tabela 2. Metody oznaczania kwasu liponowego wykorzystujące reakcje derywatywacji

Odczynnik derywatyzujący	Użyta technika	Zakres liniowości	LoD	LoQ	Literatura
tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy	HPLC/UV	2.5-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	4.20 pmol	13.00 pmol ¹	28
bromek 1-benzyl-2-chloropirydyniowy	HPLC/UV	0.2-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$	8
4-bromometylo-6,7-dimetoksykumaryna	LC/FL	0.1-20 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1.03 pg	-	15
4-bromometylo-6,7-dimetoksykumaryna	LC/FL	0.1-40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	5 fmol	-	18
aldehyd fталowy	HPLC/FL	15-1000 ng/ mL	3,0 ng/ mL	15,0 ng/ mL	26
monobromobiman	HPLC/FL	20-3000 nM	-	-	27
2-(4-aminofenyl)-6-metylobenzotiazol	HPLC/FL	50nM-5 μM	-	-	29
4-fluoro-2,1,3-benzoksadiazolo-7-siarczan amonowy	HPLC/FL	0,94-60,0 μM	0,13 pM	0,44 pM	19
N-(1-pireno)jodoacetamid N-(1-pirenometylo)jodoacetamid	HPLC/FL	0.75-120 $\mu\text{mol L}^{-1}$	<3.1 fmol	-	26
4-bromometyl-6,7-dimetoksykumaryna	MALDI/TOF	0.1-40 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0.83 pg	-	18
kwas 3-pirydylokarboksylowy (niacyna)	UPLC/ESI-MS/MS	1-750 ng/mL	-	-	6
chlorowodorek heksahydro-1-(5-isochinolino-sulfonylo)-1H-1,4-diazepina (fasudil)	LC-MS/MS	1,0-1000,0 ng/mL	-	1,0 ng/mL	14

Reakcję grup tiolowych kwasu liponowego z 7-hydroksykumaryną wykorzystano w mikroskopii fluorescencyjnej do obrazowania specyficznych białek w komórce [34].

Trwałość termiczna i wystarczająca lotność kwasu liponowego pozwalają na bezpośrednie oznaczanie go metodą chromatografii gazowej. Jednak obecność polarnej grupy karboksylowej powoduje znaczne ogonowanie

piku, a co za tym idzie negatywnie wpływa na czułość oznaczenia. Silowanie za pomocą N-metylo-N-tert-butylo-dimetylosilotrifluoroacetamidu (MTBSTFA) pozwala na usunięcie tych niedogodności. Oznaczono kwas liponowy w próbkach mięsa w postaci pochodnej sililowej w zakresie 10-20 pg/ μ L.

5. Inne techniki

W literaturze naukowej spotykane są nieliczne próby wykorzystania innych technik analitycznych do analizy ilościowej kwasu liponowego. Do tego celu wykorzystano m. in. technikę elektroforezy kapilarnej z detekcją UV [31] oraz elektrochemiczną [15]. Opracowane procedury wykorzystano do oznaczenia LA preparacie farmaceutycznym oraz w próbkach komórek linii 293T. Detekcja spektrofotometryczna pozwoliła na oznaczenie LA w zakresie stężeń 10-900 μ g/mL (granica wykrywalności 0,8 μ g/mL, granica oznaczalności 2,5 μ g/mL). Dzięki połączeniu detekcji elektrochemicznej z rozdziałem elektromigracyjnym uzyskano zakres liniowości 0,5-80 μ mol/L (granica wykrywalności 0,5 μ mol/L).

Zaproponowano połączenie detekcji chemiluminescencyjnej z rozdziałem chromatograficznym do oznaczania LA w preparacie farmaceutycznym oraz w próbkach biologicznych. Stwierdzono, że chemiluminescencja generowana w wyniku reakcji KMnO_4 z LA w środowisku formaldehydu i metaheksafluorofosforanu (V) sodu zależy od stężenia kwasu liponowego. Chromatograficzny rozdział próbek rzeczywistych prowadzono na kolumnie C_{18} za pomocą fazy ruchomej acetonitryl – 0,05 M KH_2PO_4 (pH 3) = 30:70, (v/v). Zakres liniowości opracowanej metody wynosił 0,05-20 μ g/mL (granica wykrywalności 0,004 μ g/mL). Opracowaną metodę wykorzystano do oznaczenia zawartości kwasu liponowego w preparacie farmaceutycznym oraz w wybranych produktach spożywczych.

Abbas i Radwan [1] zaproponowali metodę przepływową z detekcją potencjometryczną do oznaczania kwasu liponowego. Pomiar stężenia przeprowadzono za pomocą specjalnie skonstruowanej elektrody selektywnej w stosunku do LA. Opisana procedura pozwalała na oznaczenie LA w zakresie 10^{-7} – 10^{-2} mol/L z granicą wykrywalności równą $9 \cdot 10^{-8}$ mol/L³⁷.

Właściwości kompleksotwórcze kwasu dihydroliponowego (DHLA) stały się podstawą opracowania spektrofotometrycznej metody oznaczania LA w preparacie farmaceutycznym [21]. Zaproponowana procedura wykorzystuje reakcję pomiędzy DHLA a jonami Pd(II). Prawo Lamberta Beera jest spełnione w zakresie stężeń $7,5 \cdot 10^{-6}$ - 10^{-4} mol/L. Czułość metody wyrażona wartością molowego współczynnika absorpcji wynosi $3,597 \cdot 10^3$.

6. Podsumowanie

Ilościowe oznaczanie kwasu liponowego jest trudnym przedsięwzięciem analitycznym. Wymaga szczegółowego określenia celu analizy, jak również informacji na temat form występowania w badanym materiale. Oznaczanie tego związku w materiale biologicznym wiąże się z koniecznością oddzielenia go od matrycy i zatężenia. Dodatkową trudnością jest konieczność transformacji cząsteczki kwasu liponowego w formę kompatybilną z końcową techniką detekcji. W prezentowanej pracy zaprezentowano informacje dotyczące opracowanych procedur ekstrakcji, stosowanych rozpuszczalników oraz wykorzystywanych do derywatywacji kwasu liponowego reagentów. Dodatkowo zamieszczono charakterystykę analityczną opisanych metod oznaczania.

Literatura

1. Abbas M.N., Radwan A.A. *Novel lipoate membrane sensor for the flow injection determination of α -lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine*, Talanta, 74 (2008) s. 1113-1121
2. Aboul-Enein H. Y., Hoenen H. *Validated Method for determination of α -lipoic acid in dietary supplement tablets by reverse phase liquid chromatography*, Journal of Liquid Chromatography and Related Techniques. 27 (2004), s. 3029-3038
3. Bednarczyk-Cywnar B., Zaprutko L., *Kwas liponowy w kosmetyce i dermatologii*, Polish Journal of Cosmetology. 10(1), 2-12, 2007
4. Bednarczyk-Cywnar B., Zaprutko L., *Naturalne i syntetyczne źródła kwasu liponowego*, Polish Journal of Cosmetology. 10(2), 91-99, 2007
5. Borowczyk K., Krawczyk M., Kubalczyk P., Chwatko G., *Determination of lipoic acid in biological samples*. Bioanalysis.7 (2015), s. 1785-1798
6. Chen X., Gao J., Jiang Y., Huang P., Xie Y., Pi R., Zhu Z., Yao M. *Determination a newly synthesized lipoic acid-niacin dimer in rat plasma by UPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study*, Chromatography 28 (2014), s. 213-217
7. Chia-Ju Tsai, Ying-Chi Lin, Yen-Ling Chen, Chia-Hsien Feng *Chemical derivatization combined with capillary LC of MALDI-TOF MS for trace determination of lipoic acid in cosmetics and integrated protein expression profiling in human keratinocytes*, Talanta. 130 (2014), s. 347-355
8. Chwatko G., Kubalczyk P., Bald E. *Determination of lipoic acid in the form of 2-S-pyridinium derivative by high – performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, Current Analytical Chemistry, 10(4) (2014), s. 320-325
9. Durrani A. I., Schwartz H., Nagi M., Sontag G. *Determination of free α -lipoic acid in foodstuffs by HPLC coupled with CEAD and ESI-MS*. Food Chemistry. 120 (2010), s. 1143-1148
10. Durrani A. I., Schwartz H., Schmid W., Sontag G. *α -lipoic acid in dietary supplements: development and comparison of HPLC-CEAD and HPLC-ESI-MS method*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis., 45 (2007), s. 694-699

11. Ferreira A.P.M., dos Santos Pereira L.N., Santos da Silva I., Tanaka S. M.C.N., Tanaka A.A., Angnes L. *Determination of lipoic acid on a pyrolytic graphite electrode modified with cobalt phthalocanine*, *Electroanalysis* 26 (2014), s. 2138-2144
12. Godlewska M., Odachowska A., Turkowicz M., Karpinska J. *Analysis of Reaction between α -Lipoic Acid and 2-Chloro-1-methylquinolinium Tetrafluoroborate Used as a Precolumn Derivatization Technique in Chromatographic Determination of α -Lipoic Acid*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Vol 2015, Article ID 535387, 7 pages
13. Haj-Yehia A.I., Assaf P., Nassar T., Katzhendler J. *Determination of lipoic acid and dihydrolipoic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection*, *Journal of Chromatography A.*, 870 (2000), s. 381-388
14. Hou W., Liu G., Sun X., Xie Z., Pi R., He W., Li M., Liao Q. *Determination of newly synthesized lipoic acid fasudil dimer in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetics stud.* *Analytical Methods.*, 6 (2014), s. 8675-8681
15. Hua Li, Yu Kong, Liao Chang, Zhihui Feng, Nan Chang, Jiankang Liu, Jianguang Long. *Determination of lipoic acid in biological samples with acetonitrile-salt stacking method in CE*. *Chromatographia* 77 (2014), s. 145-150
16. Inoue T., Sudo M., Yoshida H., Todoroki K., Nohta H., Yamaguchi M. *Liquid chromatographic determination of polythiols based on pre-column excimer fluorescence derivatization and its application to α -lipoic acid analysis*, *Journal of Chromatography A.*, 1216 (2009), s. 7564-7569.
17. Karlson P., *Zarys biochemii*, Wydanie piąte, PWN, Warszawa, 126, 1987.
18. Kataoka H., *Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds*, *Journal of Chromatography B.* 717 (1998), s. 247-262.
19. Khan A., Khan M.I., Iqbal Z., Ahmad L., Shah Y., Watson D.G., *Determination of lipoic acid in human plasma by HPLC-ECD using liquid-liquid and solid-phase extraction: Method development, validation and optimization of experimental parameters*”. *Journal of Chromatography B.* 878 (2010), s. 2782-2788
20. Khan Abad, Iqbal Z., Watson D.G., Khan Amirzada, Khan I., Muhammad N., Muhammad S., Ara Nasib H., Iqbal N., Faiz-ur-rehman, Kashiff M. *Simultaneous determination of lipoic acid (LA) and dihydrolipoic acid (DHLA) in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection*, *Journal of Chromatography B* 879 (2011), s. 1725-1731
21. Korićanac Z., Čakar M., Tanasković S. Jovanović T. *Spectrophotometric determination of thioctic (α -lipoic acid) in water and pharmaceutical preparations*, *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (2007) s. 29-35
22. Kumar Trivedi R., Reddy Kallem R., Rao N.V.S. Mamidi, Mullangi R., Srinivas N.R. *Determination of lipoic acid in rat plasma by LC-MS/MS with electrospray ionisation: assay development, validation and application in pharmaceutical study*, *Biomedical Chromatography.* 18 (2004), s. 681-686
23. Malińska D., Winiarska K., *Kwas liponowy – charakterystyka i zastosowanie w terapii*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 59 (2005), s. 535-543
24. Mattulat A., Baltes W. *Determination of lipoic acid in meat of commercial quality*, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 194 (1992), s. 326-329

25. Navari-Izzo F., Quartacci M.F., Sgherri C. *Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species*, Plant Physiology and Biochemistry. 40 (2002), s. 463-470
26. Niebch G., Büchele B., Blome J., Grieb S., Brandt G., Kampa P., Raffel H.H., Locher M., Borbe H.O., Nubert I., Fleischhauer I. *Enantioselective High-performance liquid chromatography assay of (+)R- and (-)S- α -lipoic acid in human plasma*. Chirality 9 (1997), s. 32-36
27. Packer L., Kraemer K., Rimbach G. *Molecular Aspects of Lipoic Acid in the Prevention of Diabetes Complications*, Nutrition. 17 (2001), s. 888-895
28. Packer L., Witt E.H., Tritschler H.J., *Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant*, Free Radical Biology & Medicine. 19 (1995), s. 227-250
29. Satoh S., Shindoh M., Zhe Min J., Toyo'oka T., Fukushima T., Inagaki S. *Selective and sensitive determination of lipolysine (protein-bound α -lipoic acid) in biological specimens by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*, Analytica Chimica Acta. 618 (2008), s. 210-217
30. Siangproh W., Rattanarat P., Cailapakul O. *Reverse-phase liquid chromatographic determination of α -lipoic acid in dietary supplements using a boron-doped diamond electrode*, Journal of Chromatography A. 1217 (2010), s. 7699-7705
31. Sitton A., Schmid M.G., Gübitz G., Aboul-Enein Hassan Y. *Determination of lipoic acid in dietary supplement preparations by capillary electrophoresis*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 61 (2004), s. 119-124
32. Stryer L. *Biochemia*, Wydanie czwarte, PWN, Warszawa, s.546-551, 1997
33. Tsai Ch.-J., Chen Y.-L., Feng Ch.-H. *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with microwave-assisted derivatization for determining lipoic acid and its metabolites in human urine*, Journal of Chromatography A. 1310 (2013), s. 31-36
34. Uttamapinant Ch., Wjite K. A., Baruah H., Thompson S., Fernandez-Suarez M., Puthenveetil S., Ting A. Y. *A fluorophore ligase for site-specific protein labelling inside living cells*. PNAS 107 (2010), s. 10914-10919
35. Witek P., *Kwas alfa- lipoonowy i jego rola w leczeniu neuropatii cukrzycowej*, Ordynator Leków. 4, 9(35) (2004), s. 30-36
36. Witt W., Rustow B. *Determination of lipoic acid by precolumn derivatization with monobromobimane and reversed – phase high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography B., 705 (1998) 127-131
37. Wołyniec E., Karpińska J., Łosiewska S., Turkowicz M., Klimczuk J., Kojło A. *Determination of lipoic acid by flow-injection and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection* Talanta. 96 (2012), s. 223-229
38. Xu Chen Hao, Yang Guang, Lin Tong Yuan, Zhou Xia, Fan Guo Rong. *Concentration determination of lipoic acid in rat plasma by HPLC-MS/MS method and its toxokinetic study*. Pharmaceutical Care & Research., 15 (2015), s. 265-268

Pułapki ilościowego oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych

Streszczenie

Kwas liponowy (LA) jest jednym z najważniejszych endogennych utleniaczy pełniącym funkcje regulacyjne w szeregu procesów enzymatycznych. Badanie poziomu kwasu liponowego w próbkach biologicznych jest niezwykle istotne, gdyż pozwala na poznanie jego poziomu w stanach chorobowych, zaś oznaczanie zawartości kwasu liponowego w produktach spożywczych umożliwia wskazanie jego źródeł. Ilościowa analiza LA jest trudnym zadaniem analitycznym. Część cząsteczki kwasu liponowego nie posiada bowiem grup fluoroforowych bądź chromoforowych. Uniemożliwia to bezpośrednie wykorzystanie popularnych detektorów do analizy ilościowej tego związku. Problem ten można pokonać poprzez modyfikację chemiczną LA – wprowadzenie odpowiednich grup znacznikowych. Prezentowana praca dotyczy omówienia stosowanych w ilościowej analizie kwasu liponowego odczynników derywatyzujących. Podano również charakterystyki analityczne opracowanych procedur.

Słowa kluczowe: Kwas liponowy, reakcje derywatyzacji, analiza chromatograficzna, metody oznaczania

Pitfalls of quantitative determination of lipoic acid in biological samples

Abstract

Lipoic acid (LA) is one of the most important endogenous oxidants which plays a regulatory functions in a number of enzymatic processes. Due to its importance, examination of its level in biological samples allows to get knowledge about condition of organisms and presence of oxidative stress. A quantification of LA in food items indicates its nutritional sources. Quantitative analysis of LA is a difficult analytical task because the molecule of lipoic acid does not have any fluorophore or chromophore groups. This prevents direct use of popular detectors for quantitative analysis of this compound. This problem can be overcome by the chemical modifying of LA by the introduction of appropriate labeling groups. The present work concerns on the problems connected with quantification of LA. The elaborated procedures of derivatization LA are gathered and discussed.

Keywords: Lipoic acid, derivatization reactions, chromatographic analysis methods of determination

Ciecze jonowe – rozpuszczalniki XXI wieku

1. Wstęp

Ciecze jonowe są związkami chemicznymi składającymi się z jonów –organicznego kationu oraz nieorganicznego anionu o prostej budowie. Substancje te są zwykle cieczeniami w temperaturze nie przekraczającej 100°C. Od niedawna obserwuje się gwałtowny wzrost zainteresowania cieczeniami jonowymi, chociaż są one powszechnie znane od ponad 20 lat. Szczególne zainteresowanie tego rodzaju cieczeniami wynika z ich niezwykłych właściwości, które nie tylko wpływają na efektywność prowadzonych procesów – ciecze jonowe uważane są za „zielone związki”, czyli związki chemiczne, które są nieszkodliwe dla środowiska [1]. Możliwości wykorzystania cieczy jonowych są ogromne – poczynając od ich wykorzystania jako nowoczesnych rozpuszczalników w syntezach, analityce i technikach ekstrakcyjnych, po wykorzystanie w nanochemii, elektrochemii oraz inżynierii. Należy także zaznaczyć, że ciecze jonowe prawdopodobnie wyprą w przyszłości znacznie bardziej szkodliwe rozpuszczalniki organiczne. Niniejsza praca ma na celu przedstawienie możliwości wykorzystania cieczy jonowych jako potencjalnych zamienników powszechnie stosowanych rozpuszczalników organicznych. W pracy zostaną także przedstawione właściwości, możliwości modyfikacji oraz przykłady cieczy jonowych należących do poszczególnych klas tych substancji [2].

2. Ogólna charakterystyka cieczy jonowych

Termin „ciecze jonowe” obejmuje sole, które są cieczeniami we względnie niskich temperaturach, często już w temperaturze pokojowej, przy czym niektóre z cieczy jonowych zachowują swój ciekły stan skupienia w zakresie temperatur od -80°C do 400°C [3]. W ogólnym ujęciu, cieczą jonową jest sól, która topi się w znacznie niższych temperaturach niż powszechnie znane sole [4]. Duża stabilność termiczna oraz odporność na zmiany warunków prowadzenia procesu, zapobiegają zachodzeniu niepożądanych reakcji. Pierwsza ciecz jonowa – azotan etyloamoniowy, została otrzymana

¹ anika.szady@gmail.com, Zakład Technologii Chemicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie, www.umcs.pl

² sylwia.pasieczna@poczta.umcs.lublin.pl, Zakład Technologii Chemicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie – Skłodowskiej, www.umcs.pl

w roku 1914, przez P. Waldena w wyniku reakcji etyloaminy ze stężonym kwasem azotowym. Azotan etyloamoniowy nie był jednak wykorzystywany na dużą skalę [5]. Pierwszymi stosowanymi na skalę przemysłową cieczami jonowymi były sole pirydyniowe zawierające w swojej budowie aniony AlCl_4^- . Okazało się jednak, iż pierwsze ciecze jonowe posiadały szczególną wadę – związki te łatwo hydrolizowały, co wykluczało ich praktyczne zastosowanie [3]. Na krótki okres czasu, w latach 70. wzrosło zainteresowanie cieczami jonowymi, ze względu na możliwość ich zastosowania w produkcji baterii głowic jądrowych. Zainteresowanie tymi substancjami pojawiło się ponownie w pierwszej połowie lat 90., gdy zaczęto rozważać zastosowanie cieczy jonowych jako ekologicznych zamienników powszechnie wykorzystywanych, szkodliwych dla środowiska rozpuszczalników organicznych [6].

Właściwości obecnie stosowanych cieczy jonowych różnią się znacznie od poznanych do tej pory związków chemicznych, gdyż pomimo ciekłego stanu skupienia, nie są one stopionymi solami [2]. Zdolność rozpuszczania substancji przez ciecze jonowe zależy od wchodzących w ich skład kationów i anionów – mogą one rozpuszczać różnorodne substancje, tj.: enzymy, polimery, związki o charakterze organicznym jak i nieorganicznym [5].

W przeciwieństwie do popularnych soli nieorganicznych, ciecze jonowe są znacznie mniej uporządkowane, na co bezpośredni wpływ ma obecność asymetrycznego kationu organicznego. Skutkiem asymetrycznej budowy kationu organicznego jest ciekły stan skupienia w niskich temperaturach. Szereg zalet cieczy jonowych spowodowanych jest ich występowaniem w ciekłym stanie skupienia w stosunkowo niskich temperaturach, bez konieczności użycia dodatkowego rozpuszczalnika [7]. Ciecze jonowe są nietłoczne, nie wydzielają toksycznych oparów, są niepalne. Powyższe właściwości pozwalają na zaliczenie cieczy jonowych do grupy „zielonych rozpuszczalników” („*green solvents*”) czyli związków spełniających wymagania zielonej chemii [2]. Wprowadzenie do użytku substancji spełniających warunki zielonej chemii, pozwala na eliminację bądź znaczne ograniczenie niebezpiecznych związków chemicznych. Postępowanie takie pośrednio wpływa na standard życia społeczeństwa oraz stan środowiska. Najpowszechniejszym do tej pory ekologicznym rozpuszczalnikami jest woda, a także ditlenek węgla w stanie nadkrytycznym. Substancje te nie są jednak uniwersalnymi rozpuszczalnikami, stąd też od dawna istniała konieczność poszukiwania innych, spełniających wymogi zielonej chemii rozpuszczalników [8].

3. Specyficzne właściwości cieczy jonowych

Właściwości cieczy jonowych wynikają z budowy anionu i kationu. Ilość możliwych kombinacji kation-anion wynosi 10^{18} i wraz z rozwojem nauki, liczba ta stale wzrasta, w związku z tym właściwości cieczy jonowych mogą być bardzo zróżnicowane [5]. Ciecze jonowe są często nazywane związkami projektowanymi, gdyż ich właściwościami fizyko-chemicznymi można sterować poprzez dobór odpowiednich jonów. Właściwości cieczy jonowych można także zmieniać poprzez odpowiedni dodatek modyfikatora, którym może być inna ciecz jonowa bądź rozpuszczalnik molekularny [4].

3.1. Gęstość i lepkość

Cechą zwykle obowiązującą wszystkie substancje należące do kategorii cieczy jonowych jest znacznie większa gęstość oraz lepkość od wody – w związku z tym ograniczona jest dyfuzja rozpuszczonych w nich analitów. Ograniczenie te można wyeliminować poprzez zastosowanie modyfikacji kationu bądź anionu. Wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego jonu organicznego, a więc wraz ze wzrostem hydrofobowości cieczy jonowej, wzrasta także toksyczność związku względem mikroorganizmów [5]. Lepkość stosowanych cieczy jonowych mieści się w przedziale od 10 do 1100 mPa·s i z reguły przekracza lepkość powszechnie wykorzystywanych rozpuszczalników organicznych. Na lepkość tych związków w dużej mierze wpływa obecność zanieczyszczeń, takich jak np.: nieprze-reagowane reagenty, sole, woda [9]. Nie zauważono istotnej korelacji pomiędzy budową, a lepkością cieczy jonowych, stwierdzono natomiast, iż największy wpływ na lepkość tych związków wywiera temperatura. Wzrost temperatury prowadzi do wzrostu energii kinetycznej cząsteczek i zmniejszenia lepkości, co poprawia zdolność rozpuszczania substancji przez ciecze jonowe [7]. Gęstość cieczy jonowych mieści się w przedziale 0,9-2,5 g/cm³, zależy głównie od struktury kationu i anionu. Wzrost temperatury przyczynia się do zmniejszenia gęstości, jednak jest on znacznie mniejszy niż w przypadku lepkości [9].

3.2. Nielotność i odporność termiczna

Nielotność cieczy jonowych w połączeniu z odpornością na wysokie temperatury umożliwia wykorzystanie tych związków w procesach cechujących się koniecznością utrzymywania wysokiej temperatury. Ciecze jonowe nie odparowują stąd też nie pojawiają się problemy związane z utratą rozpuszczalnika, ponadto nie dochodzi do emisji toksycznych par tak jak w przypadku stosowania rozpuszczalników organicznych. Często ciecze jonowe są stabilne do temperatury ok. 400°C [3]. Duża stabilność

termiczna pozwala na prowadzenie reakcji w różnych warunkach, bez ryzyka utraty reagentów bądź powstawania produktów ubocznych. Wadą może być utlenianie się anionów organicznych w obecności tlenu atmosferycznego bądź innych substancji utleniających [5]. Stabilność termiczna cieczy jonowych może zostać zaburzona pod wpływem obecności zanieczyszczeń, których obecność jest często niemonitorowana. Cechą większości cieczy jonowych jest wyjątkowo niska prężność par. Pozwala to na usuwanie zawartych w nich zanieczyszczeń poprzez ogrzewanie w próżni. W przeciwieństwie do klasycznych rozpuszczalników, nie można jednak oczyścić cieczy jonowych poprzez destylację [10].

3.3. Właściwości biologiczne

Wraz ze wzrostem długości łańcucha alkilowego części organicznej, a więc wraz ze wzrostem jego hydrofobowości, wzrasta toksyczność związku względem mikroorganizmów. Badania wykazują, że ciecze jonowe mają znacznie większą aktywność biologiczną wobec drobnoustrojów niż konwencjonalne rozpuszczalniki organiczne. Obecność czwartorzędowych kationów amoniowych bądź kationów pirydynowych powoduje zahamowanie rozwoju mikroorganizmów, przy czym aktywność biologiczna jest uzależniona od długości łańcucha węglowego będącego w bezpośrednim kontakcie z naładowanym atomem fosforu bądź azotu. Największą aktywność wykazują ciecze jonowe zawierające w swojej budowie od 10 do 14 atomów węgla. Zarówno mniejsza liczba atomów węgla jak i dalszy wzrost łańcucha węglowego powoduje spadek aktywności biologicznej [5]. Oprócz aktywności wobec bakterii i grzybów, ciecze jonowe posiadają również zdolność konserwowania tkanek roślinnych i zwierzęcych [2].

3.4. Polarność

Polarność cieczy jonowych jest zbliżona do alkoholi o krótkich łańcuchach węglowych bądź innych rozpuszczalników aprotonowych, np.: DMSO, DMF. Należy zaznaczyć fakt, że typowe ciecze jonowe cechują się znacznie większą polarnością niż większość znanych rozpuszczalników organicznych [3]. Polarność tych związków zależy od rodzaju kationu i anionu, dlatego też poprzez ich odpowiedni dobór można sterować polarnością. Wzrost długości łańcucha alkilowego powoduje wzrost charakteru hydrofobowego i utrudnia rozpuszczalność cieczy jonowych w rozpuszczalnikach polarnych [9]. Dowiedziono także, iż hydrofobowość tych związków można kontrolować w prosty i skuteczny sposób poprzez dobór anionu. Naukowcy zajmujący się badaniem właściwości cieczy jonowych dowiedli, że obecność anionów tetrafluoroboranowych, heksafluorofosforanowych oraz bis(trifluorometylosulfonylo)imidkowych powo-

duże zwiększenie hydrofobowości związku, a obecność anionu mrówczanowego, octanowego bądź azotanowego (V) zapewnia dobrą rozpuszczalność cieczy jonowej w wodzie, czyli zmniejsza ich hydrofobowość [4].

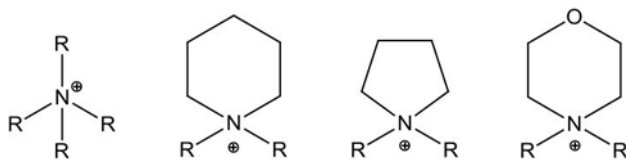
4. Typy wykorzystywanych cieczy jonowych

Ciecze jonowe można podzielić na dwie grupy związków:

- proste ciecze jonowe – zawierające w swoim składzie jedynie kationy i aniony;
- złożone ciecze jonowe – składające się z mieszanin innych cieczy jonowych [2].

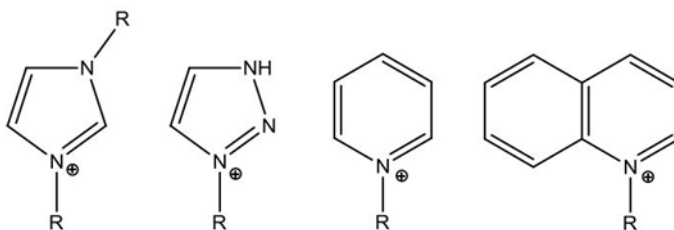
Inny podział cieczy jonowych opiera się na hybrydyzacji atomu azotu:

- ciecze jonowe zawierające atom azotu o hybrydyzacji sp^3 – struktura cząsteczki kationu w okolicy ładunku przyjmuje kształt tetraedru (rys.1);
- ciecze jonowe zawierające atom azotu o hybrydyzacji sp^2 – struktura cząsteczki w okolicy ładunku jest płaska (rys.2).



Kation tetraalkiloamoniowy piperydyniowy pirolidyniowy morfoliniowy

Rysunek 1. Przykłady kationów cieczy jonowych o hybrydyzacji sp^3 [9]



Kation imidazoliowy 1,2,3-triazoliowy pirydyniowy chinoliniowy

Rysunek 2. Przykłady kationów cieczy jonowych o hybrydyzacji sp^2 [9]

Ze względu na symetrię kationu można także dokonać podziału na symetryczne i asymetryczne ciecze jonowe, podwójne (zawierające dwa centra ładunku w obrębie cząsteczki), potrójne (zawierające trzy centra ładunku w obrębie cząsteczki) oraz chiralne [7]. Niektórzy wyodrębniają także podział cieczy jonowych na protonowe oraz aprotonowe. Ciecze

jonowe protonowe (PILs – *protic ionic liquids*) cechują się, w przeciwieństwie do cieczy jonowych aprotonowych (AILs – *aprotic ionic liquids*), występowaniem atomu bądź atomów wodoru połączonych z atomem centralnym [11].

Na początku XXI wieku zaproponowano podział cieczy jonowych na trzy generacje. Do pierwszej generacji cieczy jonowych należy zaliczyć związki, które są wykorzystywane jako rozpuszczalniki, a ich właściwości zależą zarówno od kationu jak i od anionu. Do tej grupy związków należy m.in.: bis(trifluorometylosulfonylo)imidek. 3-butylo-1-metyloimidazoliowy, który ze względu na właściwości kationu cechuje się niską temperaturą topnienia, a ze względu na obecność anionu – wysoką hydrofobowością oraz niską lepkością [7]. W klasyfikacji cieczy jonowych drugiej generacji oprócz właściwości fizycznych brane są pod uwagę ich właściwości chemiczne. Oprócz parametrów takich jak: temperatura topnienia, stabilność termiczna, przewodnictwo, hydrofobowość, dochodzą dodatkowe właściwości, m.in.: reaktywność chemiczna, chiralność, blokowanie promieni UV, korzystny bilans tlenowy, palność, zdolność solwatacji [9]. Jednym z przykładów cieczy jonowych zaliczanych do drugiej generacji jest bis(trifluorometylosulfonylo)imidek-3-(1-metylooctanetylu)-1-metyloimidazoliowy, którego anion wpływa na hydrofobowość oraz względnie niską lepkość, a kation wpływa na indukcję chiralną. Do trzeciej generacji cieczy jonowych należy zaliczyć związki, które poza cechami charakterystycznymi dla pierwszej i drugiej generacji wykazują także aktywność biologiczną [7].

5. Ciecze jonowych – zamienniki konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych

Powszechnie stosowane rozpuszczalniki organiczne wykazują negatywny wpływ na środowisko i człowieka, dlatego od dawna poszukuje się ekologicznych, „zielonych” zamienników. Jednym z nich są właśnie ciecze jonowe. Obecnie, największą grupę zamienników organicznych rozpuszczalników organicznych stanowią estry, aczkolwiek znajdują one dosyć ograniczone zastosowanie [12]. Poza estrami wykorzystuje się także węglany alkoholi polihydroksylowych, ciecze w stanie nadkrytycznym oraz wodę w odpowiednich warunkach ciśnienia i temperatury [8].

W latach 80. ubiegłego wieku istniało zaledwie kilka patentów dotyczących wykorzystania cieczy jonowych. Pierwszą funkcją cieczy jonowych było zastępowanie lotnych rozpuszczalników organicznych, które wykazują negatywny wpływ na środowisko. Od początku XXI wieku, liczba możliwych funkcji cieczy jonowych wzrosła do tysiąca [2].

Wykorzystaniu cieczy jonowych jako rozpuszczalników niewątpliwie sprzyja fakt, iż posiadają one zdolność rozpuszczania zarówno związków nieorganicznych jak i organicznych. Ciecze jonowe są używane w syntezach, które wymagają zastosowania rozpuszczalnika posiadającego zdolność rozpuszczania katalizatorów – niejednokrotnie są to związki nieorganiczne bądź metaloorganiczne. Jednym z pierwszych zastosowań cieczy jonowych było wykorzystanie ich jako rozpuszczalników w procesach polimeryzacji z przeniesieniem atomu (ATRP – *Atom Transfer Radical Polymerization*). Katalizatorem stosowanym w ATRP są sole metali przejściowych, które w stopniu bardzo ograniczonym rozpuszczają się w konwencjonalnych rozpuszczalnikach organicznych. Oprócz zdolności rozpuszczania katalizatorów, stosowanie cieczy jonowych w chemii polimerów wnosi dodatkowe korzyści, np. ograniczenie udziału reakcji terminacji [3]. Znane są przypadki wykorzystywania cieczy jonowych jako rozpuszczalników metali, związków polimerowych, fullerenów. Należy spodziewać się, że w przyszłości ciecze jonowe ze względu na swoją zdolność rozpuszczania znajdą zastosowanie w oczyszczaniu ścieków [5]. Właściwości biologiczne umożliwiają zastosowanie cieczy jonowych w przetwórstwie biomasy, gdyż mają one zdolność rozpuszczania celulozy, chityny oraz skrobi. Powyższe cechy umożliwiają uzyskiwanie różnego rodzaju kompozytów, których głównym składnikiem jest celuloza [9]. Ciecze jonowe, jako rozpuszczalniki substancji nieorganicznych i metaloorganicznych, zaczyna już wykorzystywać przemysł farmaceutyczny. Związki nieorganiczne, pełniące w ludzkim organizmie funkcje lecznicze, często wykazują różną rozpuszczalność w zależności od polarności środowiska, w którym się znajdują, co w dużej mierze ogranicza ich zastosowanie. Wykorzystanie cieczy jonowych zwiększa rozpuszczalność substancji leczniczych i zwiększa ilość wchłanianej dawki. Ciecze jonowe mogą także pochłaniać zanieczyszczenia oraz nośniki leków, jednak ze względu na brak badań klinicznych nie są one powszechnie wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym [13]. Jednym z potencjalnych zastosowań cieczy jonowych jest wykorzystanie ich jako elektrolitów nowej generacji, które znalazłyby wykorzystanie w postaci baterii, kondensatorów, sensorów elektrochemicznych, ogniw słonecznych. W wymienionych przypadkach ciecze jonowe są wykorzystywane jako rozpuszczalniki dla soli litu bądź jako plastyfikatory dla materiałów polieterowych [14]. Związki te znalazły zastosowanie jako rozpuszczalniki ekstrahujące, m.in. do oczyszczenia oleju napędowego ze związków siarki, bądź barwników spożywczych z metali ciężkich [9].

Ze względu na niską lotność, stabilność termiczną oraz możliwość uzyskania różnych polarności cieczy jonowych, uważa się, że substancje te znajdą wykorzystanie w chromatografii, jako dodatek do faz ruchomych.

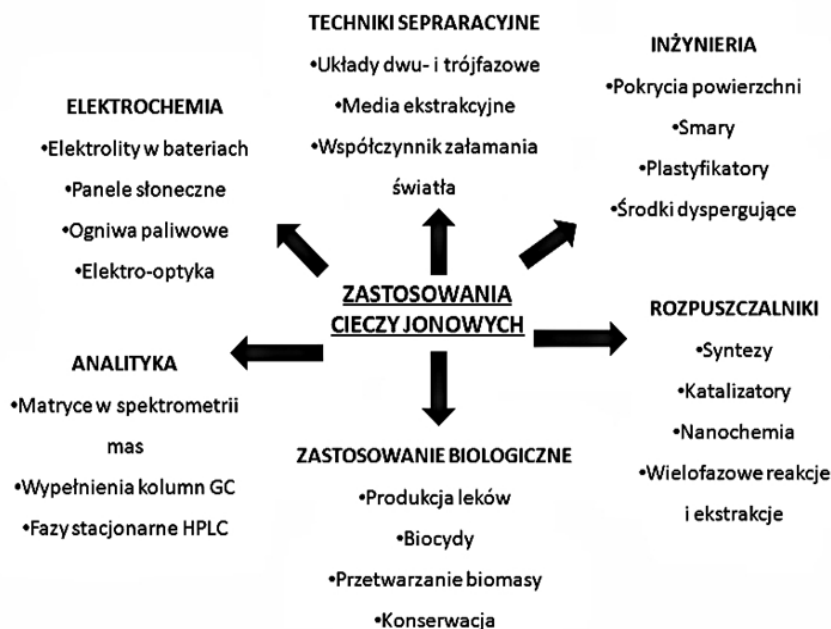
Przykładem takiego związku jest tetrafluoroboran imidazoliowy, który stanowi dodatek do faz ruchomych chromatografii cienkowarstwowej [7].

W wielu syntezach organicznych, wymogiem koniecznym jest zastosowanie rozpuszczalnika posiadającego zdolność transportu ładunku – takie wymagania spełniają ciecze jonowe. Okazuje się, że elektrochemiczna polimeryzacja tiofenu bądź pirolu w cieczach jonowych pozwala na uzyskanie polimerów przewodzących [3]. Ponadto, zastosowanie cieczy jonowych w syntezach czy też w analityce, nie wymaga skomplikowanej aparatury, a reakcje przebiegają znacznie szybciej niż z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych [2].

6. Możliwości oraz zagrożenia stosowania cieczy jonowych

Zastosowanie cieczy jonowych zależy w ścisły sposób od właściwości kationu i anionu tworzącego daną ciecz jonową. Należy zauważyć, że ciecze jonowe są nie tylko doskonałymi zamiennikami konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych – substancje te znajdują zastosowanie także na wielu innych płaszczyznach nauki i techniki [14]. Ciecze jonowe można także wykorzystać w procesie elektrochemicznego wydzielania metali oraz syntezie nanocząstek. Związki o charakterze cieczy jonowych można również z powodzeniem wykorzystywać w chromatografii – lecz nie tylko jako składników faz ruchomych, a także jako fazy stacjonarne. Zastosowanie tych związków jako faz stacjonarnych wynika z ich wysokiej lepkości, niskiej lotności oraz zróżnicowanej polarności. Przykładem takiego związku jest heksafluorofosforan 3-butylo-1-metyloimidazoliowy, który ma charakter polarny, a więc retencji na nim ulegają anality o wysokiej polarności [7].

Ciecze jonowe mogą także zostać wykorzystane jako katalizatory. Dodatkową zaletą tych związków, oprócz właściwości katalitycznych, jest ich wysoka rozpuszczalność i nietoksyczność. Związki te można wykorzystywać jako katalizatory w reakcjach takich jak: Diosa-Aldera, Friedla-Craftsa, sprzęganie Hecka oraz wielu innych [9]. Przyszłościowym wykorzystaniem cieczy jonowych, zważywszy na właściwości biologiczne tych związków, jest zastosowanie ich w preparatach o właściwościach dezynfekujących i sterylizujących, gdyż ciecze jonowe posiadające łańcuch węglowy o minimum 8 atomach węgla wykazują aktywność wobec grzybów i bakterii [7]. Z powodzeniem można także wykorzystywać te związki jako środki konserwujące oraz zabezpieczające tkanki biologiczne [9].



Rysunek 3. Możliwości zastosowania cieczy jonowych [2]

Do wad cieczy jonowych należy zaliczyć dość wysoką cenę produktu oraz możliwe działanie toksyczne na organizmy wodne. Toksyczność cieczy jonowych jest w wielu przypadkach pożądana (działanie bakterio-bójcze, grzybobójcze), aczkolwiek pojawiają się również eksperymenty potwierdzające niekorzystny wpływ tych związków na kręgowce. Należy zaznaczyć, iż mimo wszystko, negatywny wpływ tych związków jest znacznie mniejszy niż rozpuszczalników organicznych i zależy w dużej mierze od rodzaju jonów wchodzących w skład danej substancji. Inną niedogodnością może być ich bardzo niska prężność par, co oznacza, że rozpuszczalniki te praktycznie nie dostają się do atmosfery. Cecha ta stanowi dużą zaletę, gdyż nie dochodzi do przedostawania się toksycznych par poza układ. Z drugiej strony, pozostaje problem odpadów, które trzeba w odpowiedni sposób przetwarzać. Coraz częściej proponuje się jednak modyfikacje cieczy jonowych, które umożliwiają ich biodegradację [10].

7. Podsumowanie

Ciecze jonowe od wielu lat są podmiotem badań wielu naukowców. Zainteresowanie tymi substancjami wynika z ich interesujących właściwości fizykochemicznych i biologicznych, które odróżniają je od innych, poznanych do tej pory rozpuszczalników organicznych. Do zalet należy

zaliczyć wyjątkowo niską prężność par, nielotność, niską toksyczność, możliwość odzysku cieczy jonowe z roztworu poreakcyjnego. Wymienione cechy sprawiają, że ciecze jonowe stają się doskonałymi rozpuszczalnikami, aczkolwiek ich zastosowanie jest znacznie większe. Ze względu na innowacyjny charakter tych związków, należy mieć na uwadze możliwe wady cieczy jonowych, a w badaniach ukierunkowywać się nie tylko na poszukiwanie nowych możliwości wykorzystania cieczy jonowych, lecz także na możliwe działania niepożądane.

Literatura:

1. Kałdoński T., Kałdoński T.J., Piecek W. *Identifying of thermotropic liquid crystal phase and its influence on lubricity of ionic liquids*, Journal of Kones Powertrain and Transprot, V.22 NR 1 (2015)
2. <http://laboratoria.net/artukul/14543.html> (04.06.2016)
3. Kubisa P. *Perspektywy zastosowań cieczy jonowych w chemii polimerów*, Polimery, V.51 NR 7-8 (2006)
4. Marczevska-Boczkowska K. *Właściwości i zastosowanie cieczy jonowych w syntezie nieorganicznych nanomateriałów*, Inżynieria materiałowa, 6 (2010)
5. Bittner B. *Układy katalityczne na bazie pirydyniowych cieczy jonowych i kwasów Lewisa – zastosowanie w wybranych procesach cykloaddycji*, praca doktorska. Instytut Technologii Chemicznej Organicznej, Szczecin 2012
6. Johnson K. *What's an Ionic Liquid*, The Electrochemical Society Interface, (2007)
7. Markiewicz R. *Cykloheksyloamoniowe i 1-metylopiperydyniowe ciecze jonowe*, praca doktorska. Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Poznań 2013
8. Paryjczak T. *Promowanie zrównoważonego rozwoju przez zieloną chemię*, Problemy ekorozwoju, V.3 NR 1 (2008)
9. Niemczak M. *Synteza i właściwości dwufunkcyjnych herbicydowych cieczy jonowych*, praca doktorska. Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Poznań 2015
10. Robin D., Kenneth R. *Green Industrial Applications of Ionic Liquids*. NATO Science Series (2008)
11. Dominguez P. *Ionic Liquids in Biotransformations and Organocatalysis, Solvents and Beyond*. Wiley Inc. Publication, Canada (2012)
12. Freemantle M. *Introduction to Ionic Liquids*, RSC publications, Cambridge, UK (2009)
13. Shamshina J. *Develop ionic liquid drugs*, Nature, V.528 (2015)
14. Armand M., Trascon J. *Building better batteries*, Nature, V.451 (2008)

Ciecze jonowe – rozpuszczalniki XXI wieku

Streszczenie

Stosowanie rozpuszczalników organicznych, przyczyniło się do wzrostu poziomu zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Rozpuszczalniki organiczne, poza znaczną toksycznością, charakteryzują się zdolnością do migrowania na znaczne odległości i powodowania skażeń na ogromne obszary. Wymienione cechy konwencjonalnych rozpuszczalników zmusiły naukowców do poszukiwania ekologicznych, „zielonych” rozpuszczalników, cechujących się dużą stabilnością, niską lotnością, a przede wszystkim możliwością wielokrotnego wykorzystania. Jednym z takich rozpuszczalników są tzw. ciecze jonowe, czyli sole zawierające kation organiczny oraz anion – najczęściej nieorganiczny.

Głównym celem niniejszej pracy jest przedstawienie możliwości zastosowania cieczy jonowych jako zamiennika powszechnie stosowanych rozpuszczalników organicznych. Substancje te, znajdują zastosowanie również w innych dziedzinach nauki, takich jak: techniki separacyjne, elektrochemia, inżynieria, analityka, farmacja.

Szczególnymi właściwościami cieczy jonowych są m.in.: zdolność rozpuszczania związków nieorganicznych (włącznie z niektórymi minerałami oraz węglem) jak i organicznych. Rozpuszczalniki te są również stabilne termicznie oraz nielotne, co chroni przed emisją toksycznych gazów do atmosfery. Niezwykłe właściwości tych związków sprawiają, że ciecze jonowe powoli wypierają z powszechnego zastosowania zwykłe, konwencjonalne rozpuszczalniki organiczne.

Słowa kluczowe: ciecze jonowe, rozpuszczalniki, zielona chemia

Ionic liquids – solvents for 21st century

Using organic solvents on a massive scale, has contributed to environmental pollution. Organic solvents are characterized by migration ability, causing contamination of large areas, not to mention the fact that organic solvents are extremely toxic. These features of conventional solvents forced scientists to search for ecological, "green" solvents, which are characterized by high stability, low volatility, and possibility of re-use. One of them is so called "ionic liquid" – chemical reagent consisted of organic and inorganic part.

The principal purpose of the presentation is to provide possibilities of using ionic liquids as a replacement for commonly used organic solvents. These substances are variously called ionic melts, ionic fluids or ionic salts. Ionic liquids have many potential applications, except for being a replacement for organic solvents. They are electrically conducting fluids and have been considered as sealants because of their low vapour pressure. These substances also find use in separation techniques, electrochemical engineering, analytics and pharmacy. Ionic liquids are thermally stable and non-volatile, which prevent emission of toxic gases into the atmosphere. Extraordinary properties of these compounds, make ionic liquids slowly displace the widespread use of ordinary, conventional organic solvents.

keywords: ionic liquids, solvents, green chemistry

Optymalizacja warunków pracy pasa zębatego ze względu na parametry fizyczne elementu podatnego napinacza

1. Wstęp

Projekt układu przeniesienia napędu mechanizmów napędzanych pasem zębatym wiąże się z koniecznością rozpatrzenia problemu napięcia pasa w celu prawidłowej pracy układu. Odpowiednie napięcie jest niezbędne do zachowania zdolności przenoszenia siły przez pas oraz utrzymania przez niego zadanej trajektorii. Zbyt silne napięcie spowoduje zerwanie, a zbyt słabe spadnięcie pasa zębatego z kół zębatych, co w obu przypadkach kończy się uszkodzeniem mechanizmu. Należy znaleźć rozwiązanie optymalne. W celu zapewnienia prawidłowej pracy układu przeniesienia napędu stosuje się m.in. napinacze pasów [1].

Praca wykonana została na podstawie układu przeniesienia napędu hamowni podwozowej skonstruowanej przez studentów Studenckiego Koła Aerodynamiki Pojazdów, jednak jej uniwersalność pozwala na adaptację rozwiązania do każdej innej konstrukcji z pasowym układem przeniesienia napędu.

2. Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest optymalizacja warunków pracy pasa zębatego ze względu na parametry fizyczne elementu podatnego, tj. sprężyny, w napinaczu własnej konstrukcji. Wyniki pracy zostaną uwzględnione w projekcie koncepcyjnym napinacza oraz w dalszym projektowaniu układu przeniesienia napędu, co zapewni jego prawidłową i bezpieczną pracę.

3. Materiały i metody

3.1. Proces optymalizacji

Poszukiwania rozwiązania postawionego problemu należy zacząć od przedstawienia istoty optymalizacji. Proces ten polega na znalezieniu

¹ jakub.rupniewski@gmail.com, Studenckie Koło Aerodynamiki Pojazdów, Wydział Mechaniczny Energetyki i Lotnictwa, Politechnika Warszawska, www.skap.meil.pw.edu.pl

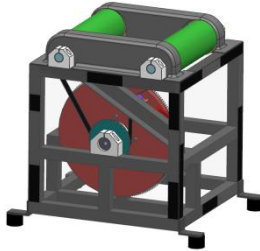
najlepszego rozwiązania ze względu na przyjęte kryterium, gdy dla określonego zbioru zmiennych decyzyjnych zdefiniowana funkcja celu osiąga ekstremum z uwzględnieniem ograniczeń obszarowych i funkcjonalnych. Fundamentem optymalizacji jest model matematyczny badanego układu, który to otrzymamy po przedstawieniu modelu fizycznego [2].

3.2. Model fizyczny

Model fizyczny jest uproszczeniem układu rzeczywistego. Bardzo uproszczony model fizyczny może pomijać istotne cechy układu rzeczywistego, a zbyt dokładny prowadzi do znacznych trudności matematycznych i ekonomicznych związanych z długim czasem obliczeń [3].

3.2.1. Geometria badanego układu

Układ jest częścią hamowni podwoziowej do badania parametrów pracy układu napędowego pojazdów małej mocy (rys. 1). Trajektoria pasa zębatego ograniczona jest cechami geometrycznymi tej konstrukcji takimi jak pozycje kół pasowych rolek, koła zamachowego oraz umiejscowieniem napinacza. Schemat trajektorii przedstawiony jest na rys. 2.

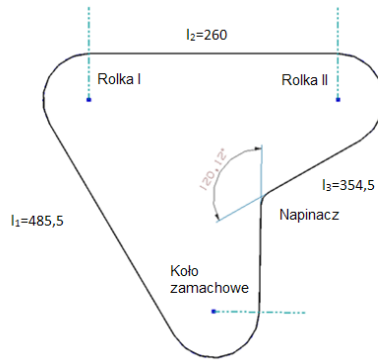


Rysunek 1. Projekt hamowni podwoziowej [źródło własne]

Długość pasa dobrana przez konstruktora wynosi $l_0 = 1100 \text{ mm}$. Kierunek pracy pasa zębatego jest zgodny z kierunkiem ruchu wskazówek zegara. Pas został podzielony na 3 części, których długość wynosi odpowiednio

$l_1 = 485,5 \text{ mm}$, $l_2 = 260 \text{ mm}$, $l_3 = 354,5 \text{ mm}$, a kąt rozwarcia pasa nad napinaczem $\alpha = 120,12^\circ$. Zachodzi zależność:

$$l_0 = l_1 + l_2 + l_3 = 1100 \text{ mm} \quad (1)$$



Rysunek 2. Schemat trajektorii pasa zębatego [źródło własne]

3.2.2. Model fizyczny pasa zębatego

W modelu fizycznym przyjęto założenia, że pas jest doskonale sprężystym, nieważkim ciałem podlegającym prawu Hooke'a, a wymiar poprzeczny jest pomijalny. Pas uproszczony jest do krzywej o długości początkowej $l_0 = 1100 \text{ mm}$ (rys. 2). Odległości między rolkami i kołem zamachowym nie ulegają zmianie. Siła na pasku jest nieciągła w granicznych punktach styku z kołem pasowym i przyjmuje na całej długości styku z kołem stałą wartość równą sile przenoszonej przez pas w rozpatrywanej części. Pas przenosi tylko obciążenie rozciągające. Wystąpienie sił ściskających uznane jest jako spadnięcie.

Pas podzielony został na trzy części (rys. 2). Na każdej z części obciążenie pasa jest niezmienne na całej długości. Podział został dokonany uwzględniając kierunek ruchu pasa zgodnie ze wskazówkami zegara zakładając, że wszystkie zęby koła pasowego będące w geometrycznym zetknięciu z zębami pasa biorą udział w przenoszeniu siły.

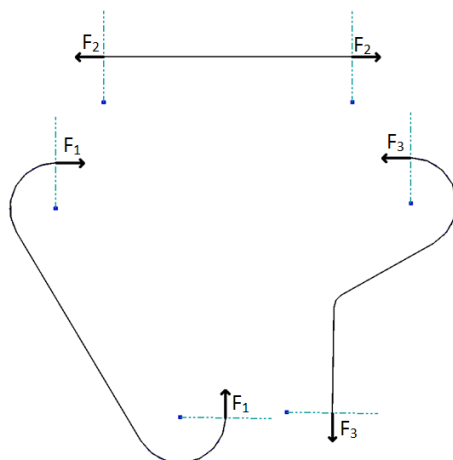
Podczas pracy, w pasie występują siły dynamiczne F_{dyn} spowodowane przyspieszaniem układu oraz siła napięcia F_n spowodowana wydłużeniem pasa do kształtu wymuszonego przez koła pasowe oraz napinacz (rys. 3). Suma tych dwóch sił jest siłą przenoszoną przez pas.

$$F_1 = F_{1dyn} + F_n$$

$$F_2 = F_{2dyn} + F_n \tag{2}$$

$$F_3 = F_{3dyn} + F_n$$

gdzie: F_i – siła przenoszona na i-tym kawałku pasa zębatego.



Rysunek 3. Schemat pasa zębatego [źródło własne]

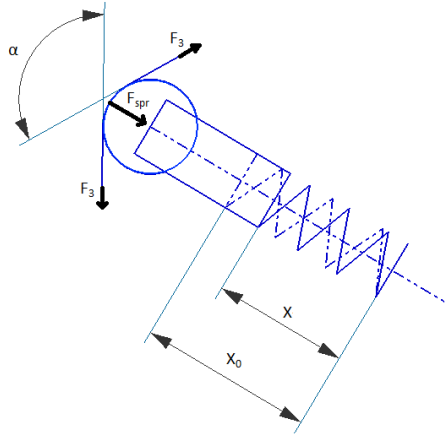
Pas przenosi siłę powodującą obrót rolki I, rolki II oraz koła zamachowego (rys. 2). Koła pasowe są identyczne, zatem przełożenie wynosi $i = 1$. Obracające się elementy przyspieszać będą z jednakowym przyspieszeniem kątowym ε . Wartość siły dynamicznej przenoszonej przez pas zależy od wartości momentu bezwładności ciał, które napędzane są za pomocą pasa. Gdy układ napędzany jest tylko rolką I pas przenosi siłę niezbędną do napędzenia koła zamachowego oraz rolki II, na pasie w części II nie występuje siła dynamiczna $F_{2dyn} = 0$. Gdy układ napędzany jest tylko rolką II, siła dynamiczna $F_{3dyn} = 0$. Gdy układ napędzany jest za pomocą obu rolek, siła przenoszona przez pas napędza tylko koło zamachowe, a ponieważ pas przenosi tylko siły rozciągające nie występuje wtedy siła dynamiczna w części III $F_{3dyn} = 0$. Wartości momentu bezwładności rolki oraz koła zamachowego obliczonych na podstawie modelu CAD projektu hamowni podwoziowej wynoszą:

$$I_r = 14532,74 \text{ kg} \cdot \text{mm}^2 \quad (3)$$

$$I_{kz} = 164792,2 \text{ kg} \cdot \text{mm}^2$$

3.2.3. Model fizyczny napinacza

Napinacz przenosi siłę F_{spr} powstałą na ugiętej sprężynie dla układu nieobciążonego siłą dynamiczną o $\Delta x = X - X_0$ podlegając prawu Hooke'a, która oparta jest na nieruchomej obudowie (rys. 4). Rolka napinacza oparta jest na pasie zębatym powodując jego obciążenie siłą F_3 .



Rysunek 4. Schemat napinacza [źródło własne]

3.3. Model matematyczny

Na podstawie modelu fizycznego został zbudowany model matematyczny układu. Uwzględnia on zależności matematyczne, jakie występują w elementach o właściwościach określonych przez model fizyczny.

3.3.1. Model matematyczny pasa zębatego

Każda z części pasa rozciągana jest siłą F_i . Zgodnie z prawem Hooke'a siła ta powoduje odkształcenie proporcjonalne do przyłożonej siły oraz odwrotnie proporcjonalne do sztywności pasa. Sztywność paska K w jednostce długości dobrego pasa Optibelt ALPHA TORQUE T10-ST odczytana z karty danych technicznych produktu wynosi $K = 538889 \text{ N} \cdot \frac{\text{mm}}{\text{mm}}$.

Otrzymujemy zależność:

$$F_i = \frac{K}{l_i} \cdot \Delta l_i \quad i = 1,2,3 \quad (4)$$

gdzie: F_i – siła przenoszona na i-tej części pasa, l_i – długość i-tej części, Δl_i – zmiana długości i-tej części pasa.

Suma zmian długości Δl_i każdej części pasa jest zmianą długości Δl całej długości pasa:

$$\sum_{i=1}^3 \Delta l_i = \Delta l = l - l_0 \quad (5)$$

gdzie: l – aktualna długość pasa, l_0 – długość pasa w spoczynku i dla badanego układu $l_0 = 1100 \text{ mm}$.

Z zależności (2), (4) i (5) otrzymamy:

$$l_0 - l + \frac{l}{k} \cdot F_n + F_{1dyn} \cdot \frac{l_1}{k} + F_{2dyn} \cdot \frac{l_2}{k} + F_{3dyn} \cdot \frac{l_3}{k} = 0 \quad (6)$$

3.3.2. Model matematyczny napinacza

Sprężyna napinacza jest ściskana, co spowodowane jest siłą nacisku na sprężynę. Zgodnie z prawem Hooke'a zachodzi zależność:

$$F_{spr} = k \cdot \Delta x \quad (7)$$

Dla pasa nieodkształconego $\Delta l = 0$:

$$\Delta x = (X_0 - X) \quad (8)$$

Podstawiając (8) do (7):

$$F_{spr} = k \cdot (X_0 - X) \quad (9)$$

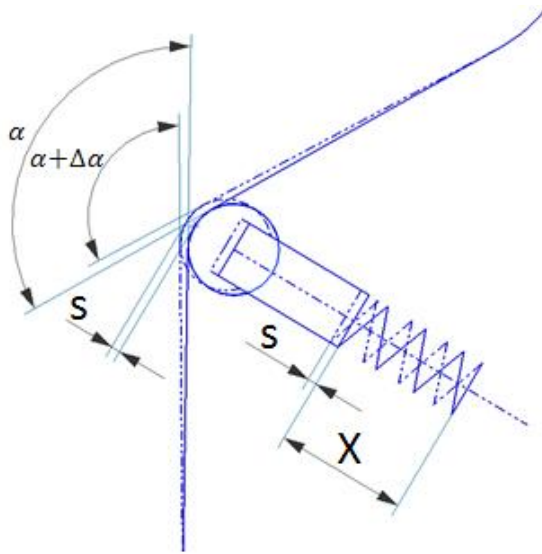
gdzie: F_{spr} – siła nacisku na sprężynę, k – sztywność sprężyny, X_0 – długość sprężyny nieobciążonej, X – długość sprężyny obciążonej przy braku odkształcenia pasa, Δx – wartość ugięcia sprężyny przy braku odkształcenia pasa.

Siła F_{spr} zrównoważona jest siłą nacisku pasa zębatego na napinacz. Z geometrii przedstawionej na rys. 4 otrzymujemy zależność:

$$F_{spr} = 2 \cdot \cos \left(\frac{\alpha}{2} \right) \cdot F_3 \quad (10)$$

gdzie: F_3 – siła przenoszona przez pas zębata w miejscu zetknięcia z napinaczem, α – kąt rozwarcia pasa zębatego przy napinaczu.

Pozycja rolki napinacza jest zależna od aktualnej długości pasa zębatego. Również kąt rozwarcia α ulega zmianie. Ponieważ sprężyna napinacza jest z jednej strony podparta na nieruchomej obudowie, a z drugiej strony na części napinacza z rolką, ugięcie obciążonej sprężyny Δx zależy od aktualnej długości l pasa zębatego, a co za tym idzie wartość siły F_{spr} ulega zmianie (rys. 5).



Rysunek 5. Wpływ zmiany długości pasa zębatego na wartości geometryczne układu [źródło własne]

Po nadaniu więzów geometrycznych trajektorii pasa zębatego w programie CAD i zbadaniu wartości kąta α oraz przesunięciu rolki napinacza s w zależności od niewielkiej zmiany długości pasa zębatego otrzymano zlinearyzowane funkcje opisujące te zmiany wokół położenia pracy $l = 1100 \text{ mm}$:

$$s(l) = l - l_0 \quad (11)$$

gdzie: $s(l)$ – przesunięcie rolki napinacza w zależności od aktualnej długości pasa

$$\alpha(l) = \alpha - 0,8976 \cdot (l - l_0) \quad (12)$$

gdzie: α – wartość kąta dla $l = l_0 = 1100 \text{ mm}$ i dla danej geometrii wynosi

$$\alpha = 120,12^\circ$$

$\alpha(l)$ – wartość kąta rozwarcia w zależności od aktualnej długości pasa

Wartość ugięcia sprężyny zmienia się podczas zmiany długości pasa zgodnie z rys. 5 według zależności:

$$\Delta x = X_0 - X - s(l) \quad (13)$$

3.4. Proces optymalizacji

Przed procesem optymalizacji należy określić zmienne decyzyjne, podać dopuszczalny przedział ich zmienności oraz określić funkcję celu [4].

3.4.1. Zmienne decyzyjne

Parametry, na które konstruktor może w prosty sposób wpłynąć podczas konstrukcji napinacza to sztywność sprężyny k i jej napięcie wstępne F_{spr_0} . Są to parametry, których zmiana podczas projektowania nie kosztuje konstruktora wiele czasu oraz pieniędzy, a dobór ich wartości może odbywać się w bardzo szerokim zakresie.

3.4.2. Decyzje dopuszczalne

Zarówno zmienne decyzyjne jak i pozostałe parametry pracy układu są ograniczone ze względów geometrycznych, wytrzymałościowych, czy fizycznych.

Sztywność sprężyny musi spełniać warunek:

$$k > 0 \quad (14)$$

Długość swobodna sprężyny, ograniczona przez geometrię układu, wynosi:

$$X_0 = 25mm \quad (15)$$

Wartość ugięcia sprężyny jest ograniczona konstrukcyjnie i musi spełniać zależność:

$$0 < \Delta x \leq 10 \quad (16)$$

Wartość napięcia wstępnego tym samym musi spełniać warunek:

$$F_{spr_0} > 0 \quad (17)$$

Podczas pracy układu przeniesienia napędu nie może wystąpić spadnięcie pasa zębatego. Na pas działają dwa rodzaje sił – siła dynamiczna spowodowana przyspieszaniem układu oraz siła napięcia spowodowana koniecznością dopasowania się długości pasa zębatego do trajektorii wyznaczonej przez koła pasowe oraz napinacz. Przypadkiem granicznym prawidłowej pracy pasa jest tak duża siła dynamiczna, że napinacz nie powoduje dodatkowego docisku pasa powodującego powstanie siły napięcia w pasie. Dalsze zwiększenie siły dynamicznej na

części III pasa wymagałoby większej wartości siły napinacza, tym samym większego ugięcia sprężyny. Dalsze cofnięcie się rolki napinacza spowodowałoby utratę zdolności podpierania pasa przez napinacz tym samym powodując jego spadnięcie. Nie stanie się to wtedy, gdy siła ściskająca sprężynę będzie większa bądź równa sile potrzebnej do przeniesienia przez napinacz obciążenia dynamicznego na III części pasa F_{3dyn} . Uwzględniając zależności geometryczne z rys.4 wymagane jest spełnienie w każdym punkcie pracy układu zależności:

$$F_{spr} \geq 2 \cdot \cos \cdot \left(\frac{\alpha}{2}\right) \cdot F_{3dyn} \quad (18)$$

3.4.3. Funkcja celu

Celem optymalizacji jest maksymalny zakres dopuszczalnego obciążenia przenoszonego przez pas oraz jak najmniejsze obciążenie w całym zakresie pracy. Pierwszym celem do osiągnięcia podczas optymalizacji jest by podczas obciążenia powodującego zerwanie paska, miejsce krytyczne było obciążone tylko przez siłę dynamiczną. Podczas pracy, maksymalne obciążenie występuje zaraz za rolką napędzającą. Ponieważ pas obraca się w prawo, a rozkład siły zewnętrznej napędzającej układ może być rozłożony między dwiema rolkami, rozpatrzone zostaną dwa skrajne przypadki napędu: napęd w całości przez rolkę I albo w całości przez rolkę II. Przyjmujemy, że spełniona jest wtedy zależność:

$$\begin{cases} F_1 = F_{1dyn} = F_{max} \\ F_n = 0 \end{cases} \quad (19)$$

Albo:

$$\begin{cases} F_2 = F_{2dyn} = F_{max} \\ F_n = 0 \end{cases} \quad (20)$$

gdzie: F_{max} – wartość siły powodującej zerwanie pasa zębatego odczytana z karty danych technicznych pasa zębatego wynosi:

$$F_{max} = 2425 \text{ N} \quad (21)$$

Drugi cel, jaki chcemy osiągnąć, jest by pas podczas spoczynku był napięty możliwie najmniejszą siłą zapewniającą prawidłową pracę w całym zakresie obciążenia:

$$\begin{cases} F_{1dyn} = F_{2dyn} = F_{3dyn} = 0 \\ F_n = \min \end{cases} \quad (22)$$

Dla przypadku (19), gdy układ napędzany jest w całości przez rolkę I, pasek jest obciążony siłami dynamicznymi powodującymi przyspieszenie koła zamachowego oraz rolki II.

Założenia (19) są spełnione, zatem:

$$F_1 = F_{1dyn}$$

$$F_2 = F_{2dyn} \quad (23)$$

$$F_3 = F_{3dyn}$$

Ponieważ rolka I napędza układ:

$$F_2 = F_{2dyn} = 0 \quad (24)$$

W III części pasek przenosi siłę potrzebną do napędzenia rolki:

$$F_{3dyn} = \frac{I_r \cdot \varepsilon}{r} \quad (25)$$

gdzie: r -promień koła pasowego.

W I części pasek przenosi siłę potrzebną do napędzenia koła zamachowego oraz rolki:

$$F_{1dyn} = \frac{I_{kz} \cdot \varepsilon}{r} + F_{3dyn} = \frac{I_{kz} \cdot \varepsilon}{r} + \frac{I_r \cdot \varepsilon}{r} \quad (26)$$

Porównując (26) z (27) otrzymamy:

$$F_{3dyn} = F_{1dyn} \cdot \frac{I_r}{I_r + I_{kz}} \quad (27)$$

Dla przypadku (20), gdy układ napędzany jest w całości przez rolkę II, pasek jest obciążony siłami dynamicznymi powodującymi przyspieszenie koła zamachowego oraz rolki I.

Ponieważ rolka II napędza układ, zatem część III nie przenosi obciążenia dynamicznego:

$$F_3 = F_{3dyn} = 0 \quad (28)$$

Zgodnie ze wzorami (20) i (28) nie istnieje możliwość spadnięcia pasa. W tym przypadku w całym zakresie pracy napinacz będzie równoważył jedynie siłę napięcia paska. Dalszy ciąg optymalizacji dla tego przypadku nie ma sensu, gdyż w rzeczywistości przy różnym rozkładzie siły zewnętrznej na obu rolkach i wystąpieniu składowej siły dynamicznej na napi-

naczu spowodowałyby to dodatkowe cofnięcie się sprężyny napinacza, czego wynikiem byłoby spadnięcie pasa.

Gdy układ napędzają obie rolki, na III części pasa nie występuje siła dynamiczna, tzn. $F_{3dyn} = 0$. Zgodnie ze wzorem (18) nie występuje ryzyko spadnięcia pasa. Najniebezpieczniejszym przypadkiem jest, gdy układ napędzany jest tylko rolką I. Wiedząc, że zapewnienie prawidłowej pracy układu przeniesienia napędu dla przypadku napędu tylko rolką I implikuje prawidłowość pracy dla pozostałych przypadków, podczas optymalizacji będziemy rozpatrywać właśnie ten przypadek.

Wnioskiem z powyższych rozważań jest przyjęcie dwóch funkcji celu podczas optymalizacji zgodnie ze wzorem (19) oraz (22):

$$\begin{cases} F_1 = F_{1dyn} = F_{max} \\ F_n = 0 \end{cases}$$

$$\begin{cases} F_{1dyn} = F_{2dyn} = F_{3dyn} = 0 \\ F_n = min \end{cases}$$

3.4.4. Obliczenie optymalnych wartości

Uwzględniając równości (6), (19), (21), (24) otrzymamy zależność opisującą pracę pasa zębatego:

$$\begin{aligned} 1100 - l + \frac{l}{538889} \cdot 0 + 2425 \cdot \frac{485,5}{538889} + 0 \cdot \frac{260}{538889} + \\ + 2425 \cdot \frac{14532,74}{14532,74+164792,2} \cdot \frac{354,5}{538889} = 0 \end{aligned} \quad (29)$$

Po wyliczeniu:

$$l = 1102,314 \text{ mm} \quad (30)$$

Uwzględniając równości (30), (13), (27), (12), (15) i porównując ze sobą wzory (10) i (7) otrzymamy:

$$\begin{aligned} k \cdot (25 - X - (1102,314 - 1100)) = \\ = 2 \cdot \cos\left(\frac{120,12 - 0,8976 \cdot (1102,314 - 1100)}{2}\right) \cdot 2425 \cdot \frac{14532,74}{14532,74 + 164792,2} \end{aligned} \quad (31)$$

Upraszczając:

$$k \cdot (22,686 - X) = 202,315 \quad (32)$$

Uwzględniając równości (22), (6) otrzymamy zależność opisującą pracę pasa zębatego przy braku przyspieszania układu:

$$1100 - l + \frac{l}{538889} \cdot F_n + 0 \cdot \frac{485,5}{538889} + 0 \cdot \frac{260}{538889} + 0 \cdot \frac{354,5}{538889} = 0 \quad (33)$$

Upraszczając:

$$F_n = \frac{(l-1100) \cdot 538889}{l} \quad (34)$$

Zgodnie z założeniem (22) oczekujemy, by $F_n = \min$. Analizując równanie (34) dochodzimy do wniosku, że spełnione jest to tylko wtedy, gdy długość pasa dla układu nieobciążonego siłami dynamicznymi:

$$l = \min \quad (35)$$

Uwzględniając (22), (2), (34), (32) i po porównaniu (10) i (7) otrzymamy zależność:

$$k = \frac{(l-1100) \cdot 538889 \cdot 2 \cdot \cos\left(\frac{120,12 - 0,8976 \cdot (l-1100)}{2}\right) - l \cdot 202,315}{l \cdot (2,314 - (l-1100))} \quad (36)$$

Jest to funkcja $k(l)$. Pamiętając zależność (22) należy dowiedzieć się, jak zachowuje się funkcja $k(l)$ w otoczeniu pracy. Po narysowaniu wykresu tej zależności np. w MATLABie można zauważyć fakt, że dla:

$$1100,5 < l < 1102,314 \quad (37)$$

k rośnie wraz ze wzrostem l . Zważywszy na (35) optymalnej wartości sztywności szukać będziemy dla:

$$k = \min \quad (38)$$

Wnioskując z (32) i (38) podczas optymalnej pracy pasa wymagane jest:

$$X = \min \quad (39)$$

Zgodnie z ograniczeniami konstrukcyjnymi (16) i (13):

$$X_0 - X - s(l) \leq 10mm \quad (40)$$

Podstawiając (15) i (11):

$$X + l - 1100 \geq 15mm \quad (41)$$

Długość paska będzie minimalna dla pasa nieobciążonego siłami dynamicznymi. Implikuje to, że wtedy spełniona będzie zależność:

$$s(l) = l - 1100 = \min \quad (42)$$

Zgodnie z wnioskiem (39), (42) i wzorem (41) dla układu nieobciążonego siłami dynamicznymi, optymalne rozwiązanie spełnia zależność:

$$X + l - 1100 = 15\text{mm} \quad (43)$$

Otrzymaliśmy układ trzech równań (43), (36), (32) z trzema niewiadomymi, których spełnienie warunkuje optymalną pracę układu. Rugując zmienne X oraz k otrzymamy równanie nieliniowe postaci:

$$1100 - l + \frac{l}{538889} \cdot \left(\frac{\frac{202,315}{7,686+l-1100} \cdot 10}{2 \cdot \cos\left(\frac{120,12-0,8976 \cdot (l-1100)}{2}\right)} \right) = 0 \quad (44)$$

Numeryczne rozwiązanie powyższego zagadnienia daje wynik:

$$l = 1100,502 \text{ mm} \quad (45)$$

Jest to długość, jaką ma pas podczas braku obciążenia układu siłami dynamicznymi. Podstawiając wynik (45) do (43):

$$X = 14,457 \text{ mm} \quad (46)$$

Optymalną sztywność sprężyny otrzymamy z równań (46) i (32):

$$k = 24,59 \frac{N}{\text{mm}} \quad (47)$$

Optymalna siła napięcia wstępnego sprężyny z zależności (13), (11), (7), (47), (46), (45) wynosi:

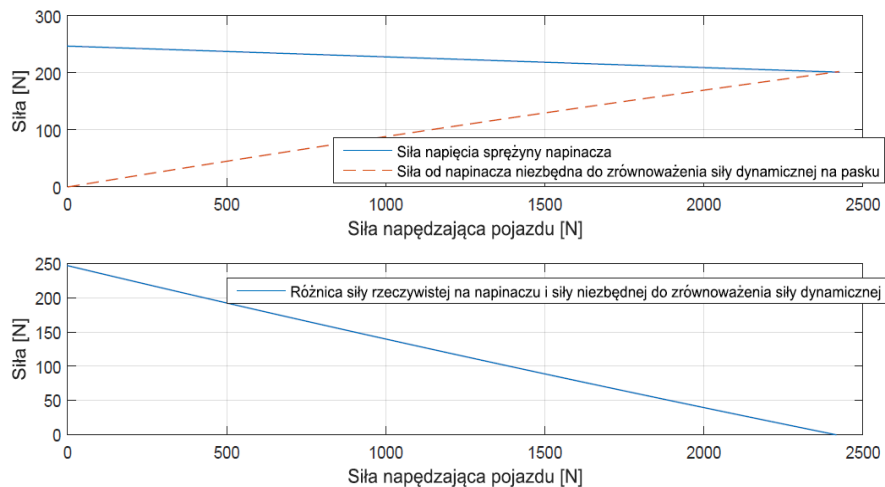
$$F_n = 245,65 \text{ N} \quad (48)$$

4. Analiza wyników

Otrzymane wyniki zapewniają żadaną przez nas pracę układu w dwóch szczególnych punktach – przy braku obciążenia dynamicznego oraz przy maksymalnym obciążeniu możliwym do przeniesienia przez pas. W tym momencie warto byłoby wiedzieć jak układ zachowuje się podczas normalnej pracy. Świadomość ta jest niezbędna w ocenie prawidłowości przeprowadzenia optymalizacji.

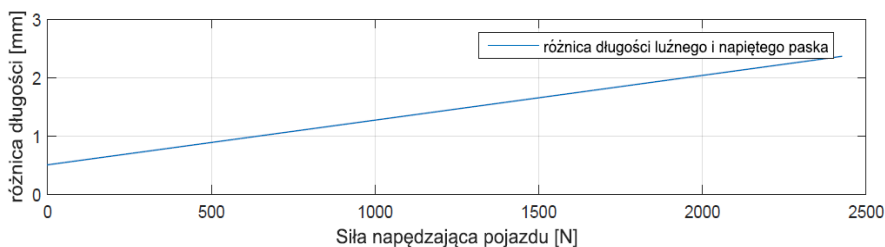
Symulacja przeprowadzona w programie MATLAB przedstawia niezbędne parametry do analizy poprawności optymalizacji oraz bezpieczeństwa pracy. Przeprowadzono ją dla określonej siły dynamicznej w całym jej zakresie.

Zależność (18) warunkująca brak możliwości spadnięcia pasa zębatego została sprawdzona dla całego zakresu pracy układu (rys. 6). Wyniki symulacji potwierdzają poprawność wykonanej optymalizacji zapewniając prawidłową pracę układu dla całego zakresu obciążenia siłą dynamiczną.



Rysunek 6. Symulacja możliwości spadnięcia pasa zębatego

Różnica długości pasa zębatego przedstawiona jest na rys. 7. Podczas całego zakresu pracy różnica ta zmienia się prawie o 2 mm, tym samym należy zauważyć, że zgodnie ze wzorem (11) konstrukcja napinacza podczas zmiany obciążenia przesuwa się maksymalnie o $\Delta s = 2mm$. Wniosek ten należy uwzględnić w projekcie koncepcyjnym umożliwiając swobodne poruszanie się względem siebie elementów napinacza.



Rysunek 7. Symulacja zmiany długości pasa zębatego

5. Wnioski

Wnioskując z analizy wyników optymalizacja została przeprowadzona poprawnie. Efektem dokonanych obliczeń jest zapewnienie możliwie najlepszej pracy układu. Odpowiedni dobór sprężyny oraz napięcia wstępnego całkowicie wyklucza awaryjność układu spowodowaną spadnięciem paska, co jest jedną z najczęstszych przyczyn awarii pasowych układów przeniesienia napędu. Dodatkowo znamy parametry układu przeniesienia napędu w zależności od siły dynamicznej przyspieszającej układ. Warto zwrócić uwagę na warunki pracy napinacza i zapewnić konstrukcyjnie odpowiednie możliwości przesuwania się wzdłuż swojej osi.

Dalszy etap projektowania napinacza uwzględnić będzie wykonanie sprężyny o wyliczonej sztywności oraz zapewnienie odpowiedniego napięcia wstępnego przy montażu napinacza.

6. Podziękowania

Chciałbym podziękować członkom Studenckiego Koła Aerodynamiki Pojazdów, a w szczególności inż. Pawłowi Radziszewskiemu za pomoc merytoryczną, motywację i czas poświęcony przy rozwiązywaniu problemów napotkanych podczas prac nad optymalizacją i projektem napinacza.

Chciałbym również podziękować firmie STAMIX s.c. z Radomia za bezpłatne wykonanie całej konstrukcji napinacza i umożliwienie dalszej pracy nad tym projektem.

Literatura

1. Podstawy konstrukcji napędów maszyn pod red. Bogdana Branowskiego, Poznań 2007, s. 321
2. Ostwald M. Podstawy optymalizacji konstrukcji, Poznań 2005, s.42
3. Nazarczuk K. *Zarys dynamiki i automatyki układów*, pod red. Andrzeja Ołędzkiego, Warszawa 1991, s. 45
4. *Optymalizacja i mechanika konstrukcji*, pod red. Leszka Mikulskiego, Kraków 2014 s. 8-10

Optimalizacja warunków pracy pasa zębatego ze względu na parametry fizyczne elementu podatnego napinacza

Streszczenie

W pracy rozpatrzono problem napinania pasów napędowych w układach przeniesienia napędu. Skupiono się na wpływie podatności napinacza na poprawność i niezawodność pracy. Przeprowadzono optymalizację warunków pracy pasa zębatego dobierając najlepsze wartości parametrów fizycznych elementu podatnego napinacza. Proces ten przeprowadzono po ówczesnym napisaniu modelu fizycznego jak i matematycznego napinacza i pasa zębatego. Efektem analizy są optymalne wartości sztywności oraz napięcia wstępnego elementu podatnego, tj. sprężyny napinacza. Przeprowadzono również symulację zmiany długości pasa zębatego w stosunku do przyłożonej siły napędzającej układ oraz wyznaczono przebieg siły działającej na napinacz w zależności od obciążenia układu przeniesienia napędu. Wyniki badania uwzględnione zostały w procesie konstruowania napinacza własnej konstrukcji zapewniając prawidłową i bezpieczną pracę układu przeniesienia napędu.

Słowa kluczowe: napinacz sprężyna podatny napęd optymalizacja

Optimization of working conditions of the belt due to a flexible element's physical characteristics of tensioner

Abstract

Examination of tensioning belts in transmission systems is included in the field of this study. It was focused on the impact of the vulnerability of tensioner for accuracy and reliability. It was carried out to optimize the operating conditions of the belt by choosing the best values of the physical parameters of flexible element of tensioner. This process is carried out after writing a physical and mathematical model of tensioner and belt. The result of the analysis is optimal values of stiffness and preload of a flexible element – spring. There was also have been carried out simulation of changes of belt length in order to applied force. The results of the study were included in the process of constructing the tensioner ensuring proper and safe operation.

Keywords: tensioner spring drive optimization belt

Wykorzystanie metody DArT do identyfikacji sekwencji specyficznych rodzaju *Avena*

1. Wprowadzenie i cel pracy

Ziarno owsa stanowi bogate źródło składników odżywczych, o wysokiej wartości fizjologiczno-żywnościowej i profilaktycznej, może być wykorzystywane w żywieniu ludzi i zwierząt, oraz stanowi niezbędny element w płodozmianie. W Polsce owies jest zbożem niedocenianym, ilość jego upraw stale maleje, ponadto nadal jest kojarzony przeważnie tylko z paszą dla koni, których pogłowie w Polsce również maleje [1]. Tymczasem jest to roślina zbożowa o najwyższej zawartości białka, charakteryzującego się najkorzystniejszym składem aminokwasowym oraz największą zawartością tłuszczu o korzystnej proporcji kwasu linolowego do oleinowego [2]. Zawarte w owsie nierozpuszczalne frakcje β -glukanów nadają mu właściwości lecznicze. Badania wykazały że spożywanie 3g β -glukanów, pochodzących z produktów owsianych, obniża stężenie cholesterolu LDL o 5%. β -glukany są dobrym regulatorem poposiłkowej glikemii i zawartości insuliny [3].

Poszerzanie wiedzy dotyczącej organizacji i struktury genomów roślinnych, ich mapowania oraz analiza loci cech ilościowych i jakościowych, a następnie analiza sekwencji sprzężonych z ważnymi ekonomicznie cechami to podstawa współczesnej analizy genetycznej jakiegokolwiek gatunku, w tym również owsa [4]. Jednakże zastosowanie w tym celu klasycznych metod analizy molekularnej okazuje się w większości przypadków trudne lub niemożliwe. Niezbędne jest wykorzystanie wysoko rozwiniętych technik molekularnych [5]. Wśród różnych systemów markerowych, które zostały wprowadzone i zoptymalizowane w ostatniej dekadzie, najistotniejszą rolę odgrywają metody markerowe oparte na mikromacierzach, a ostatnio znacznie częściej na sekwencjonowaniu [6]. Metody hybrydyzacji w połączeniu z użyciem mikromacierzy, nie wymagają frakcjonowania w polu elektrycznym i pozwalają na zwiększenie ilości

¹ klaudiagustaw1@gmail.com, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

² awasko1@tlen.pl, Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

analizowanych markerów w jednostce czasu. Do technik dających takie możliwości należy metoda Diversity Arrays Technology (DART) [7].

Celem pracy było przedstawienie zalet i wad metody Diversity Arrays Technology (DART) służącej do identyfikacji sekwencji specyficznych rodzaju *Avena*.

2. Charakterystyka owsa

Owies zwyczajny (*Avenasativa* L.) należy do rodziny wiechlinowatych *Poaceae*, podrodziny wiechlinowych *Pooideae*, plemienia *Aveneae*, podślemienia *Aveninae*, rodzaju *Avenae* L. [8]. Światowa produkcja owsa według danych FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations w 2012 roku wyniosła 19 milionów ton, tendencja ta wzrasta, i w 2016 roku produkcja tego zboża osiągnęła 22 milionów ton [9]. Tylko 20% produkcji wykorzystywane jest przez przemysł spożywczy [10]. Ziarno owsa, poza łatwo przyswajalnym białkiem i dobrze strawnymi kwasami tłuszczowymi, posiada dużo związków mineralnych takich jak krzem, magnez, sód, wapń, miedź oraz inne substancje takie jak lecytyna czy witaminy, głównie E. Większa części produkcji jest wykorzystywana jako zboże paszowe, pasza słomiasta z owsa jest szczególnie dobra ponieważ zawiera niewielkie ilości trudno strawnego włókna. Owies ma niewielkie wymagania glebowe, jedynym warunkiem jest zasobność gleby w wodę i pH powyżej 5,5. Ziarno kiełkuje w temperaturze 2-3^oC dlatego może być siane wczesną wiosną. Owies jest rośliną fitosanitarną i pełni ważną rolę w płodozmianie, lecz częsty jego wysiew może powodować namnażanie w glebie mątwika zbożowego powodującego chorobę zbóż jarych [11].

Rodzaj *Avena* obejmuje gatunki diploidalne, tetraploidalne i heksaploidalne. Podstawowa liczba chromosomów u owsa to 7, z trzema grupami kariologicznymi o 14, 28 i 42 chromosomach [12]. Do rodzaju *Avena* L. przyporządkowano 31 gatunków uprawnych, dzikich i chwastów, obejmuje on szesnaście gatunków diploidalnych, gdzie $2n=2x=14$, osiem tetraploidalnych ($4x=28$) i siedem heksaploidalnych ($6x=42$). Klasyfikacja opiera się na podstawie ich poliploidalności oraz struktury genomu [13]. Rodzaj *Avena* reprezentuje cztery podstawowe typy genomów; diploidy to AA lub CC, w przypadku tetraploidów kombinacje AABB, AACC lub CCCC, zaś skład genomowy heksaploidów to AACCCDD [14]. Dodatkowo gatunki podzielono na siedem sekcji [15]:

1) *Ventricosa* – diploidy: *A. eriantha* Dur., *A. clauda* Dur., *A. ventricosa* Bal. Ex Cross.;

2) *Agraria* – diploidy: *A. hispanica* Lag., *A. brevis* Roth., *A. nuda* L., *A. strigosa* Schreb.

3) *Tenuicarpa* – diploidy: *A. atlantica* Baum et Fedak, *A. longiglumis* Dur., *A. canariensis* Baum Rajhathy et Sampson, *A. damascene* Rajhathy et Baum, *A. hirtula* Lag., *A. lusitanica* (Tab. Mar.) Baum Comb et Stat., *A. matritensis* Baum Sp. Nov, *A. prostrate* Ladiz., *A. wiestki* Steud. oraz tetraploidy: *A. agadiriana* Baum et Fedak, *A. barbata* Pott. Ex Link.

4) *Ethiopica* - tetraploidy: *A. abyssinica* Hochst., *A. vaviloviana* (Malz.) Mordv.;

5) *Pachycarpa* – tetraploidy: *A. maroccana* Gdgr, *A. murphyi* Ladiz. (dawniej *A. magna*) i *A. insularis* Ladiz.;

6) *Avenotrichon* – autotetraploid *A. macrostachya* Bal. ex Coss. et Dur., jedyny obcopolny i wieloletni gatunek z rodzaju *Avena*, wszystkie inne są samopylne oraz jednoroczne [16];

7) *Avena* – obejmuje: *A. atheranta* Presl, *A. fatula* L., *A. sterilis* L., *A. hybrida* Peterm, *A. occidentalis* Dur., *A. sativa* L., i *A. trichophylla* C. Koch.

W Polsce uprawiane są głównie odmiany owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.), marginalne znaczenie ma również owies szorstki. Krajowe odmiany owsa charakteryzuje stosunkowo małe zróżnicowanie pod względem genetycznym. Nowe źródła zmienności genetycznej są, więc najważniejszym czynnikiem postępu w hodowli [15, 17]. Nadzieje na wzbogacenie puli genetycznej owsa zwyczajnego pokłada się w dzikich gatunkach, zawierających wiele pożądanых genów [18].

Za najlepsze źródło korzystnych genów i jednocześnie najłatwiej dostępne ze względu na niewielkie bariery izolujące gatunki, uznaje się dzikie heksaploidy: *Avena sterilis*, *Avena fatua* genomie typu AACCCD. W obrębie genotypów AACCCD występuje bogactwo form zróżnicowanych pod względem morfologicznym, charakteryzujących się odpornością na choroby, szkodniki i abiotyczne stresy środowiskowe oraz korzystnym składem chemicznym ziarniaków [19]. Skład genomowy AACCCD, pozwala na stosunkowo łatwe przełamywanie barier izolacyjnych podczas krzyżowań. Bardzo dobrym rezerwuarem pożądaney zmienności aczkolwiek, o ograniczonej dostępności, są tetraploidy o konstrukcji genomowej AACCC: *Avena maroccana* i *Avena murphyi* [20]. Występowanie barier genetycznych utrudnia dostępność zmienności genetycznej pomiędzy gatunkami, jednakże tetraploidy o składzie genomowym AACCC przy zastosowaniu wielokrotnych krzyżowań wstecznych, przekazują geny do heksaploidalnych form uprawnych. Natomiast przenoszenie genów z gatunków AABB czy diploidów, jest jeszcze bardziej ograniczone [21], jednakże gatunki te mogą zostać wykorzystane w hodowli po zastosowaniu odpowiednich technik hodowlanych m.in. izolacji niedojrzałych zarodków i podwajania liczby chromosomów. Najbardziej odmienny genetycznie jest gatunek autotetraploidalny CCCC – *A. macrostachya*, jednak pomimo to

udało się uzyskać w pracach hodowlanych płodne mieszańce o dużym potencjale [22]. Szereg metod biotechnologicznych pomaga przełamać silne bariery genetyczne, oddzielające formy dzikie od uprawnych, spowodowane głównie odmiennym składem genomowym i różnym poziomem ploidalności, oraz efektywnie przenosić cenne geny, gdy zawiodą metody krzyżowania [19].

Pomimo, że heksaploidalne gatunki zawierają genomy ACD, tetraploidy AB lub AC to w przypadku diploidów występują tylko genomy A lub C, zaś nie zidentyfikowano do tej pory u nich genomu B i D [13]. Na skutek wielu transycji i transwersji, a także kumulacji różnic w liczbie powtórzeń i rozmieszczeniu sekwencji mikrosatelitarnych, genomy A i C uległy rozdziałowi filogenetycznemu [18]. Strukturalne różnice w budowach genomów A i C doprowadziły do wyodrębnienia charakterystycznych subgenomów. Dla genomu A wyróżniono następujące subgenomy: Ac występujący u *A. canariensis*, Ad u *A. damascena*, Al u *A. longiglumis* Ap u *A. prostrata*, As u gatunków *A. atlantica*, *A. brevis*, *A. hirtula*, *A. hispanica*, *A. lusitanica*, *A. matritensis*, *A. nuda*, *A. westii* i *A. strigosa*. Genom C gromadzi w sobie następujące subgenomy: Cp charakterystyczny dla gatunków *A. erianthi* *A. clauda*, oraz subgenom Cv występujący u *A. ventricosa* [15]. Obecnie genom C uznaje się za starszy ewolucyjnie i podstawowe jego subgenomy Cp i Cv powstały na skutek rearanżacji chromosomowych i przesunięcia pozycji centromeru [23]. Zmiany, które powstały w toku ewolucji w genomie C są niewielkie w porównaniu z genomem A, który prawdopodobnie wyodrębnił się z genomu C na skutek wielu uwidaczniających się z czasem modyfikacji [18]. W drodze ewolucji wyodrębniły się później oddzielnie dwa składy genomowe AABB oraz AACC. Tetraploidy AACC powstały poprzez skrzyżowanie się osobników diploidalnych AA z CC. Prawdopodobnie organizmami z których wyłoniły się te tetraploidy, były dla genomu A gatunki takie jak *A. westii*, *A. strigosa*, *A. hirtula*, *A. canariensis*, oraz *A. damascena*, jako dawcę genomu C typuje się *A. eriantha* [24]. Wciąż trwają badania nad ewolucją i strukturą genomową owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.), gdyż jednoznacznie nie zidentyfikowano gatunków diploidalnych z których to wywodzą się gatunki tetraploidalne i heksaploidalne [15].

3. Metody stosowane do analizy genomów owsa

W tej sekcji należy w sposób jasny i czytelny sformułować wnioski wynikające z przedstawionego opracowania lub też podsumować treść. W badaniach ewolucyjnych, jak i hodowlanych owsa coraz częściej stosuje się techniki molekularnej analizy DNA typu AFLP, ISSR czy REMAP [17], a także zaawansowane technologie analizy całych genomów lub

określonych genów [25]. Każdy pojedynczy genotyp może być obecnie analizowany wieloma metodami. Wydajne technologie genotypowania będą odgrywać coraz większą rolę w biotechnologii roślin. Jednak powszechnie stosowanie technologii molekularnej analizy DNA, jest ograniczone przez możliwości techniczne i finansowe [4].

Rzeczony technik markerowych w ciągu ostatnich dwóch dekad pozwolił na monitorowanie zmian w sekwencji DNA wśród gatunków, stworzenie nowych źródeł zmienności genetycznej oraz wprowadzenie cech korzystnych do gatunków zbóż o zastosowaniu rolniczym [26]. Za marker uznaje się dowolny wyznacznik, który genetycznie kontroluje jakąś cechę fenotypową, lub też dowolną różnicę genetyczną wykorzystywaną do ujawnienia polimorfizmu osobniczego [4]. Jest to składający się z kilkudziesięciu lub kilkuset par zasad fragment kwasu deoksyrybonukleinowego, mający za zadanie wychwycić zmienność struktury w obrębie danego locus. Markery są wykorzystywane w doborze do krzyżowań osobników z cennymi cechami i wczesnym wykryciu osobników bez pożądanych genów [27]. Są one również niezbędne do opracowywania map genetycznych, określaniu relacji taksonomicznych form uprawnych, w analizie struktury populacji, mapowaniu asocjacyjnym oraz lokalizowaniu loci cech ilościowych QLT [7].

Do analizy zmienności organizmów stosowano dawniej markery morfologiczne, opierające się na cechach fenotypowych, które to nie dostarczały poprawnych informacji dotyczących filogenezy i zróżnicowania genetycznego [28]. Następnie wprowadzono markery cytologiczne, bazujące na śledzeniu aberracji chromosomowych genomu danego organizmu, potem zaś markery białek strukturalnych, oraz białek enzymatycznych, które odzwierciedlały zmienność poprzez analizę polimorfizmu struktury molekularnej polipeptydów.

Obecnie najważniejsze są systemy markerów molekularnych ujawniające zmienność sekwencji nukleotydowej DNA [4]. Markery molekularne bazują głównie na aktywności enzymów restrykcyjnych [29] oraz polimerazy DNA (reakcja PCR – *Polymerase Chain Reaction*) [30].

Marker DNA o wysokiej użyteczności powinien:

- ujawniać szeroki zakres zmienności analizowanej cechy;
- charakteryzować się równomiernym rozproszeniem i dużą częstotliwością występowania w genomie;
- cechować się neutralnością selekcyjną, czyli nie może wykazywać sprzężeń z genami plejotropowymi;
- nie ulegać wpływowi czynników środowiskowych;
- wykazywać znaczny polimorfizm;
- przy użyciu prostych metod wykazywać dużą wykrywalność, zarówno u organizmów homozygotycznych, jak i u heterozygotycznych [31].

Najwcześniej opracowaną techniką opartą na hybrydyzacji DNA jest RFLP, czyli polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Metoda polega na wykorzystaniu enzymów restrykcyjnych do trawienia DNA, oraz rozdziału produktów tej reakcji na żelu agarozowym. Później udoskonalono ją, poprzez wprowadzenie dodatkowego transferu rozdzielonych fragmentów DNA, na membranę, oraz późniejszą ich hybrydyzację DNA ze specyficzną sondą znakowaną radioaktywnie (Southern, 1975) lub fluorescencyjnie (Neuhaus, 1993). Zazwyczaj jako sondy stosuje się zwykłe DNA lub cDNA, wyniki analizy polimorfizmu sygnałów hybrydyzacyjnych dokonuje się, za pomocą autoradiografii. RFLP różnicuje strukturę DNA za pomocą identyfikacji delekcji lub insercji, co skutkuje utratą lub też pojawieniem się nowego miejsca restrykcyjnego. Metoda ta ma wiele zalet między innymi, wysoką wiarygodność i powtarzalność, umożliwia stwierdzenie homo- i heterozygotyczności badanego osobnika, czy też pozwala na analizę specyficznych loci lub alleli [5]. Jednakże wysoka jakość i ilość DNA, oraz wysokie koszty związane z utrzymaniem sondy stanowią barierę, dla szerokiego jej zastosowania [32]. Techniką pozbawioną tych ograniczeń jest RAPD (*Random Amplified polymorphic DNA*), czyli losowo amplifikowany polimorfizm DNA.

Metoda RAPD jest prosta technicznie i wymaga stosunkowo niewielkich ilości DNA. RAPD bazuje na reakcji PCR, z zastosowaniem pojedynczego startera o długości 9-11 pz o losowej sekwencji. Starter hybryduje do matrycy DNA w wielu miejscach i rozpoczyna amplifikację jednocześnie w wielu rejonach genomu. Produkty tej reakcji rozdziela się na żelu agarozowym, w obecności bromku etydyny, lub srebra. Prążki na żelu o tej samej wielkości, a właściwie tempo migracji, nie świadczą, jednak o homologiczności sekwencji [33]. Pomimo średniej wiarygodności analizy i niskiej powtarzalności, RAPD umożliwia skuteczną analizę materiału o niskim stopniu zróżnicowania genetycznego [4].

ISSR, podobnie jak RAPD bazuje na reakcji PCR, z zastosowaniem arbitralnego startera komplementarnego do styku mikrosatelity z sekwencją sąsiadującą. Reakcja ze starterami zakotwiczonymi na końcu 3' pozwala na analizę polimorfizmu długości obszarów między mikrosatelitarnymi DNA, osadzonymi pomiędzy skierowanymi identycznie sekwencjami mikrosatelitarnymi [34]. Startery reakcji ISSR posiadają kilka selektywnych nukleotydów, w celu zakotwiczenia startera na końcu mikrosatelity. Od 10 do 60 powstałych produktów rozdziela się na żelu. W ISSR przypuszcza się że markery mikrosatelitarne mogą być sprzężone z obszarami kodującymi.

Również bazującymi na PCR metodami są SSR, SCAR i SNP. Tandemowe krótkie powtórzenia w SSR są szczególnie często wykorzystywane do badań zbóż [26]. Analiza sekwencji mikrosatelitarnych DNA, zbud-

wanych z powtórzonych kilkadziesiąt razy 1-6 nuklotydowych odcinków DNA, polega na porównywaniu liczby powtórzeń elementu podstawowego. W SSR konieczne jest zastosowanie biblioteki genomowej, do projektowania starterów. Wiąże się to z wzbogaceniem biblioteki o sekwencje mikrosatelitarne [34]. Metoda ta jest pomocna w selekcjonowaniu poszukiwanych genotypów i mapowaniu, oraz rozróżnieniu dominujących homozygot od heterozygot [32].

Wcześniej wspomniana technologia SCAR, czyli polimorfizm sekwencyjnie charakteryzowanych regionów DNA, często stosowana jest do zwiększenia specyficzności reakcji RAPD. Polega na sekwencjonowaniu końcowych produktów RAPD, które są matrycą do zaprojektowania starterów, które amplifikują specyficzne locus. Pomocna jest w identyfikacji sekwencji dziedziczonych w sposób dominujący, zaś wtórne poddanie produktów PCR trawieniu restrykcyjnemu i rozdzieleniu ich na żelu pozwala na określenie homo- lub heterozygotyczności osobnika [4].

System SNP polega na identyfikacji polimorfizmu dotyczącego pojedynczego nukleotydu występującego w badanym fragmencie. SNP pomimo wysokich kosztów wykrywa bardzo rozpowszechnione w genomie mutacje punktowe. Mutacje tego typu często występują w obszarach kodujących genomu.

Techniką, która łączy w sobie wykorzystanie aktywności enzymów restrykcyjnych oraz właściwości replikacyjne polimerazy jest AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Enzymy restrykcyjne trawią matrycowe DNA na fragmenty, które później są poddawane amplifikacji specyficznej i niespecyficznej [35]. Do lepkich końców powstałych w efekcie trawienia enzymami tnącymi na lepko, następuje przyłączenie adaptorów o znanej sekwencji, co umożliwia projektowanie specyficznych starterów, w których, tylko kilka ostatnich nukleotydów dobieranych jest losowo, żeby ograniczyć ilość amplifikowanych fragmentów. W pierwszej turze amplifikacji, czyli w amplifikacji niespecyficznej starter przyłącza się do adaptera i miejsca restrykcyjnego. W specyficznej amplifikacji wykorzystuje się starter który na końcu 3', posiada od 2 do 4 specyficznych nukleotydów. Produkty rozdzielane są na żelu poliakrylamidowym, i uwiadczniane poprzez barwienie srebrem lub autoradiograficznie. Metoda ta nie wymaga znajomości badanych sekwencji. Charakteryzuje się wysoką rozdzielczością wzorów prążkowych, oraz wysoką powtarzalnością [4].

4. Technologia DArT

Technologią nowej generacji opartą na mikromacierzach jest DArT (*Diversity Arrays™ Technology*). Metoda ta w swoich założeniach podobna jest do metody AFLP i podobnie jak ona nie wymaga znajomości

badanych sekwencji. Metoda ta jest również pozbawiona niektórych ograniczeń AFLP. DArT jest metodą stosowaną głównie do wykrywania różnic genetycznych pomiędzy genotypami. Początkowo zastosowano ją do oceny polimorfizmu DNA pomiędzy odmianami ryżu i pszenicy, ale obecnie technologia ta może być stosowana do prawie wszystkich gatunków roślin i zwierząt. Metoda łączy w sobie oprócz analizy restrykcyjnej i amplifikacji PCR, również techniki hybrydizacyjne z technologią mikro-macierzy [25]. Dostarcza ona dużej liczby markerów dominujących w jednym eksperymencie bez wstępnych informacji na temat sekwencji DNA [36]. Źródłem zmienności identyfikowanej z użyciem metody DArT, są polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP), sekwencje powtórzone, zmiany wzorów metylacji DNA w obrębie miejsc restrykcji, rozpoznawanych przez stosowane endonukleazy restrykcyjne (zazwyczaj *Pst*I). Pewnym ograniczeniem w technologii DArT, jakim jest konieczność tworzenia bibliotek genomowych, dla gatunków których analiza prowadzona jest po raz pierwszy tą metodą. Technologia DArT charakteryzuje się dużą powtarzalnością uzyskanych wyników do 99,8%, oraz wydajnością umożliwiającą uzyskanie od kilkuset do kilku tysięcy markerów [7]. Ilość otrzymanych markerów zależy od zróżnicowania badanego materiału [37, 38]. DArT wykorzystuje się głównie do ustalenia profilu genomu i analizy różnorodności organizmów, selekcji genomowej, mapowania genomów i tworzenia map genetycznych, oceny różnorodności genetycznej, czy też identyfikacji odmian roślin. Znalazła zastosowanie w badaniu czystości genetycznej, identyfikacji cech ilościowych (QTL), oraz określaniu sprzężenia cech i korelacji marker-cecha [39]. Bardzo ważną zaletą technologii DArT jest dbałość o jej rozwój [7]. Do osiągnięć uzyskanych tą metodą, można zaliczyć przygotowanie, bądź zagęszczenie markerami DArTmap genetycznych jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [40], pszenicy heksaploidalnej (*Triticum aestivum*) [37, 41], pszenicy tetraploidalnej (*Triticum durum*) [42-44], żyta (*Secale cereale*) [45], owsa (*Avena sativa*) [25], sorga (*Sorghum*) [46] oraz rajgrasu (*Arrhenatherum*) [47]. Wiedza ta pozwala na opracowanie map dla nowych populacji mapujących i usprawnia opracowanie nowych markerów cech użytkowych.

Początkowym etapem technologii DArT jest stworzenie biblioteki genomowej badanego gatunku. W tym celu pozyskujemy formy badanego gatunku reprezentujące odmienne pule genowe. Najczęściej są to linie wsobne i odmiany o zróżnicowanym pochodzeniu genetycznym. Z DNA genomowego każdego organizmu otrzymuje się zbiór fragmentów będący wzorcem tych genotypów. Aby uzyskać fragmenty można wykorzystać wiele metod, jednak najczęściej stosuje się parę enzymów *Pst*I/*Tag*I. Fragmenty DNA są następnie ligowane z odpowiednimi adapterami, potem amplifikowane oraz klonowane. Klony z wbudowanymi insertami stanowią

bibliotekę. Do standardowo prowadzonych analiz na podstawie biblioteki przygotowuje się mikromacierz, która jest zbiorem sond do hybrydyzacji. Sekwencje reprezentowane przez dane klony amplifikuje się w reakcji PCR, a uzyskane amplikony po wysuszeniu i oczyszczeniu są zawieszane w buforze, który pozwala na drukowanie ich na szklanych płytkach, co odbywa się za pomocą urządzenia MicroGridIIarrayer (Biorobotics). Na jednej płytce mieści się łącznie 15360 sond DNA, i drukowane są dwie takie płytki. Jedna płytka umożliwia analizę polimorfizmu DNA tylko jednego osobnika. Cały proces sterowany jest komputerowo, a rozmieszczenie poszczególnych sond na płytce zapisane jest w odpowiednim programie komputerowym [7]. W podobny sposób do tworzenia biblioteki, następuje przygotowanie prób do analizy. DNA poddaje się trawieniu przez enzymy restrykcyjne, a następnie reakcji PCR, przy czym uzyskane fragmenty dodatkowo znakuje się fluorescencyjnie. Wykorzystuje się do tego Cy5 maximum absorpcji 633 nm oraz Cy3 o maximum absorpcji 543 nm [39]. Barwnikiem FAM znakuje się sekwencje wektora znajdujące się w buforze, w celu sprawdzenia jakości mikromacierzy [7]. Dalszym etapem jest hybrydyzacja badanych prób DNA z mikromacierzą. Próby zawieszane w buforze do hybrydyzacji poddaje się denaturacji i nanosi na szkiełka mikromacierzowe. Po hybrydyzacji następuje płukanie płytki specjalnymi roztworami, co ma na celu usunięcie nie związanego DNA. Ostatnim etapem jest zeskanowanie konfokalnym skanerem laserowym Tecan LS300 otrzymanych mikromacierzy. Analiza obrazu sygnałów fluorescencyjnych dokonywana jest za pomocą komputera i specjalnie opracowanego programu DArTsoft. Opracowanie wyników polega na ocenie i porównaniu intensywności fluorescencji, będącej efektem skutecznej hybrydyzacji oraz ocenie parametrów związanych z jakością mikromacierzy. Uzyskane wyniki zapisywane są ostatecznie w systemie 0-1, w którym jedynka oznacza obecność sygnału markera, zaś zero jego brak. W celu uzyskania większej liczby polimorficznych markerów DArT na etapie budowy biblioteki, zarówno jak i przygotowania prób analizowanego materiału badawczego, można stosować równolegle kilka różnych kombinacji enzymów restrykcyjnych [48].

Podstawowym i najczęściej stosowanym wariantem technologii DArT jest trawienie DNA za pomocą kombinacji enzymów restrykcyjnych, ligacji adaptorów do otrzymanych końców i specyficznej amplifikacji tych fragmentów, które uległy ligacji [7]. Polimorfizm identyfikowany w technologii DArT jest wysoce powtarzalny dzięki dokładności z jaką enzymy restrykcyjne wykrywają zmiany nukleotydowe w miejscach restrykcyjnych [37]. Zmiana kombinacji enzymów pozwala osiągnąć lepsze wyniki, dzięki zastosowaniu wrażliwego na metylację enzymu *PstI* w połączeniu z często tnącymi *TaqI*, *AluI*, *MseI*, zlokalizowaniu ulegającym markery DArT, głównie

w miejscach genomu ulegających ekspresji [7]. Innym wariantem technologii DArT jest DArT-BSA, czyli szybka identyfikacja markerów sprzężonych z wybraną cechą (Bulked Seregant Analysis) [49]. Celem metody jest wyłonienie markerów różnicujących pule zbiorcze, z dwóch pul zbiorczych osobników wywodzących się z tej samej segregującej populacji, ale reprezentujących dwa różne warianty cech. Taka modyfikacja metody pozwala na skrócenie analiz w porównaniu z klasyczną budową mapy genetycznej, aby uzyskać markery sprzężone z fenotypem [4]. Gdy frekwencja polimorfizmu jest niewystarczająca, na przykład w przypadku roślin o bardzo dużych i skomplikowanych genomach, czy też w przypadku niewielkiego zróżnicowania, opracowano metodę wzbogacenia markerów. Wykorzystuje ona technikę SSH (*Suppression Subtractive Hybridization*) polegającą na regulacji kinetyki procesu hybrydyzacji oraz selektywnej amplifikacji danych fragmentów DNA. Metodę tę opracowano dla trzciny cukrowej (*Saccharum officinarum* L.) o dużej liczbie chromosomów od 100 do 120 [38]. Wariant technologii DArT sprawdził się także w przypadku ewolucyjnych badań paproci i mchu. Ponadto technologia DArT w połączeniu z innymi typami markerów (AFLP, SSR, RAPD i in.) znalazła swoje zastosowanie w konstrukcji silnie zagęszczonych map genetycznych, jak również w identyfikacji QTL [7].

5. Podsumowanie

Technologia Diversity Arrays może być efektywnie i skutecznie wykorzystana do analizy genomów, oceny podobieństwa genetycznego oraz mapowania genetycznego [7]. Markery DArT pozwalają na konstrukcje wysoko zagęszczonych map genetycznych, dzięki wysokiej wydajności generowania markerów w jednym eksperymencie (nawet od kilkuset do kilkunastu tysięcy). Użycie dużej ilości sond pozwala na identyfikację różnic, nawet w przypadku organizmów silnie ze sobą spokrewnionych. Niewątpliwie w przypadku rodzaju *Avena*, charakteryzującym się złożoną strukturą genomową konieczne jest użycie dużej ilości markerów [22]. Dlatego też metoda DArT jest dobrym rozwiązaniem do identyfikacji polimorfizmu w obrębie tego rodzaju, oraz w przypadku wielu innych badań nad roślinami uprawnymi.

Oprócz dużego wkładu tej metody w konstruowanie map genetycznych wielu gatunków oraz opracowanie markerów dla różnorodnych cech użytkowych, najważniejszym wydaje się możliwość porównywania wyników uzyskiwanych przez różne zespoły badawcze i wspólna analiza takich danych. Warunkuje to rozbudowana infrastruktura informatyczna rozwijana równoległe z unowocześnianiem technologii genotypowania, a także bardzo rygorystyczne przestrzeganie metodyki, zapewniające powtarzalność

eksperymentu. Metoda DArT jest ponadto opatentowana i wykonywana tylko w jednym laboratorium na całym świecie, co również wpływa na powtarzalność wyników. Metoda DArT nie wymaga znajomości sekwencji badanych obiektów.

Jednakże metoda DArT posiada także swoje wady, jakim jest na przykład konieczność tworzenia bibliotek genomowych dla gatunków po raz pierwszy analizowanych tą metodą. Nie pozwala ona na odróżnianie od siebie homozygot i heterozygot, co wiąże się z dominującym charakterem sond DArT [38]. Ponadto sondy DArT pozostają anonimowe dopóki nie zostaną zsekwencjonowane. Niekiedy dostęp do sekwencji sond jest utrudniony. W przypadku owsa zsekwencjonowano mniej niż 10% dostępnych sond.

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione wady i zalety technologii DArT, można uznać, że istnieją solidne argumenty przemawiające za wyborem tej metody do analizy genomów owsa.

Literatura

1. Gąsiorowska B., Cybulska A. *Owies – skarb zapomniany*, Poradnik Gospodarski marzec (2012), s. 12-13
2. Rasane, P., Jha, A., Sabikhi, L., Kumar, A., Unnikrishnan, V. S. *Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods-a review*. Journal of food science and technology, 52(2) (2015), s. 662-675
3. Daou C., Zhang H. *Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases*, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Vol. 11. (2012), s. 355-365
4. Sztuba-Solińska J. *Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin*. Kosmos, 54 (2-3) (2005), s. 227-239
5. Turner P. C., McLennan A. G., Bates A. D., White M. R. H. *Analiza i zastosowanie klonowanego DNA*. Biologia molekularna. Krótkie wykłady. PWN.,(2011), s.162-166
6. Calonje M., Martin-Bravo S., Dobes C., Gong W., Jordon-Thaden I., Kiefer M., Paule J., Schmickl R., Koch A. M. *Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction*. Plant Systematics and Evolution. 282 (2008), s.257-280
7. Seroczyńska A., Kilian A. *Technologia DArT – nowe narzędzie do analizy zmienności genetycznej*. Zeszyty problemowe postępów nauk rolniczych, 555 (2010), s. 373-388
8. Frey L., Rutkowski L. *Wykaz gatunków (suplement 3)*. Polska księga traw., (2002), s. 87-95
9. USDA. *World Production, Markets, and Trade Reports*, United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service., August (2016)
10. Leszczyńska D., Hołubowicz Kliza G. *Uprawa i wykorzystanie owsa nieoplewionego*. Instrukcja Upowszechnieniowa. Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach., 149(2008), s.1-24

11. Kozłowska-Ptaszyńska Z., Pawłowska J. *Technologie Uprawy Roślin Owies*. Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa. (1997), s. 3-19
12. Rajhathy T., Thomas H. *Cytogenetic od Atos (Avena L.)*. Miscellaneous publications of the Genetics Society., (1974)
13. Morikawa T., Nishihara M. *Genomic and poliploid evolution in genus Avenaas revealed by RFLPs of repeated DNA sequences*. Genes& Genetic Systems., 84, (2009), s. 199-208
14. Peng Y.-Y., Baum B. R., Ren C.-Z., Jiang Q.-T., Chen G.-Y., Zheng Y.-L., Wei Y.-M. *The evolution pattern of rDNA ITS in Avenaand phylogenetic relationship of the Avena species* (Poaceae: Aveneae), Hereditas., 147 (2010), s. 183-204
15. Paczos-Grzęda E. *Systematyka, ewolucja i cytogenetyka gatunków z rodzaju Avena L*. Wiadomości botaniczne., 47 (1/2) (2003), s. 7-17
16. Zeller F. *J.Nutzung des genetischen Potentials der Avena-WildartenzurVerbesserung des Saathafers(Avena sativa L.)*. Journal of Applied Botany., 72(1998), s. 180-185
17. Chrzęstek M., Paczos-Grzęda E., Kruk K. *Ocena zróżnicowania genetycznego polskich odmian owsa (Avenasativa L.)*, ActaAgrophysica., 8(2) (2006), s. 319-326
18. Loskutov I. G. *On evolutionary pathways of Avenaspecies*. Genetic Resources and CropEvolution., 55 (2008), s. 211-220
19. Loskutov I. G. *Interspecific crosses in the genus AvenaL*. Russian Journal of Genetics., 37 (2001), s. 467-475
20. Chrzęstek M., Kruk K., OkoN S., Paczos-Grzęda E., Wójtowicz E. *Ocena mieszańców BCI (AvenasativaL. × AvenamaroccanaGdgr.) × AvenasativaL. pod względem stabilności cytogenetycznej i wybranych cech ilościowych*. BiuletynInstytutuHodowliiAklimatyzacjiRoślin., 253 (2009), s. 193-203
21. Leggett J. M. *Using and conserving Avenagenetic resources*. Oat Conference Canada V2., (1996), s. 128-132
22. Paczos-Grzęda E. *Zastosowanie RAPD i SSR do oceny podobieństwa genetycznego tetraploidalnych gatunków z rodzaju Avena L*. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin., 252 (2009), s. 226-234,
23. Rodinov A. V., Tyupa N. B., Kim E. S., Machs E. M., Loskutov I. G. *Genomic Configuration of the Autotetraploid Oat Species Avenamacrostachya Inferred from Comparative Analysis of ITS1 and ITS2 Sequences: on the Oat Karyotype Evolution during the Early Events of the AvenaSpecies Divergence*. Russian Journal of Genetics., 41 (5) (2005), s. 518-528
24. Fu Y. B., Williams D. J. *AFLP variation in 25 Avenaspecies*. Theoretical and Applied Genetics., 117 (2008), s. 333-342
25. Tinker N. A., Kilian A., Wight C. P., Heller-Uszyńska K., Wenzl P., Rines H. W., Bjornstad A., Howarth C. J., Jannink J. L., Anderson J. M., Rosnagel B. G., Stuthman D.D., Sorrelles M. E., Jaskson E. W., Tuvevsson S., Kolb F. L., Olsson O., Federizzi L. C., Carson M. L., Ohm H. H., Molnar S. J., Scoles G. J., Eckstein P. E., Bonman J. M., Ceplitis A., Longdon T. *New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplam characterization*. BioMedCentral Genomics., 10 (2009), s. 39-40
26. Todorovska E., Abumhadi N., Kamenarova K., Zheleva A., Kostova A., Christov N., Alexandrova N., Jacquemin J-M., Anzai H., Nakamura C., Atanassov A.

- Biotechnological approaches for cereal crops improvement Part II: Use of molecular markers in cereal breeding*. Biotechnology & Biotechnological Equipment., 19 (2005)
27. Świącicki W. K., Surma M., Koziara W., Skrzypczak G., Szukała J., Bartkowiak-Broda I., Zimny J., Banaszak Z., Marciniak K. *Nowoczesne technologie w produkcji roślinnej – przyjazne dla człowieka i środowiska*, Polish Journal of Agronomy., 7 (2011), s. 102-112
 28. Avise J. C. *Markery molekularne, historia naturalna i ewolucja*, Techniki molekularne., (2008), s. 52-106
 29. Buchowicz J. *Enzymy restrykcyjne - klucz do poznania genomu i manipulowania genami*. Biotechnologia molekularna. Geneza, przedmiot, perspektywy badań i zastosowań., (2006), s. 19-23
 30. Schulman A. H. *Molecular markers to assess genetic diversity*, Euphytica., 158 (2007), s.313-321
 31. Nowakowska J. A. *Zastosowanie markerów DNA (RAPR, SSR, PCR-RFLP i STS) w genetyce drzew leśnych, entomologii, fitopatologii i łowiectwie*. Leśne prace badawcze., 1 (2006), s. 73-101
 32. Malepszy S. *Weryfikacja mieszańców otrzymanych komórek*. Biotechnologia roślin., (2009), s.66-69
 33. Agarwal M. *Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences*, Plant Cell Reports., 27 (2008), s. 617-631
 34. Rakoczy-Trojanowska M., Bolibok H., *Characteristic and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants*, Cellular and Molecular Biology Letters, 9 (2005), s. 221-238
 35. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Rejans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*, Nucleic Acid Research., 23 (1995), s. 4407-4414
 36. Kilian A., Huttner E., Wenzl P., Jaccoud D., Carling J., Caig V., Evers M., Heller- Uszyńska K., Cayla C., Patarapuwadol S., Xia L., Yang S., Thomson B. *The fast and the cheap: SNP and DArT- based whole genome profiling for crop improvement*, Avenue Media., (2005), s. 443-461
 37. Akbari M., Wenzl P., Vanessa C., Carling J., Xia L., Yang S., Uszynski G., Mohler V., Lehmsiek A., Kuchel H., Hayden M. J., Howes N., Sharp P., Rathmell B., Vaughan P., Huttner E., Kilian A. *Diversity Arrays Technology (DArT) for high-throughput profiling of hexaploid wheat genome*, Theoretical and Applied Genetics., 113 (2006), s. 1409-1420
 38. Heller- Uszyńska K., Uszyński G., Huttner E., Evers M., Carling J., Caig V., Aitken K., Jackson P., Pimperdis G., Cox M., Gilmour R., D'Hont A., Butterfield M., Glaszmann J. Ch., Kilian A. *Diversity Arrays Technology (DArT) effectively reveals DNA polymorphism in a large and complex genome of sugarcane*, Molecular Breeding., 28 (2009), s. 37-55
 39. Raman H., Raman R., Nelson M. N., Aslam M. N., Rajasekarn R., Wratten N., Cowling W. A., Kilian A., Sharpe A. G., Schondelmaier J. *Diversity Arrays Technology Markers: Genetic Diversity Analyses and Linkage Map Construction in Rapeseed (Brassica napusL.)*, DNA Research., 19 (2012), s. 51-65

40. Hearnden P. R., Eckermann P. J., McMichael G.L., Hayden M. J., Eglinton J. K., Chalmers K. J. *A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross*, *Theoretical and Applied Genetics.*, 115 (2007), s. 383-391
41. Paux E., Sourdille P., Salse J., Saintenac C., Choulet F., Leroy P., Korol A., Michalak M., Kilian S., Spielmeyer W., Lagudah E., Somers D., Kilian A., Alaux M., Vautrin S., Bergs H., Eversole K., Appels R., Safar J., Simkova H., Dolezel J., Bernard M., Feuillet C. *A physical map of the 1 gigabase bread wheat chromosome 3B*, *Science.*, 322(5898) (2008), s.101-104
42. Mantovani P., Maccaferri M., Sanguineti M.C., Tuberosa R., Catizone I., Wenzl P., Thomson B., Carling J., Huttner E., Deambrogio E., Kilian A. *An integrated DArT-SSR linkage map of durum wheat*, *Molecular Breeding.*, 22(4) (2008), s.629-648
43. Peleg Z., Saranga Y., Suprunova T., Ronin Y., Roder M. S., Kilian A., Korol A. B., Fahima T. *High-density genetic map of durum wheat x wild emmer wheat based on SSR and DArT markers*, *Theoretical and Applied Genetics.*, 117 (2008), s. 103-115
44. Jing H. C., Bayon C., Kanyuka K., Berry S., Wenzl P., Huttner E., Kilian A., Hammond-Kosak K. *DArT markers: diversity analyses genomes comparison, mapping and integration with SSR markers in Triticum monococcum*, *BioMedCentral Genomics.*, 10 (2009), s. 458
45. Bolibok-Bragoszewska H., Heller-Uszyńska K., Wenzl P., Uszyński G., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. *DArT markers for the rye genome – genetic diversity and mapping*, *BioMedCentral Genomics.*, 10 (2009), s. 578
46. Mace E. S., Rami J. F., Bouchet S., Klein P. E., Klein R. P., Kilian A., Wenzl P., Xia L., Halloran K., Jordan D. R. *A consensus genetic map of sorghum that integrates multiple component maps and high – throughput Diversity Array Technology (DArT) marker*, *BioMedCenter Plant Biology.*, 9 (2009), s.13
47. Kopecky D., Bartos J., Łukaszewski A. J., Baird J. H., Cernoch V., Kolliker R., Rognli O. A., Blois H., Caig V., Lubberstedt T., Studer B., Shaw P., Dolezel J., Kilian A. *Development and mapping of DArT markers within Festuca-Lolium complex*, *BioMedCenter Genomics.*, 10 (2009), s. 473
48. Wenzl P., Raman H., Wang J., Zhou M., Huttner E., Kilian A. *A DArT platform for quantitative bulked segregant analysis*, *BioMedCenter Genomics.*, 8 (2007), s. 196
49. Vishwakarma M. K., Pandey M. K., Shasidhar Y., Manohar S. S., Nagesh P., Janila P., Varshney R. K. *Identification of two major quantitative trait locus for fresh seed dormancy using the diversity arrays technology and diversity arrays technology-seq based genetic map in Spanish-type peanuts*, *Plant Breeding.*, 135(3) (2016), s. 367-375

Wykorzystanie metody DArT do identyfikacji sekwencji specyficznych rodzaju *Avena*

Streszczenie

Potencjał owsa w żywieniu człowieka jest wciąż niewykorzystany. Owies jest bogaty w składniki odżywcze, szczególnie w białko, może być także stosowany jako żywność funkcjonalna w leczeniu ludzi np. do obniżania poziomu cholesterolu w surowicy krwi. Analiza struktury genomów oraz genów cech ilościowych i jakościowych ma obecnie znaczenie ekonomiczne w produkcji gatunków uprawnych w tym na przykład owsa. Ze względu na rozmiary i złożoność genomów roślinnych coraz częściej stosuje się metody markerowe z wykorzystaniem płytek mikromacierzowych. Jedną z takich metod jest DArT (*Diversity Arrays™ Technology*), która pozwala na wykrycie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP), sekwencji powtórzeń czy też wzorów metylacji DNA w obrębie miejsc restrykcyjnych. Metoda ta pozwala na szybką identyfikację za pomocą ogromnej ilości markerów, bez konieczności posiadania informacji o sekwencji DNA.

Słowa kluczowe: owies, *Avena*, DArT, Diversity Arrays

Identification of specific sequence in genus *Avena* using DArT technology

Abstract

The potential of oats in humans nutrition is not used enough. Oats are a rich source of nutrient ingredients especially of protein, it can be also used as functional food to improve human health for example to reduce level of cholesterol. Analysis of genome structure and genes responsible for quantitative and qualitative characteristics currently proves that it has economic importance in the production of cultivated plants such as oats. Due to the large size and complexity of plants genomes increasingly more and more often are applied of microarray-based molecular markers. One of them is DArT, which has been applied in detection of single-nucleotide polymorphisms (SNP), repeated sequence or pattern of DNA methylation in restriction fragments. Method provides fast identification thanks to a complete set of markers, without knowing the sequence of DNA.

Keywords: oat, *Avena*, DArT, Diversity Arrays

Indeks autorów

Giermasińska K.	48	Łobocka M.	48
Gil M.	92	Maciołek U.	7
Gustaw K.	191	Molcan T.	122
Jastrzębski J.P.	122	Myszczyński K.	122
Kalembkiewicz J.	7	Pasieczna-Patkowska S.	164
Kapelewska J.	151	Paukszto Ł.	122
Karpińska J.	151	Podgórska I.	111
Kazimierczak W.	68	Półtorak A.	84
Knapik A.	141	Rudy M.	92
Kocyan B.	141	Ruman T.	21
Kosińska M.	7	Rupniewski J.	175
Kotowska U.	151	Sajnaga E.	68
Kozieł M.	32	Skowronek M.	68
Kozłowska M.	141	Stanisławczyk R.	92
Kuźniar A.	7	Szady A.	164
Laskowska B.	21	Waśko A.	191
Laskowski M.	21	Wiater A.	68
Lewandowska A.	21		