



OSIĄGNIĘCIA I PERSPEKTYWY BADAWCZE
Z ZAKRESU
NAUK PRZYRODNICZYCH

Redakcja:
Monika Maciąg, Alicja Danielewska

Lublin 2023

Osiągnięcia i perspektywy badawcze z zakresu nauk przyrodniczych

Osiągnięcia i perspektywy badawcze z zakresu nauk przyrodniczych

Redakcja:
Monika Maciąg
Alicja Danielewska

Lublin 2023

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdeczne podziękowania
zespółowi Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. inż. Anna Karczewska
- dr hab. inż. Urszula Malaga-Toboła, prof. UR
- dr hab. Bartosz Piechowicz, prof. UR
- dr hab. Ireneusz Stefaniuk, prof. U. Rz.
- dr inż. Radosław Barczak
- dr inż. Marta Biegańska
- dr n. o zdr. Mariola Janiszewska
- dr Magdalena Kotowska
- dr Agnieszka Richert
- dr inż. Amelia Staszowska
- dr inż. Katarzyna Szcześniak

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Monika Maciąg

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

Korekta:
Małgorzata Gabrys

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

ISBN 978-83-67881-32-6

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

Spis treści

Daria Bożejewicz

Miniprzegląd naturalnych i syntetycznych adsorbentów stosowanych podczas usuwania jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wodnych roztworów 7

Natalia Festinger, Magdalena Olak-Kucharczyk, Kamila Koszelska

Remediacja gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi 22

Katarzyna Samborska-Goik

Identyfikacja źródeł zanieczyszczeń w wodach na podstawie badań izotopowych azotu i siarki oraz modelowania matematycznego 39

Sylwia Andrzejczak-Grządko, Anna Boska

Czy *Photobacterium* spp. izolowane z mięsa stanowią zagrożenie dla zdrowia? 57

Michalina Warecka, Marta Wiejak, Katarzyna Chadryś, Ewa Adamek

Obecne i potencjalne zastosowanie wydzielin ślimaków oraz izolowanych z nich substancji bioaktywnych w medycynie i kosmetyce 67

Barbara Sensuła

Stan badań interdyscyplinarnych zmienności składu pierwiastkowego i izotopowego drzewostanów sosny zwyczajnej w województwie śląskim i opolskim..... 86

Wojciech Cież

System UNI-BUS firmy Elplant sp. z o.o. jako przykład innowacji, intuicyjności i wydajności w rolnictwie 100

Barbara Laskowska, Marek Laskowski, Anna Lewandowska, Tomasz Lewandowski, Jaromir Lechowicz

Dendrymery jako nanocząsteczki pełniące rolę nośników wybranych substancji i ich zastosowanie praktyczne 110

Justyna Jońca, Urszula Miller, Izabela Sówka

Przykłady zastosowań wybranych metod sensorycznych i analitycznych w ocenie oddziaływania zapachowego 121

Zofia Łapińska, Urszula Szwedowicz, Szymon Kowalski, Julia Karska, Julita Kulbacka

Potencjał leczniczy nutraceutyków wobec kancerogennego działania smogu..... 140

Regina Janas, Mieczysław Grzesik, Aleksandra Wojska, Katarzyna Traczyk Innowacyjne metody ekologicznej produkcji nasion roślin warzywnych	157
Magdalena Stawiarz Sekwencjonowanie nowej generacji – historia, przebieg procesu i rodzaje sekwencjonowania	172
Tadeusz Jasiński, Mateusz Drąg, Krystyna Zembrowska, Ireneusz Kaczmar, Marian Kuzma Fizyczne podstawy tomografii NMR	179
Indeks Autorów	201

Miniprzegląd naturalnych i syntetycznych adsorbentów stosowanych podczas usuwania jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wodnych roztworów

1. Wprowadzenie

Zanieczyszczenie wód może być wynikiem naturalnie występujących procesów lub skutkiem działalności człowieka. Znaczna ilość zanieczyszczeń organicznych oraz nieorganicznych przedostaje się do wód powierzchniowych ze źródeł punktowych i rozproszonych, wpływając tym samym na jakość wód słodkich [1]. Ze względu na swoje szczególne właściwości woda jest nie tylko bardzo dobrym rozpuszczalnikiem, ale również „adsorberem” związków organicznych i nieorganicznych, w tym często toksycznych, które związane z wodą występują w postaci wodnych roztworów, roztworów koloidalnych lub zawiesin [2]. Na szczególną uwagę zasługują obecne w wodach i ściekach jony metali ciężkich, w tym jony ołowiu i rtęci. Jony ołowiu oraz rtęci należą do jednych z najbardziej toksycznych związków, zagrażających zdrowiu oraz życiu flory i fauny. Zarówno ołów, jak i jego związki już w niskich stężeniach mogą powodować niekorzystne skutki dla procesów metabolicznych organizmów żywych, np. zaburzając funkcję układu nerwowego, czynności nerek, a także powodując nadciśnienie tętnicze [3]. Źródłem jonów ołowiu(II) w środowisku wodnym jest głównie przemysł galwaniczny, petrochemiczny oraz elektrotechniczny (np. produkcja baterii) [4]. Jony Pb(II) bardzo trudno ulegają rozkładowi przez mikroorganizmy w środowisku wodnym, wobec tego są bioakumulowane przez zwierzęta i rośliny, a do organizmu człowieka przedostają się przede wszystkim poprzez wodę pitną [5]. Podobnie jak ołów rtęć nawet w niskich stężeniach może uszkadzać układ nerwowy i odpornościowy, a także serce, nerki i płuca. Głównym źródłem rtęci i jej związków w zbiornikach wodnych są zwiędzłe skały i gleby oraz działalności człowieka (np. spalanie węgla, produkcja cementu, chloru itp.) [6]. Rtęć nie ulega biodegradacji, a w środowisku naturalnym w wyniku różnych procesów chemicznych i biologicznych może być przekształcana w bardziej toksyczną formę, np. niektóre mikroorganizmy metylujące bioprzetwarzają rtęć nieorganiczną (Hg^{2+}) w bardziej toksyczną organiczną formę rtęci (H_3C-Hg^+) [7]. Według Światowej Organizacji Zdrowia oraz polskiego prawa dopuszczalne stężenie jonów Pb(II) w wodzie pitnej wynosi $10 \mu l/dm^3$, a jonów Hg(II) $1,0 \mu l/dm^3$, stąd konieczne jest usuwanie tych toksycznych metali ciężkich z wód i ścieków [8]. Obecnie znanych jest wiele metod usuwania jonów metali z wodnych roztworów, takich jak np. strącanie chemiczne, wymiana jonowa, procesy membranowe czy adsorpcja [9], przy czym adsorpcja uważana jest za najskuteczniejszą z metod stosowanych podczas usuwania jonów metali, w tym jonów ołowiu(II) i rtęci(II), z roztworów wodnych [10]. Wynika to przede wszystkim z właściwości stosowanych adsorbentów oraz stosunkowo prostej i taniej technologii, podczas której nie powstają szkodliwe substancje [11, 12].

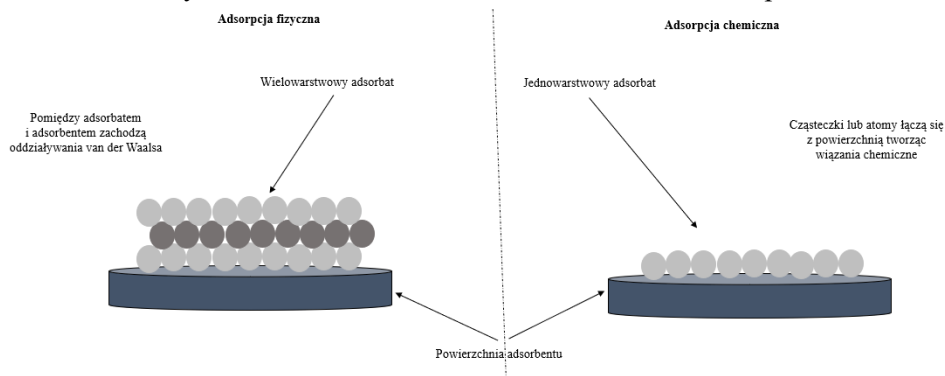
¹ Daria.Bozejewicz@pbs.edu.pl, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Politechnika Bydgoska im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich, www.pbs.edu.pl.

W niniejszej pracy przedstawiono najnowsze doniesienia literaturowe dotyczące usuwania jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wodnych roztworów za pomocą naturalnych adsorbentów, pozyskiwanych np. z odpadów rolniczych i zwierzęcych, a także adsorbentów modyfikowanych chemicznie.

2. Charakterystyka procesu adsorpcji jonów metali z wodnych roztworów

Proces adsorpcji polega na wiązaniu cząsteczek substancji adsorbowanej (np. jonów metali) na powierzchni innej substancji (adsorbent). Mechanizm procesu adsorpcji jonów metali zależy od właściwości fizycznych i chemicznych adsorbentu oraz separowanego jonu metalu, a przebieg tego procesu od właściwości roztworu (pH roztworu, siły jonowej) oraz od temperatury, ponieważ wszystkie procesy adsorpcyjne są egzotermiczne [13]. Bradl wskazuje na dwa różne podejścia umożliwiające adsorpcję metali ciężkich oparte na modelu empirycznym lub semiempirycznym czy mechanistycznym. Model empiryczny dotyczy badań eksperymentalnych procesu adsorpcji, przy czym parametry eksperymentu dostosowuje się do ograniczonej liczby zmiennych, np. równowagowego stężenia jonów metali w fazie ciekłej. Natomiast model mechanistyczny lub półempiryczny dotyczy opisu matematycznego ustalonej równowagi połączonej bilansami masowymi różnych składników i efektami ładunku powierzchniowego, przy czym modele mechanistyczne obejmują zagadnienia elektrostatyczne, a modele empiryczne – nie [14].

Podczas adsorpcji jonów metali z wodnych roztworów wyróżnia się adsorpcję fizyczną oraz redukcję chemiczną (rys. 1). Adsorpcja jonów metali może obejmować różne mechanizmy w zależności od składników roztworu i wartości pH.



Rysunek 1. Schemat procesu adsorpcji fizycznej i chemicznej. Źródło: opracowanie własne na podstawie [15]

Do adsorpcji fizycznej, czyli procesu, w którym rzadko zmienia się budowa atomu lub cząsteczki, zalicza się proces chelatacji, oddziaływań elektrostatycznych oraz wymiany jonowej. Chelatacja to proces wiązania jonów i cząsteczek adsorbentu z jonami metali obecnymi w roztworze [16]. Natomiast kompleksowanie kationów metali przez adsorbenty może skutkować tworzeniem się kompleksów anionów metali, wówczas zostanie zmieniony mechanizm chelatacji na mechanizm elektrostatycznego przyciągania protonowanych grup funkcyjnych [17, 18]. Ponadto proces adsorpcji jonów metali może zachodzić na drodze wymiany jonowej między dwoma elektrolitami lub między elektrolitem a kompleksem. Jest to proces odwracalny, a adsorbent może być regenerowany lub ładowany żądanymi jonami poprzez przemywanie nadmiarem tych jonów [18]. Natomiast proces adsorpcji według mechanizmu redukcji chemicznej stosuje się, aby wskazać

wytrączenia, które występują na powierzchni adsorbentu lub w porach adsorbentu w procesie adsorpcji, co można zaobserwować np. podczas adsorpcji jonów złota(III) czy chromu(VI). Jednak redukcja chemiczna nie jest pożądanym zjawiskiem w procesie adsorpcji jonów metali, ponieważ zostają wówczas trwale zużywane grupy funkcyjne adsorbentu lub miejsca adsorpcji w reakcji redoks, tzn. adsorbenty po regeneracji będą wykazywały niższą efektywność [19, 20].

2.1. Parametry opisujące proces adsorpcji jonów metali w wodnych roztworach

Przeprowadzając proces adsorpcji jonów metali, należy określić zdolności sorpcyjne badanych materiałów. Po przeprowadzonych eksperymentach usuwania jonów metali z wodnych roztworów na podstawie bilansu masowego należy wyznaczyć pojemność sorpcyjną (q_e , mmol/g; równanie 1) oraz procent usunięcia jonów metali z roztworu wodnego ($\%R_s$, %; równanie 2) [21, 22].

$$q_e = \frac{M_0 - M_e}{m} \cdot V \quad (1)$$

$$\%R_s = \frac{M_0 - M_e}{M_0} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie: M_0 i M_e to odpowiednio początkowe i równowagowe stężenie jonów metali w roztworze (mmol/dm³), V to objętość roztworu (dm³), m to masa materiału sorpcyjnego [21, 22].

Ponadto jony metali zaadsorbowane na powierzchni adsorbentu można z powodzeniem przenieść do innej fazy wodnej, a tym samym odzyskać jony metali związane z materiałem sorpcyjnym. Proces ten nazywa się desorpcją i umożliwia również regenerację sorbentu w celu wykorzystania danego sorbentu w kolejnych cyklach sorpcyjnych. Proces desorpcji opisuje się za pomocą efektywności desorpcji ($\%R_{des}$) według równania 3 [23].

$$\%R_{des} = \frac{M_e}{M_a} \cdot 100\% \quad (3)$$

gdzie: M_a i M_e to odpowiednio stężenie zaadsorbowanych jonów metali i stężenie równowagowe jonów metali [mol/dm³].

Proces adsorpcji jonów metali obecnych w wodnych roztworach zależy między innymi od stężenia jonów metali obecnych w roztworze, czasie kontaktu adsorbentu z separowanym jonem metalu, stężenia adsorbentu oraz pH roztworu.

Adsorpcja jonów metali z wodnych roztworów, np. ze ścieków, jest złożonym, ale ekonomicznym procesem ze względu na możliwość ponownego wykorzystania wody w zakresie kosztów początkowych, a także prostotę konstrukcji [11]. Wobec tego w ostatnich latach cieszy się coraz większym zainteresowaniem naukowców i praktyków, szczególnie w celu usunięcia toksycznych jonów metali, jak np. ołów(II) i rtęć(II), co zostało przedstawione w niniejszej pracy przeglądowej.

2.2. Charakterystyka pożądanego adsorbentu

Dobór odpowiedniego materiału adsorpcyjnego zależy przede wszystkim od separowanego jonu metalu, a także od właściwości fizycznych i chemicznych adsorbentu. Przede wszystkim na efektywność adsorbentu wpływa porowatość oraz rozkład wielkości porów w jego strukturze, a granice ich rozmiarów są ściśle określone przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC, ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*). Wyróżnia się zatem mikropory (poniżej 2 nm), mezopory (od 2 nm do 50 nm) oraz makropory (powyżej 50 nm). W odróżnieniu od płaskiej powierzchni adsorbentu adsorpcja w mikro- oraz mezoporach zachodzi efektywniej niż na płaskiej powierzchni adsorbentu, a w przypadku makroporów nie obserwuje się zmian [24]. Natomiast wśród właściwości chemicznych adsorbentu kluczową rolę w procesie adsorpcji jonów metali odgrywają grupy funkcyjne, które mogą pochodzić od stosowanego związku adsorbującego lub mogą zostać chemicznie związane z powierzchnią adsorbentu w wyniku późniejszych modyfikacji [25]. Niemniej jednak pożądane właściwości fizyczne efektywnego adsorbentu jonów metali to:

- duża pojemność sorpcyjna adsorbentu w stosunku do usuwanych jonów metali;
- stosunkowo silnie rozwinięta powierzchnia właściwa oraz rozkład rozmiarów wielkości porów adsorbentu;
- dobre właściwości mechaniczne, takie jak wytrzymałość i odporność na zniszczenie [26].

Natomiast do pożądanych właściwości chemicznych adsorbentów można zaliczyć nie tylko rodzaj obecnych grup funkcyjnych adsorbentu oraz stopień, w jakim te właściwości zmieniają się w kontakcie z roztworem, ale także stopień jonizacji na powierzchni adsorbentu [26].

Podczas procesu adsorpcji jonów metali ciężkich z wodnych roztworów stosuje się zarówno naturalne, jak i syntetyczne adsorbenty. Naturalne sorbenty to przede wszystkim odpady powstałe z przemysłu spożywczego, rolniczego i drzewnego, np. łuski orzechów, kora drzewna czy obierki z owoców i warzyw. Ponadto do usuwania jonów metali ciężkich z powodzeniem stosuje się naturalne polimery (chitozan, chitynę, celulozę, alginiany, pektyny czy ligninę), które wytwarzane są z odnawialnych zasobów organicznych [27-30]. Z kolei do syntetycznych adsorbentów zalicza się między innymi modyfikowany węgiel aktywny [31], modyfikowane zeolity, żywice, nanomateriały [32-34], a także syntetyczne materiały polimerowe [35, 36].

3. Powszechnie stosowane adsorbenty do usuwania jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wodnych roztworów

W ostatnich latach obserwuje się znaczący rozwój metod sorpcyjnych, szczególnie stosowanych w celu usuwania zanieczyszczeń, takich jak jony metali ciężkich, z wód powierzchniowych, gruntowych i ścieków. Naukowcy z powodzeniem poszukują nowych materiałów umożliwiających usunięcie jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wodnych roztworów, co zestawiono w tabeli 1.

*Miniprzegląd naturalnych i syntetycznych adsorbentów
stosowanych podczas usuwania jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wodnych roztworów*

Tabela 1. Porównanie efektywności wybranych naturalnych i syntetycznych, modyfikowanych oraz niemodyfikowanych adsorbentów stosowanych w celu usunięcia jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wodnych roztworów

Pb(II)							
Adsorbenty naturalne				Adsorbenty modyfikowane			
Adsorbent	q_e	Najważniejsze informacje dotyczące procesu sorpcji	Lit.	Adsorbent	q_e	Najważniejsze informacje dotyczące procesu sorpcji	Lit.
Polikarboksylo- wana bagassa z trzciny cukrowej (PBS)	241,2 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> PBS wytworzono w wyniku estyfikacji w jednym naczyniu, proces adsorpcji zachodzi głównie przez kompleksowanie wewnątrz sfery na PBS 	[37]	Celuloza z trzciny cukrowej modyfikowa- na CMC-Na	558,90 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> CMC-Na wykazuje wysoką zdolność sorpcyjną wobec jonów Pb(II) > Cu(II) > Ni(II) z jedno- składnikowych roztworów, w dwuskładnikowych układach obecność jonów Pb(II) zmniejszała sorpcję jonów Cu(II) 	[46]
Odpady z róży damasceńskiej	24,9 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> optymalne warunki prowadzenia procesu: pH = 6,5, czas kontaktu = 2 h, dawka adsorbentu 10 g/L, proces chemisorpcji jonów Pb(II) zachodził przez wiązanie-H 	[38]	Chitozan modyfiko- wany o- hydroksyfe- nylotiomoczn- ikiem (OTCS)	208,33 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> pole powierzchni OTCS wynosiło 43,1655 m²/g, optymalne warunki adsorpcji pH = 7, 303 K, reakcja przebiegała endotermicznie 	[47]
Roślina <i>Calligonum crinitum</i>	336,9 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> optymalne warunki procesu: pH = 5,5, temp. = 30°C, stężenie adsorbentu = 0,3 g/L, czas kontaktu = 20 min, mechanizm procesu: adsorpcja fizyczna 	[39]	Węgiel aktywowany cząstkami magnetyczny- mi (MAC-T)	253,2 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> wytworzono węgiel aktywny z cząstkami magnetycznymi MnFe₂O₄ (MAC-T), MAC-T wykazuje wysoką pojemność sorpcyjną wobec jonów Pb(II) i Cd(II) 	[48]
Włókno kokosowe	39,51 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> mechanizm adsorpcji: reakcja chemiczna, adsorpcja jednoetapowa, w procesie desorpcji najskuteczniejszy okazał się kwas cytrynowy i octowy 	[40]	FeMg- LDH@bento- nit	1397,62 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> wytworzono węgiel FeMg-LDH impregnowany bentonitem metodą wstąpienia <i>in situ</i>, FeMg-LDH@bentonit wykazuje wysoką pojemność sorpcyjną wobec jonów Pb(II) i Cd(II) 	[49]
Skorupy jaj kurzych	29,603 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> powierzchnia właściwa adsorbentu 9,80 m²/g, optymalne warunki procesu: pH = 5, czas kontaktu = 120 min, dawka adsorbentu 200 mg 	[41]	Magnetyczny bentonit (M- B)	80,40 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> ok. 98,9% szybkości usuwania jonów Pb(II) osiągnięto w ciągu 90 min trwania procesu, stężenie początkowe Pb(II) 200 mg/dm³, 10 g/dm³ M-B, pH = 5, 40°C 	[50]
Biowęgiel z owoców pomelo	90,3 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> optymalne warunki procesu: pH = 5, temp. = 303 K, czas kontaktu = 120 min, główne mechanizmy adsorpcji to wymiana jonowa i oddziaływanie elektrostatyczne 	[42]	Biowęgiel syntetyczny (BC)	100,25 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> powierzchnia właściwa BC wynosiła 499,2 m²/g, główne mechanizmy adsorpcji to oddziaływanie elektrostatyczne oraz kompleksowanie 	[50]

Biowęgiel z trzciny cukrowej (SC-BC)	86,96 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> biowęgiel SC-BC otrzymano w wyniku pirolizy biomasy w temp. poniżej 500°C, główne mechanizmy adsorpcji to wymiana jonowa oraz wytrącanie powierzchniowe 	[43]	Biowęgiel magnetyczny (M-BC)	64,13 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> pole powierzchni M-BC wynosiło 255,7 m²/g, główne mechanizmy adsorpcji to oddziaływania elektrostatyczne oraz kompleksowanie 	[51]
Biowęgiel ze skórki pomarańczy (OP-BC)	27,86 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> biowęgiel OP-BC otrzymano w wyniku pirolizy biomasy w temp. poniżej 500°C, główne mechanizmy adsorpcji to wymiana jonowa i wytrącanie powierzchniowe 	[43]	Biowęgiel magnetyczny funkcjonalizowany EDTA (EDTA-M-BC)	129,31 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> pole powierzchni BC wynosiło 57,5 m²/g, główne mechanizmy adsorpcji to oddziaływania elektrostatyczne oraz kompleksowanie 	[51]
Naturalny zeolit	136,26 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> naturalny zeolit poddano obróbce alkalicznej NaOH 1 g/L, optymalne parametry procesu: 240 mg/L jonów Pb(II), pH = 6, dawka adsorbentu = 1,07 g/L 	[44]	Tlenek grafenu (GO)	1,69 mmol/g	<ul style="list-style-type: none"> GO otrzymywane są metodą Hummersa, sorpcja jonów Pb(II) jest wynikiem tworzenia silnych kompleksów powierzchniowych 	[52]
Zeolity typu FAU	39,965 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> zeolity FAU syntezowano przez fuzję alkaliczną, FAU wykazuje pojemność sorpcyjną wobec jonów Pb(II) > Cu(II) > Cd(II) > Zn(II) > Co(II) 	[45]	Hydrożel chitosanu modyfikowany tiosemikarbazdem (TCS)	352,2 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> hydrożel chitosanu zmodyfikowano tiosemikarbazdem (TSC), TSC wykazuje wysoką pojemność sorpcyjną wobec jonów Pb(II) i Cd(II) 	[53]
Hg(II)							
Adsorbenty naturalne				Adsorbenty modyfikowane			
Adsorbent	q _e	Najważniejsze informacje dotyczące procesu sorpcji	Lit.	Adsorbent	q _e	Najważniejsze informacje dotyczące procesu sorpcji	Lit.
Naturalny nieuruchomiony zeolit (AZ)	8,0 μmol/g	<ul style="list-style-type: none"> optymalne warunki adsorpcji Hg(II) uzyskuje się przy pH = 5 i czasie kontaktu 90 min 	[54]	Naturalny zeolit nieuruchomiony ditazonem (DIZ)	13,1 μmol/g	<ul style="list-style-type: none"> optymalne warunki adsorpcji Hg(II) uzyskuje się przy pH = 5 i czasie kontaktu 90 min, DIZ może być stosowany do usuwania jonów Hg(II) z wód rzecznych wzbogaconych w jony Hg(II) do 99,36% 	[54]
Siarkowany biowęgiel oparty na biomasie (CSS)	268,5 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> w procesie adsorpcji dominuje adsorpcja chemiczna, zawartość siarki w CSS wynosiła 7,4% wag. 	[55]	Nanodendrymer zawierający LCME	2639 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> w procesie adsorpcji dominuje adsorpcja chemiczna, jony Hg(II) zostały przekształcone w metaliczną Hg(0) po adsorpcji na nanobiodendrymerze 	[6]
Biowęgiel siarkowany na bazie biowęglu (BCS)	117,7 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> w procesie adsorpcji dominuje adsorpcja chemiczna, zawartość siarki w CSS wynosiła 2,2% wag. 	[55]	Magnetyczny kompozyt nanorurek węglowych (MWCNTs-Fe ₃ O ₄)	238,78 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> MWCNTs-Fe₃O₄ to spletaną sieć utlenionych MWCNT związanych z klastrami Fe₃O₄ o powierzchni właściwej 92 m²/g, 	[60]

*Miniprzegląd naturalnych i syntetycznych adsorbentów
stosowanych podczas usuwania jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wodnych roztworów*

						<ul style="list-style-type: none"> prawdopodobny mechanizm adsorpcji jonów Hg(II) to tworzenie kompleksów oraz przyciąganie elektrostatyczne 	
Czerwone algi <i>Porphyridium cruentum</i>	2,62 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> zachodzi egzotermiczny, spontaniczny proces biosorpcji, wykazano, że proces chemisorpcji determinuje szybkość reakcji 	[56]	Bentonit magnetyczny (M-B) z filarami aluminium (Al-B)	26,18 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> w procesie adsorpcji dominuje adsorpcja chemiczna, proces adsorpcji był zgodny z modelem dyfuzji wewnątrzcząsteczko wej do 18 min 	[61]
Skorupy jaj	116,27 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> optymalne warunki procesu sorpcji: pH = 6, 25°C, reakcja egzotermiczna, adsorbent składał się głównie z węgla i krzemionki 	[57]	Modyfikowane l-metioniną nanofibryle celulozowe (Met-CNF)	131,86 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> w procesie adsorpcji dominuje adsorpcja chemiczna 	[62]
Materiał ilasty	0,059 mmol/g	<ul style="list-style-type: none"> optymalne warunki procesu: 10 min, pH = 2, temp. = 20°C ±2°C, występuje proces adsorpcji i wytrącanie 	[58]	Zn-AHMT	802,8 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> powierzchnia właściwa adsorbentu wyniosła 15,37 m², zachodził proces adsorpcji chemicznej, tj. chelatacji i wymiany jonowej 	[63]
Popiół z łusek ryżu (RHA)	2,22 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> RHA wykazuje pojemność sorpcyjną wobec jonów Zn(II) > Cd(II) > Hg(II), adsorpcje jonów metali w układzie podwójnym przedstawiono za pomocą równania Langmuira i Freundlicha 	[59]	UiO-66NH ₂	896,8 mg/g	<ul style="list-style-type: none"> optymalne warunki procesu: pH = 6, równowaga po 2 h, proces adsorpcji był spontaniczny i egzotermiczny 	[64]

Źródło: opracowanie własne na podstawie [37-64].

Z dostępnej wiedzy wynika, że jony ołowiu(II) można skutecznie usuwać z roztworów wodnych, stosując naturalne adsorbenty oraz modyfikowane naturalne i syntetyczne adsorbenty. Jednym z nich jest polikarboksylowana bagassa (włókno) z trzciny cukrowej (PBS), którą z powodzeniem można zastosować w celu usunięcia jonów ołowiu(II) z wodnych roztworów. Stwierdzono, że proces adsorpcji jonów Pb(II) zachodzi głównie przez kompleksowanie wewnątrz sfery na materiale sorpcyjnym. PBS okazał się również skutecznym adsorbentem po 4 cyklach zachodzących kolejno po sobie procesów sorpcji i desorpcji [37]. Ponadto stwierdzono, że jako skuteczne naturalne adsorbenty jonów Pb(II) można zastosować rośliny oraz ich odpady. Stosując odpady róży damasceńskiej ($q_e = 24,9$ mg/g) można usunąć ok. 95% jonów ołowiu(II) [38], a w przypadku rośliny pustynnej *Calligonum crinitum* ok. 71% jonów Pb(II) [39]. Natomiast, stosując niemodyfikowane włókno kokosowe, Chwastowski i Staroń usunęli 99,32% jonów Pb(II) z wodnych roztworów. Stwierdzono, że włókno kokosowe można zastosować w pięciu cyklach kolejno zachodzącej po sobie adsorpcji i desorpcji, przy czym podczas desorpcji najskuteczniejszy okazał się kwas cytrynowy i kwas octowy [40]. Ponadto skutecznym naturalnym adsorbentem stosowanym w celu usunięcia jonów ołowiu(II) z wodnych roztworów okazały się kalcynowane skorupy jaj kurzych. Stosując 200 mg/L adsorbentu, związano ponad 98% jonów Pb(II) w ciągu 120 minut [41].

Ponadto jako adsorbenty naturalne stosowane do usunięcia jonów metali ciężkich z wodnych roztworów można stosować np. biowęgiel aktywny, zeolity, chitozan czy celulozę. Dinh i wsp. przeprowadzili proces biosorpcji jonów Pb(II) za pomocą biowęgla otrzymywanego z owoców pomelo, stwierdzając że proces adsorpcji zachodził według różnych mechanizmów. W pierwszym etapie zachodził proces przyciągania elektrostatycznego, w drugim etapie dyfuzja wewnętrzna kontrolowana była przez wymianę jonową, zaobserwowano wówczas między innymi wypełnianie mikroporów biowęgla jonami ołowiu(II). W ostatnim etapie procesu występowały główne interakcje chemiczne. Ponadto stwierdzono, że skuteczność badanego materiału spadła po pięciu cyklach sorpcji-desorpcji jonów Pb(II) z ok. 81% do ok. 73% [42]. Abdelhafez i Li do usunięcia jonów Pb(II) z wodnych roztworów zastosowali biowęgiel z trzciny cukrowej (SC-BC) i biowęgiel ze skórki pomarańczy (OP-BC). W eksperymentach adsorpcji okresowej badacze zbadali wpływ pH roztworu, czasu kontaktu, stężenia początkowego jonów Pb(II) i temperatury na mechanizm sorpcji jonów Pb(II). Stwierdzono, że SC-BC ($q_e = 86,96$ mg/g) okazał się skuteczniejszym adsorbentem do usuwania jonów Pb(II) niż OP-BC ($q_e = 27,86$ mg/g) [43]. Natomiast naturalny zeolit poddany obróbce alkalicznej umożliwia usunięcie ok. 61% jonów Pb(II) [44]. Z kolei Joseph i wsp. wykorzystali zeolity typu FAU, otrzymane z popiołu lotnego węgla, do jednoczesnego usuwania jonów Cd(II), Co(II), Cu(II), Pb(II) i Zn(II) z roztworów wodnych, przy czym najwyższe wartości pojemności sorpcyjnej zaobserwowano dla jonów ołowiu(II) (39,965 mg/g) [45].

Ponadto w celu usunięcia jonów ołowiu(II) z wodnych roztworów można zastosować naturalne i syntetyczne impregnowane biosorbenty. Podczas modyfikacji powierzchni adsorbentów syntetycznych i naturalnych zdolność sorpcyjna badanych materiałów jest najczęściej znacząco wyższa. Wang wraz z zespołem badawczym [46] przygotował przyjazny dla środowiska, wydajny biosorbent na bazie celulozy pozyskanej z trzciny cukrowej. Włókna celulozowe z trzciny cukrowej zmodyfikowano za pomocą soli sodowej karboksymetylocelulozy (CMC-Na). Grupy funkcyjne i porowate struktury utworzone na bioadsorbencie znacznie zwiększyły pojemność sorpcyjną wobec jonów metali ciężkich, przy czym pojemność sorpcyjna jonów Pb(II) wyniosła 558,9 mg/g [46]. Do usunięcia jonów ołowiu(II) zastosowano również chitozan modyfikowany o-hydroksyfenylotiomocznikiem (OTCS), którego zdolność adsorpcyjna wynosiła 208,33 mg/g. Badania termodynamiczne wykazały, że mechanizm adsorpcji był reakcją endotermiczną. Proces wiązania jonów ołowiu(II) był wynikiem wymiany jonowej i chelatacji pomiędzy grupami siarki, azotu i tlenu obecnymi na OTCS a adsorbowanymi jonami metalu [47]. Natomiast magnetyczny węgiel aktywny (MAC), otrzymywany w wyniku aktywacji sproszkowanej słomy rzepakowej i pirolizy w różnych temperaturach, a następnie namagnesowania węgla aktywnego metodą hydrotermalną, można z powodzeniem zastosować do usunięcia jonów ołowiu z wodnych roztworów. Stwierdzono, że MAC wykazywał wysoką pojemność sorpcyjną wobec jonów Pb(II) (253,2 mg/g) w porównaniu do jonów Cd(II) (73,3 mg/g), co wynikało z dużej powierzchni właściwej i struktury porowatej. Ponadto pojemność sorpcyjna jonów ołowiu była wyższa, ponieważ grupy funkcyjne obecne w MAC: węgiel-tlen i fosfor-tlen wykazują większe powinowactwo do Pb(II) niż do Cd(II) [48]. W celu usunięcia jonów ołowiu(II) zastosowano również inny kompozytowy materiał sorpcyjny, a mianowicie FeMg-LDH@bentonit. Sorpcja jonów metali ciężkich za pomocą FeMg-LDH@bentonitu może być wynikiem kompleksowania powierzchni, wymiany jonowej oraz osadzania chemicznego pomiędzy FeMg-LDH@bento-

nitem a metalami ciężkimi. Wobec tego, stosując otrzymany adsorbent, uzyskano maksymalną pojemność ołowiu(II) wynoszącą 1397,62 mg/g, przekraczając możliwości konwencjonalnych adsorbentów [49]. Zou i wsp. zastosowali magnetyczny bentonit (M-B), czyli naturalny materiał ilasty do usunięcia jonów ołowiu(II) ze ścieków. Już po 90 minutach trwania procesu przy zastosowaniu 10 g/L M-B usunięto ok. 98,9% jonów Pb(II), przy początkowym stężeniu Pb(II) równym 200 mg/L (40 C, pH = 5), a maksymalna pojemność sorpcyjna badanego sorbentu wynosiła 80,40 mg/g. Podobnie jak w poprzednich badaniach mechanizm sorpcji Pb(II) i M-B polegał na wymianie jonowej, kompleksowaniu powierzchni i oddziaływaniach elektrostatycznych [50]. Proces adsorpcji jonów Pb(II) można przeprowadzić również za pomocą biowęgla syntetycznego (BC), biowęgla magnetycznego, a także biowęgla magnetycznego funkcjonalizowanego EDTA (EDTA-M-BC). Li i wsp. stwierdzili, że najefektywniejszym adsorbentem okazał się EDTA-M-BC (129,31 mg/g) > BC (100,25 mg/g) > M-BC (64,13 mg/g), a proces adsorpcji zachodził głównie w wyniku oddziaływań elektrostatycznych i reakcji kompleksowania [51]. Natomiast inni naukowcy zbadali pojemność sorpcyjną wobec jonów ołowiu(II) na funkcjonalizowanym tlenku grafenu (GO). Wysoka pojemność sorpcyjna Pb(II) na GO (1,69 mmol/g) wynika z dużej ilości grup funkcyjnych zawierających tlen na powierzchni GO, w związku z czym na powierzchni adsorbentu mogą tworzyć się silne kompleksy powierzchniowe z jonami Pb(II) [52]. Ponadto Li i wsp. przeprowadzili proces adsorpcji jonów ołowiu(II) z roztworu wodnego za pomocą modyfikowanego chitozanu tiosemikarbazydem (TCS). Stwierdzono, że badany materiał adsorpcyjny wiązał większą ilość jonów Pb(II) niż niemodyfikowany chitozan. Na pojemność sorpcyjną modyfikowanego chitozanu wpływał przede wszystkim wzrost pH i temperatury roztworu, przy czym maksymalna wartość q_e dla jonów ołowiu(II) wyniosła 325,2 mg/g [53].

Natomiast Mudasir i wsp. zastosowali naturalny nieuruchomiony zeolit (AZ) oraz immobilizowany ditizonem (ZID) w celu usunięcia jonów rtęci(II) z wodnych roztworów. Stwierdzono, że powinowactwo oraz selektywność DIZ podczas adsorpcji jonów Hg(II) jest znacznie lepsza w porównaniu z nieuruchomionym aktywowanym naturalnym zeolitem (AZ). Zaobserwowano, że DIZ umożliwia usunięcie do 99,36% jonów Hg(II) z wód rzecznych wzbogaconych jonami rtęci(II). Wyniki prac potwierdziły, że powierzchnia naturalnego zeolitu może być modyfikowana poprzez immobilizację ditazonu (selektywnego liganda organicznego) wobec jonów Hg(II) [54]. Oparty na biomasie węgiel siarkowany (CSS) otrzymany podczas pirolizy sublimowanej siarki i surowej łądygi kukurydzy zastosowano jako naturalny adsorbent jonów rtęci(II). Stwierdzono, że pojemność sorpcyjna CSS względem jonów Hg(II) wynosiła 268,5 mg/g w odróżnieniu od BCS, czyli biowęgla siarkowanego otrzymanego w wyniku jednoczesnego ogrzewania sublimowanej siarki i biowęgla z łądygi kukurydzy, gdzie pojemność ta wynosiła 177,7 mg/g. W analizowanych przypadkach grupami funkcyjnymi były grupy hydroksylowe i sulfotlenkowe. Adsorbent CSS i BCS zawierał odpowiednio 7,4% wag. i 2,2% wag. siarki, która występowała w formie siarczków alkilowych, grup sulfonowych z tiofenem i siarką nieorganiczną. Stwierdzono, że w CSS rtęć była adsorbowana w wyniku reakcji kompleksowania z grupami hydroksylowymi i sulfotlenkowymi, tworząc wiązanie Hg-O i Hg-S [55]. Ponadto badania dowiodły, że czerwone algi *Porphyridium cruentum* można stosować jako naturalny adsorbent jonów rtęci(II). Stwierdzono, że maksymalna pojemność sorpcyjna badanego biosorbentu wynosiła 2,62 mg/g przy pH = 7. Na powierzchni alg zaobserwowano obecność słabo kwaśnych grup funkcyjnych, co

powoduje protonowanie adsorbentu i zmniejsza biosorpcję w środowisku kwaśnym, a podwyższenie pH powyżej 5 zwiększa biosorpcję (ujemnie naładowana powierzchnia) [56]. Foroutan i wsp. jako naturalny adsorbent jonów rtęci(II) zastosowali skorupy jaj otrzymane z odpadów w skali nano. Stwierdzono, że jony Hg(II) z największą efektywnością są adsorbowane w temperaturze otoczenia przy pH = 6. Ponadto stwierdzono, że badany materiał sorpcyjny można z powodzeniem wykorzystać w siedmiu cyklach sorpcyjnych, usuwając jony rtęci ze ścieków [57]. Ponadto Azamfire i wsp. jako materiał sorpcyjny jonów rtęci(II) zastosowali materiał ilasty, usuwając 55% jonów Hg(II). Równowaga adsorpcyjna zaszła już po 10 minutach trwania procesu przy dawce adsorbentu wynoszącej 4 g/L. Ponadto stwierdzono, że zachodziły po sobie dwa procesy: adsorpcja i wytrącanie [58]. Natomiast El-Said i wsp. zastosowali RHA po adsorpcji jonów metali ciężkich, takich jak cynk(II), kadm(II) i rtęć(II), z roztworów jedno-, dwu- i trójskładnikowych. Zaobserwowano, że RHA najefektywniej usuwa jony Zn(II), a najgorzej jony Hg(II) z roztworów trójskładnikowych. Pojemność sorpcyjna względem jonów Zn(II) wynosiła 3,12 mg/g oraz 2,13 mg/g i 2,22 mg/g odpowiednio dla jonów Cd(II) i Hg(II). Najniższe wartości usuwania jonów rtęci(II) mogą być spowodowane oddziaływaniem jonów Hg(II) z formami Cl⁻ obecnymi w roztworze, tworzą się wówczas stabilne formy HgCl⁺ i HgCl₂ [59].

Ponadto Arshadi i wsp. zastosowali nanodendrymer zawierający ester metylowy l-cysteiny (LCME), który wykazał zdolność adsorpcji jonów Hg(II) po ośmiu cyklach adsorpcja-desorpcja z wodnych modelowych roztworów oraz po trzech cyklach z roztworów rzeczywistych. Stwierdzono, że jony Hg(II) są adsorbowane przez hydrofilowe grupy funkcyjne aminokwasów i grupy triazynoaminowe dendrymeru [6]. Natomiast Sadegh i wsp. zastosowali magnetyczny kompozyt nanorurek węglowych (MWCNTs-Fe₃O₄) w celu usunięcia jonów rtęci(II) z wodnych roztworów, stwierdzając, że nanocząstki Fe₃O₄ obecne na powierzchni MWCNT zwiększają efektywność adsorpcji. Zaproponowano kilka mechanizmów adsorpcji jonów Hg(II) za pomocą badanego adsorbentu, tj. tworzenie kompleksów, przyciąganie elektrostatyczne, adsorpcję fizyczną i oddziaływanie chemiczne między jonami Hg(II) z grupami funkcyjnymi MWCNTs-Fe₃O₄. Prawdopodobnie mechanizm usuwania jonów rtęci(II) polegał na tworzeniu kompleksów i przyciąganiu elektrostatycznym pomiędzy jonami Hg(II) a grupami funkcyjnymi MWCNTs-Fe₃O₄ [60]. Ponadto skutecznym adsorbentem jonów Hg(II) okazał się bentonit magnetyczny (M-B) powstały poprzez załadowanie nanocząstek magnetycznych Fe₃O₄ na bentonit z filarami aluminiowymi (Al-B). Po procesie modyfikacji zwiększyła się porowatość i chropowatość powierzchni, a sferyczne nanocząstki Fe₃O₄ były równomiernie rozmieszczone na powierzchni Al-B. Pojemność sorpcyjna M-B wobec jonów Hg(II) wynosiła 26,18 mg/g [61]. Z kolei Bisla i wsp. zmodyfikowali l-metioniną (naturalnym aminokwasem) nanofibryle celulozowe (CNF) wyekstrahowane ze słomy ryżowej, które wykazały wysoką efektywność sorpcyjną wobec jonów Hg(II) ($q_e = 131,86$ mg/g), przy pH = 7,8. Włókna surowej słomy ryżowej zawierają 16,25% ligniny, 47,68% celulozy oraz 36,07% hemicelulozy, a po chemicznej obróbce CNF zawartość celulozy wzrosła do 89,24%, podczas gdy ligniny i hemicelulozy zmniejszyła się odpowiednio do 4,57% i 6,24%. Zastosowany adsorbent można z wysoką efektywnością usuwania zastosować w siedmiu cyklach sorpcyjnych [62]. Skutecznym adsorbentem jonów Hg(II) okazał się również Zn-AHMT, czyli zsyntezowany azotan cynku i 4-amino-3-hydrazyno-5-merkaptio-1,2,4-triazol (AHTM) metodą jednoetapową. Stwierdzono, że stopień usuwania Zn-AHMT przekraczał 98%, a mechanizm adsorpcji był głównie

spowodowany chelatacją oraz wymianą jonową pomiędzy badanym adsorbentem a jonami Hg(II). Jony rtęci były związane przez atomy S i N obecne w Zn-AHMT, przy czym wiązanie Hg-N było bardziej stabilne [63]. Yan i Ge zastosowali modyfikowany kompozyt chitozanu (UNCS) otrzymany w wyniku sieciowania chitozanu i metaloorganicznego szkieletu (MOF) UiO-66-NH₂ za pomocą epichlorohydryny jako środka sieciującego. Stwierdzono, że modyfikowany chitozan UiO-66-NH₂ może znacznie zwiększyć pojemność sorpcyjną, przy czym na ten parametr znacząco wpływa zawartość MOF w adsorbencie. Badany adsorbent pozwolił na usunięcie ponad 90% jonów Hg(II) [64].

4. Podsumowanie

Pogarszająca się jakość wód oraz stan ścieków wynika przede wszystkim z obecności jonów metali ciężkich, w tym ołowiu i rtęci. W ostatnich latach naukowcy szczególną uwagę skupili na procesach adsorpcyjnych stosowanych podczas usuwania tych metali z wód i ścieków. Wynika to przede wszystkim z istotnych zalet procesu adsorpcji, takich jak: stabilność, użyteczność, łatwość obsługi i wydajność procesu. Metody adsorpcyjne zmniejszają stężenie jonów metali ciężkich do bardzo niskich stężeń, a także umożliwiają zastosowanie tanich materiałów adsorpcyjnych, w tym biosorbentów, zeolitów, węgla aktywnych, odpadów rolniczych, jak np. biowęgiel otrzymywany ze skórki pomarańczy. Ponadto stwierdzono, że modyfikacja materiałów sorpcyjnych znacząco wpływa na ich efektywność sorpcyjną.

W niniejszym opracowaniu zestawiono najnowsze doniesienia literaturowe potwierdzające skuteczność adsorpcji w usuwaniu jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z modelowych oraz rzeczywistych wodnych roztworów. Stwierdzono, że skutecznymi biosorbentami jonów ołowiu(II) mogą być m.in. odpady z róży damaceńskiej, łuski orzechów ziemnych, skorupy jaj kurzych, biowęgiel otrzymany z trzciny cukrowej czy zeolity typu FAU. Wykazano również, że zmodyfikowane adsorbenty pozwalają na efektywniejszą separację jonów Pb(II), np. hydrożel chitozanu modyfikowany tiosemikarbazidem czy biowęgiel magnetyczny EDTA. Podobne wnioski zaobserwowano podczas usuwania jonów rtęci(II), np. przy zastosowaniu naturalnego zeolitu nieuruchomionego ditazonem pojemność sorpcyjna AZ znacząco wzrosła. Oprócz powszechnie stosowanego biowęgla do usuwania jonów Hg(II) z powodzeniem zastosowano czerwone algi *Porphyridium cruentum*, skorupy palmowe i popiół z łusek ryżu, a także modyfikowane nanorurki, nanodendrimery czy gumę guar.

Literatura

1. Tijani J.O., Fatoba O.O., Madzivire G., Petrik L.F., *A review of combined advanced oxidation technologies for the removal of organic pollutants from water*, Water, Air, & Soil Pollution, 225(2102), 2014, s. 1-30.
2. Zamani A.A., Yafitian M.R., Parizanganeh A., *Multivariate statistical assessment of heavy metal pollution sources of groundwater around a lead and zinc plant*, Journal of Environmental Health Science and Engineering, 9(29), 2012, s. 1-10.
3. Zhao P., Wang A., Wang P., Huang Zh., Fu Zh., Huang Zh., *Two recyclable and complementary adsorbents of coal-based and bio-based humic acids: High efficient adsorption and immobilization remediation for Pb(II) contaminated water and soil*, Chemosphere, 318, 2023, 137963.
4. Alqaddami A.A., Naushad M., AlOthman Z.A., Alsuhybani M., Algamadi M., *Excellent adsorptive performance of a new nanocomposite for removal of toxic Pb(II) from aqueous environment: Adsorption mechanism and modeling analysis*, Journal of Hazardous Materials, 389, 2020, s. 121896.

5. Wang Y., Zhao G., Zhang Q., Wang H., Zhang Y., Cao W., Zhang N., Du B., Wei Q., *Electrochemical aptasensor based on gold modified graphene nanocomposite with different morphologies for ultrasensitive detection of Pb²⁺*, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288, 2019, s. 325-331.
6. Arshadi M., Eskandarloo H., Abdolmaleki M., Abbaspourrad A., *A biocompatible nanodendrimer for efficient adsorption and reduction of Hg(II)*, *ACS Sustainable Chemical Engineering*, 6(10), 2018, s. 13332-13348.
7. Velepini T., Pillay K., *Sulphur functionalized materials for Hg(II) adsorption: A review*, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(5), 2019, s. 103350.
8. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz. U. z 2017 r., poz. 2294).
9. Lach J., Okoniewska E., Ociepa-Kubicka A., Szymonik A., *Adsorpcja ołowiu na modyfikowanym węglu aktywnym ROW 08 Supra*, *Rocznik Ochrona Środowiska*, 17, 2015, s. 692-709.
10. Kołodyńska D., Krukowska J., Thomas P., *Comparison of sorption and desorption studies of heavy metal ions from biochar and commercial active carbon*, *Chemical Engineering Journal*, 307, 2017, s. 353-363.
11. Ahmed W., Memood S., Mahmood M., Ali S., Shakoora A., Núñez-Delago, Asghar R.M.A., Zhao H., Liu W., Li W., *Adsorption of Pb(II) from wastewater using a red mud modified rice-straw biochar: Influencing factors and reusability*, *Environmental Pollution*, 326, 2023, 121405.
12. Peng W., Li H., Liu Y., Song S., *A review on heavy metal ions adsorption from water by Graphene oxide and its composites*, *Journal of Molecular Liquids*, 23, 2017, s. 496-504.
13. Baka B., Stekler K., Klajny R., *Analiza symulacyjna pracy jednostki adsorpcyjnej PTSA do wychwytywania dwutlenku węgla ze spalin kotłowych*, *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 16(1), 2013, s. 141-152.
14. Bradl H.B., *Adsorption of heavy metal ions on soil constituents*, *Journal of Colloid and Interface Science*, 277(1), 2004, s. 1-18.
15. Cuong D.V., *Eco-friendly biochar-based materials in removal of contaminants from aqueous solution: Fabrication, characterization and applications*, rozprawa doktorska, 2020.
16. Gao X., Guo Ch., Hao J., Zhao Z., Long H., Li M., *Adsorption of heavy metal ions by sodium alginate based adsorbent – a review and new perspective*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2020, s. 4423-4434.
17. Guibal E., *Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review*, *Separation and Purification Technology*, 38, 2004, s. 43-74.
18. Gao X., Guo Ch., Hao J., Zhao Z., Long H., Li M., *Adsorption of heavy metal ions by sodium alginate based adsorbent – a review and new perspective*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2020, s. 4423-4434.
19. Gao X., Zhang Y., Zhao Y., *Biosorption and reduction of Au(III) to gold nanoparticles by thiourea modified alginate*, *Carbohydrate Polymers*, 159, 2017, s. 108-115.
20. Won S.W., Kotte P., Wei W., Lim A., Yun Y.-S., *Biosorbents for recovery of precious metals*, *Bioresource Technology*, 160, 2014, s. 203-212.
21. Aquayo-Villarreal I.A., Bonilla-Petriciolet A., Muniz-Valencia R., *Preparation of activated carbons from pecan nutshell and their application in the antagonistic adsorption of heavy metal ions*, *Journal of Molecular Liquids*, 230, 2017, s. 686-695.
22. Witt K., Kaczorowska M.A., Bożejewicz D., Urbaniak W., *Efficient recovery of noble metal ions (Pd²⁺, Ag⁺, Pt²⁺, and Au³⁺) from aqueous solution using N,N'-bis(salicylidene)ethylenediamine (salen) as an extractant (classic solvent extraction) and carrier (polymer membranes)*, *Membranes*, 11, 2021, s. 863.
23. Ipeaiyeda A.R., Tesi G.O., *Sorption and desorption studies on toxic metals from brewery effluent using eggshell as adsorbent*, *Advances in Natural and Applied Sciences*, 7, 2014, s. 15-24.

24. Lingling Q., Xu T., Zhaofeng W., Xinshan P., *Pore characterization of different types of coal from coal and gas outburst disaster sites using low temperature nitrogen adsorption approach*, International Journal of Mining Science and Technology, 27(2), 2017, s. 371-377.
25. Kobyłka A., *Zastosowanie adsorpcji na węglu aktywnym w różnych układach technologicznych oczyszczalni ścieków*, Technical Issues, 4, 2016, s. 27-34.
26. Iwuzor K.O., Jghalo J.O., Emenike E.Ch., Igwegbe Ch.A., Adeniyi A.G., *Do adsorbent pore size and specific surface area affect the kinetics of methyl orange aqueous phase adsorption?*, Journal of Chemistry Letters, 2, 2021, s. 188-198.
27. Chakraborty R., Asthana A., Singh A.K., Jain B., Susan A.B.H., *Adsorption of heavy metal ions by various low-cost adsorbents: a review*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 102(2), 2020, s. 342-379.
28. Kayan G.O., Kayan A., *Composite of natural polymers and their adsorbent properties on the dyes and heavy metal ions*, Journal of Polymer and the Environment, 29, 2021, s. 3477-3496.
29. Ge Y., Li Z., *Application of lignin and its derivatives in adsorption of heavy metal ions in water: A review*, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 6, 2018, s. 7181-7192.
30. Ahmad M., Manzoor K., Ikram S., *Versatile nature of hetero-chitosan based derivatives as biodegradable adsorbent for heavy metal ions: a review*, International Journal of Biological Macromolecules, 105(1), 2017, s. 190-203.
31. Nejadshafiee V., Islami M.R., *Adsorption capacity of heavy metal ions using sulfone-modified magnetic active carbon as a bio-adsorbent*, Materials Science and Engineering C, 101, 2019, s. 42-52.
32. Kołodyńska D., Hałas P., Franus M., Hubicki Z., *Zeolite properties improvement by chitosan modification – Sorption studies*, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 52, 2017, s. 187-196.
33. Rouhani F., Rafizadeh-Masuleh F., Morsali A., *Highly electroconductive metal-organic framework: Tunable by metal ion sorption Quantity*, Journal of the American Chemical Society, 141, 2019, s. 11173-11182.
34. An F.-Q., Wang Y., Xue X.-Y., Hu T.-P., Gao J.-F., Gao B.-J., *Design and application of thiourea modified D301 resin for effective removal of toxic heavy metal ions*, Chemical Engineering Research and Design, 130, 2018, s. 78-86.
35. Bucatariu F., Schwarz D., Zaharia M., Steinbach Ch., Ghiorghita C.-A., Schwarz S., Mihai M., *Nanostructured polymer composites for selective heavy metal ion sorption*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 603, 2020, 125211, doi: 10.1016/j.colsurfa.2020.125211.
36. Zhao G., Huang X., Tang Z., Huang Q., Niu F., Wang X., *Polymer-based nanocomposites for heavy metal ions removal from aqueous solution: a review*, Polymer Chemistry, 9, 2018, s. 3562-3582.
37. Elias M.M.C., Soares L.C., Maia L.C., Taylor J.G., Adarme O.F.H., Ferreira G.M.D., de Azevedo E.R., de Siervo A., da Silva L.H.M., Gurgel L.V.A., *Batch and continuous adsorption of Cd(II) and Pb(II) on polycarboxylated sugarcane bagasse*, Journal of Water Process Engineering, 54, 2023, 103947.
38. Batool F., Mohy-ud-Din A., Amjad A., Ul Hassan A., Nadeem S., Javed M., Othman M.H.D., Chew K.W., Rauf A., Kurniawan T.A., *Removal of Cd(II) and Pb(II) from synthetic wastewater using Rosa damascena waste as a biosorbent: An insight into adsorption mechanisms, kinetics, and thermodynamic studies*, Chemical Engineering Science, 280, 2023, 119072.
39. Safri A., Flechter A.J., Abdel-Halim E., Ismail M.A., Hashem A., *Calligonum crinitum as a novel sorbent for sorption of Pb(II) from aqueous solutions: Thermodynamics, kinetics, and isotherms*, Journal of Polymers and the Environment, 29, 2021, s. 1505-1515.
40. Chwastowski J., Staroń P., *Influence of Saccharomyces cerevisiae yeast cells immobilized on Cocos nucifera fibres for the adsorption of Pb(II) ions*, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 632, 2022, 127735.

41. Gurav V.L., Samant R.A., *Application of waste egg shell for adsorption of Cd(II) and Pb(II) ions to protect environment: Equilibrium, kinetic and adsorption studies*, Oriental Journal of Chemistry, 37(1), 2021, s. 128-135.
42. Dinh V.-P., Nguyen D.-K., Luu T.-T., Nguyen Q.-H., Tuyen L.A., Phong D.D., Kiet H.A.T., Ho T.-H., Nguyen T.T.P., Xuan T.D., Hue P.T., Hue N.T.N., *Adsorption of Pb(II) from aqueous solution by pomelo fruit peel-derived biochar*, Materials Chemistry and Physics, 285, 2022, 126105.
43. Abdelhafez A.A., Li J., *Removal of Pb(II) from aqueous solution by using biochars derived from sugar cane bagasse and orange peel*, Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers, 61, 2016, s. 367-375.
44. El-Arish N.A.S., Mohd Zaki R.S.R., Miskan S.N., Setiabudi H.D., Jaaraf N.F., *Adsorption of Pb(II) from aqueous solution using alkaline-treated natural zeolite: Process optimization analysis*, Total Environment Research Themes, 3-4, 2022, 100015.
45. Joseph I.V., Tosheva L., Doyle A.M., *Simultaneous removal of Cd(II), Co(II), Cu(II), Pb(II), and Zn(II) ions from aqueous solution on FAU-type zeolites prepared from coal fly ash*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 8(4), 2020, s. 103895.
46. Wang F., Pan Y., Cai P., Guo T., Xiao H., *Single and binary adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions using sugarcane cellulose-based adsorbent*, Bioresource Technology, 241, 2017, s. 482-490.
47. Yang X., Chen L., Ren D., Wang S., Ren Z., *Adsorption of Pb(II) from water by treatment with an o-hydroxyphenyl thiourea-modified chitosan*, International Journal of Biological Macromolecules, 220, 2022, s. 280-290.
48. Zhang Z., Wang T., Zhang H., Yonghong L., Xing B., *Adsorption of Pb(II) and Cd(II) by magentic activated carbon and its mechanism*, Science of the Total Environment, 757, 2021, s. 43910.
49. Guan X., Yuan X., Zhao Y., Bai J., Li Y., Cao Y., Chen Y., Xiong T., *Adsorption behaviors and mechanisms of Fe/Mg layered double hydroxide loaded on bentonite on Cd(II) and Pb(II) removal*, Journal of Colloid and Interface Science, 612, 2022, s. 572-583.
50. Zou C., Jiang W., Liang J., Sun X., Guan Y., *Removal of Pb(II) from aqueous solutions by adsorption on magnetic bentonite*, Environmental Science and Pollution Research, 26, 2019, s. 1315-1322.
51. Li M., Wei D., Liu T., Liu Y., Yan L., Wei Q., Du B., Xu W., *EDTA functionalized magnetuc biochar for Pb(II) removal: Adsorption performance, mechanism and SVM model prediction*, Separation and Purification Technology, 227, 2019, s. 115696.
52. Wang X., Chen Z., Yang S., *Application of Graphene oxides for the removal of Pb(II) ions from aqueous solutions: Experimental and DFT calculation*, Journal of Molecular Liquids, 211, 2015, s. 957-964.
53. Li M., Zhang Z., Li R., Wang J.J., Ali A., *Removal of Pb(II) and Cd(II) ions from aqueous solution by thiosemicarbazide modified chitosan*, International Journal of Biological Macromolecules, 86, 2016, s. 879-884.
54. Mudasir M., Karelius K., Aprilita N.H., Wahyuni E.T., *Adsorption pf mercury(II) on dithizone-immobilized natural zeolite*, Journal of Environmental Chemical Engineering, 4(2), 2016, s. 1839-1849.
55. Huang S., Liang Q., Geng J., Luo H., Wei Q., *Sulfurized biochar prepared by simplified technic with superior adsorption property towards aqueous Hg(II) and adsorption mechanisms*, Materials Chemistry and Physics, 238, 2019, s. 121919.
56. Zaib M., Athar M.M., Saeed A., Farooq U., Salman M., Makshoof M.N., *Equilibrium, kinetic and thermodynamic biosorption studies of Hg(II) on red algal biomass of Porphyridium cruentum*, Green Chemistry Letters and Reviews, 9(4), 2016, s. 179-189.
57. Foroutan R., Mohammadi R., Farjadfard S., Esmaeili H., Ramavandi B., Sorial G.A., *Eggshell nano-particle potential for methyl violet and mercury ion removal: Surface study and field application*, Advanced Powder Technology, 30(10), 2019, s. 2188-2199.

58. Azamfire B., Bulgariu D., Bulgariu L., *Efficient removal of toxic metal ions (Pb(II) and Hg(II) ions in single component systems by adsorption on Romanian clay material*, *Revista de Chimie*, 71(7), 2020, s. 37-47.
59. El-Said A.G., Badawy N.A., Garamon S.E., *Adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions onto rice husk ash low cost adsorbent*, *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 8(1), 2018, doi:10.4172/2161-0525.1000543.
60. Sadegh H., Ali G.A.M., Makhlof A.S.H., Chong K.F., Alharbi N.S., Agarwal S., Gupta V.K., *MWCNTs-FeO₄ nanocomposite for Hg(II) high adsorption efficiency*, *Journal of Molecular Liquids*, 258, 2018, s. 345-353.
61. Zou Ch., Liang J., Jian W., Guan Y., Zhang Y., *Adsorption behavior of magnetic bentonite for removing Hg(II) from aqueous solutions*, *RSC Advances*, 8, 2018, s. 27587-27595.
62. Bisla V., Rattan G., Singhal S., Kaushik A., *Green and novel adsorbent from rice straw extracted cellulose for efficient adsorption of Hg(II) ions in an aqueous medium*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 2020, s. 194-203.
63. Zeng B., Wang W., He S., Lin G., Du W., Chang J., Ding Z., *Facile synthesis of zinc-based organic framework aqueous Hg(II) removal: Adsorption performance and mechanism*, *Nano Materials Science*, 3(4), 2021, s. 429-439.
64. Yan X., Ge H., *Preparation of metal organic frameworks modified chitosan composite with high capacity for Hg(II) adsorption*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 232, 2023, s.123329.

Miniprzegląd naturalnych i syntetycznych adsorbentów stosowanych podczas usuwania jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wodnych roztworów

Streszczenie

Zanieczyszczenie wód oraz ścieków szczególnie toksycznymi jonami ołowiu(II) i rtęci(II) oraz ich związkami stanowi znaczący problem współczesnego świata. Jony tych metali negatywnie wpływają na zdrowie, a nawet życie ludzi i zwierząt. Wobec tego poszukuje się skutecznej metody usuwania toksycznych metali ze środowiska wodnego. Jedną z powszechnie stosowanych metod jest adsorpcja, która w ostatnich latach cieszy się coraz większym zainteresowaniem wśród naukowców. Do zasadniczych zalet tego procesu zalicza się niski koszt prowadzenia procesu, stabilność, wydajność oraz możliwość zastosowania tanich materiałów sorpcyjnych, jak również ich regeneracji i wielokrotnego wykorzystania.

W niniejszej pracy przedstawiono najnowsze dokonania naukowców w zakresie usuwania jonów ołowiu(II) i rtęci(II) z wód oraz ścieków przede wszystkim za pomocą naturalnych oraz syntetycznych materiałów sorpcyjnych.

Słowa kluczowe: usuwanie jonów metali, jony ołowiu(II), jony rtęci(II), naturalne i syntetyczne adsorbenty

A mini-review of natural and synthetic adsorbents used to remove lead(II) and mercury(II) ions from aqueous solutions

Abstract

Pollution of water and wastewater with particularly toxic lead(II) and mercury(II) ions and their compounds is a significant problem in the modern world. Ions of these metals permanently negatively affect the health and even life of humans and animals. Therefore, an effective method of removing toxic metals from the aqueous environment is sought. One of the commonly used methods is adsorption, which has been gaining more and more interest among scientists in recent years. The main advantages of this process include low cost of the process, stability, efficiency, and the possibility of using cheap sorption materials, as well as their regeneration and reuse.

This paper presents the latest achievements of scientists in the field of removing lead(II) and mercury(II) ions from water and wastewater, primarily with the use of natural and synthetic sorption materials.

Keywords: removal of metal ions, lead(II) ions, mercury(II) ions, natural and synthetic adsorbents

Remediacja gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi

1. Wprowadzenie

Gleba jest bardzo specyficznym składnikiem biosfery, ponieważ jest nie tylko geochemicznym pochłaniaczem zanieczyszczeń, ale także działa jako naturalny bufor kontrolujący transport pierwiastków i substancji chemicznych do atmosfery, hydrosfery, a także fauny i flory [1].

Gleba jest jednym z najważniejszych odnawialnych bogactw naturalnych Ziemi, a jednocześnie podstawą funkcjonowania wszystkich ekosystemów lądowych. Ze względu na to, że gleby są zewnętrzną, czyli powierzchniową warstwą litosfery, są w dużym stopniu narażone na zanieczyszczenia i degradację wynikające z gospodarczej działalności człowieka. Dodatkowo ogromne znaczenie dla czystości gleb mają przemysł i transport [2].

Gleby, które są zanieczyszczone i zdegradowane, tracą częściowo lub całkowicie swoje pierwotne właściwości fizykochemiczne oraz funkcje biologiczne. Dlatego też niezbędne jest wprowadzenie działań mających na celu remediację gleb, której celem jest usunięcie lub zredukowanie ryzyka środowiskowego. Działania takie nie są łatwe i polegają przede wszystkim na określeniu rodzaju i stężenia zanieczyszczeń, a następnie opracowaniu najodpowiedniejszych strategii remediacyjnych, biorąc pod uwagę otrzymane dane. Istnieje wiele metod remediacji gleb stosowanych w przypadku różnych zanieczyszczeń, jednakże, pomimo szerokiego wyboru, nie istnieje metoda uniwersalna. Zastosowana technika remediacji gleby powinna być tania, efektywna i przede wszystkim nieszkodliwa dla środowiska naturalnego. Metody remediacji dzieli się na trzy główne grupy: remediację fizyczną, chemiczną i biologiczną [3].

Remediacja gleb zanieczyszczonych bądź skażonych ma na celu zmniejszenie zagrożenia dla środowiska oraz obniżenie potencjalnego zagrożenia z poziomu nieakceptowalnego do poziomu bezpiecznego. W tym celu stosuje się albo strategię usuwania zanieczyszczeń, albo ich immobilizacji. Jednymi z trudniejszych do usunięcia są zanieczyszczenia metalami ciężkimi. Trudność wynika z faktu, że metale ciężkie nie ulegają degradacji, a jedynie zmianie formy czy stężenia. Remediacja ma na celu całkowicie usunąć metale lub przekształcić formy jonowe w formy mniej toksyczne. Wybór technologii remediacji zależy od wielu czynników, takich jak: możliwość zastosowania metody, mechanizm procesu, charakter i rodzaj zanieczyszczeń czy rodzaj oraz skład gleby itd. [2].

2. Charakterystyka gleby

Gleba (rys. 1) zwana jest złożonym, żywym i dynamicznym organizmem tworzącym swoistą „skórę” Ziemi. W jej skład wchodzi elementy mineralne i organiczne, powietrze i woda. Składniki mineralne to piasek, pył oraz il, natomiast do składników organicznych zaliczyć można substancje humusowe (próchnicze), żywe organizmy, rośliny, zwierzęta,

¹ natalia.festinger@lit.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Gospodarki o Obiegu Zamkniętym, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Łódzki Instytut Technologiczny, <https://lit.lukasiewicz.gov.pl/>.

² magdalena.olak-kucharczyk@lit.lukasiewicz.gov.pl, Centrum Gospodarki o Obiegu Zamkniętym, Sieć Badawcza Łukasiewicz – Łódzki Instytut Technologiczny, <https://lit.lukasiewicz.gov.pl/>.

³ kamila.koszelska@chemia.uni.lodz.pl, Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Łódzki, <https://www.uni.lodz.pl/>.

bakterie i grzyby. Gleba pełni bardzo ważną rolę w ekosystemie. Stanowi biologicznie czynną powłokę Ziemi i wchłania obumarłą biomasę, przetwarzając ją w składniki pokarmowe przyswajalne przez rośliny [2].

Gleba stanowi ważną ostoję różnorodności biologicznej. Około 25-30% wszystkich organizmów żywych znajduje się właśnie w glebie, która wchłania obumarłe części biomasy, a te są następnie przetwarzane w składniki pokarmowe dla roślin oraz w substancje glebotwórcze [4]. Gleba stanowi jedno z najważniejszych i warunkowo odnawialnych bogactw naturalnych. Co więcej, gleba jest jednym z mediów w produkcji biomasy, a co za tym idzie pierwotnym źródłem substancji pokarmowych w biosferze. Warstwa gleby uznawana jest za główny magazyn ciepła oraz wody. Dodatkowo gleba stanowi swoisty filtr zabezpieczający głębsze warstwy litosfery oraz wody podziemne przed zanieczyszczeniami [2].

Skład chemiczny gleby zależy od rodzaju skały macierzystej, przebiegu procesów glebotwórczych oraz różnych czynników antropogenicznych [4]. Pierwiastki chemiczne wchodzące w skład gleby dzieli się na trzy grupy:

1. Składniki matrycy glebowej, czyli pierwiastki stanowiące część nieorganiczną i występujące na Ziemi najczęściej. Są to: tlen, krzem, glin, żelazo, sód, magnez, potas, wapń i wodór. Najważniejszym składnikiem frakcji gruboziarnistej jest kwarc (SiO_2), a frakcji drobnoziarnistej: glinokrzemiany (między innymi minerały ilaste, takie jak np. kaolinit, montmorillonit, illit, smektyt, chloryt czy wermikulit) oraz uwodnione tlenki metali (w tym getyt, hematyt, gibbsyt i hausmanit).
2. Pierwiastki potrzebne do wzrostu roślin, które dostały się do gleby w wyniku wietrzenia skały. Są to głównie: wapń, magnez, potas i sód.
3. Pierwiastki potencjalnie toksyczne znajdujące się w glebie w dużym stężeniu. Do pierwiastków potencjalnie toksycznych należą niektóre makroskładniki (glin, siarka), mikroelementy (np. cynk, miedź, mangan), a zwłaszcza niektóre pierwiastki śladowe niebędące mikroelementami, jak ołów, kadm, arsen, rtęć. W zależności od środowiska panującego w glebie pierwiastki te mogą być mniej lub bardziej toksyczne. Przykładowo: glin, będący jednym z najbardziej rozpowszechnionych pierwiastków, w środowisku silnie kwaśnym staje się fitotoksyczny [2, 4].

Na podstawie składu granulometrycznego, czyli uziarnienia w glebach nieszkieletowych, wyróżnia się cztery podstawowe grupy granulometryczne: piaski, pyły, gliny oraz ropy. Mocniej rozdrobniona frakcja ma bardziej rozwiniętą powierzchnię właściwą. Gleba ma zdolność do zatrzymywania i pochłaniania różnych składników w postaci jonów lub cząstek. Ta właściwość zwana jest zdolnością sorpcyjną i związana jest przede wszystkim z pojemnością wymienną kationów. Wielkość ta jest całkowitą liczbą kationów, która może być zaadsorbowana przez określoną masę gleby w wyniku wymiany jonowej [2, 4].

Bardzo ważną właściwością gleby jest jej odczyn (pH). Odczyn najszybciej ulega zmianom pod wpływem czynników zewnętrznych, więc może być uznawany za wskaźnik zmian właściwości gleb. Odczyn gleby jest jednym z najważniejszych czynników, jakie wpływają na mobilność pierwiastków śladowych. Przykładowo: wykazano, że wraz z obniżeniem pH zwiększa się biodostępność kadmu dla roślin [2, 3, 5]. Zmiany potencjału redoks wpływają na właściwości gleby. Przykładem są chrom czy selen, które mają inne właściwości w zależności od stopnia utlenienia w związkach. Chrom(VI) jest silnie toksyczny i relatywnie mobilny, natomiast chrom(III) jest praktycznie nietoksyczny, mało ruchliwy i łatwo sorbuje się na powierzchni minerałów. Selen(VI) jest mało toksyczny i mobilny, podczas gdy selen(IV) jest silnie toksyczny i mało mobilny [2, 4].



Rysunek 1. Poziomy genetyczne (warstwy) gleby [opracowanie własne]

3. Zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi

Zanieczyszczenie gleby metalami ciężkimi jest jednym z poważnych problemów, z którymi boryka się świat. Obecność problemu, w ostatnich dekadach na szczęście zmniejszającego się, wynika z szybkiego uprzemysłowienia czy ludzkiego zaniedbania. Metale ciężkie są substancjami o gęstości większej niż 6 g/cm^3 , a jony są dość toksyczne nawet w niskim stężeniu [6]. Zwiększona ilość metali ciężkich w glebie może wpływać szkodliwie na jej właściwości biologiczne oraz stanowić potencjalne ryzyko dla roślin i wód podziemnych. W konsekwencji metale ciężkie mogą prowadzić do skażenia każdego z ogniw łańcucha pokarmowego [7]. Metale te mają tendencję do akumulowania się w organizmie człowieka, co prowadzi do wielu przewlekłych i trwałych chorób, takich jak rak płuc, uszkodzenie układu nerwowego, problemy z oddychaniem czy też uszkodzenie nerek. Nie bez znaczenia jest działanie metali ciężkich w przypadku choroby Alzheimera, zawału serca bądź ilości wydzielanych hormonów tarczycy [8].

Nadmierne stosowanie niektórych nawozów, pestycydów i herbicydów w celu zwiększenia produkcji roślinnej zanieczyszcza glebę licznymi metalami ciężkimi, takimi jak: kadm, miedź, nikiel, cynk, rtęć, ołów itp. Dodatkowo metale ciężkie znajdujące się w glebie pochodzą z utylizacji odpadów, górnictwa i sektorów przemysłowych. Największe stężenie metali ciężkich obserwuje się w glebach próchnicznych, charakteryzujących się dużą zdolnością wiązania różnych substancji chemicznych [6].

Okres półtrwania metali ciężkich w glebach po raz pierwszy został obliczony przez Imura i wsp. [9] w warunkach doświadczenia lizymetrycznego. Zakresy te są bardzo zróżnicowane i przedstawiają się następująco: dla Zn od 70 lat do 510 lat, dla Cd od 13 lat do 1100 lat, dla Cu od 310 lat do 1500 lat, a dla Pb od 740 lat do 5900 lat. Dla gleb klimatu umiarkowanego wartości te różnią się: dla Cd od 75 lat do 380 lat, dla Hg od 500 lat do 1000 lat, a dla Ag, Cu, Ni, Pb, Se i Zn od 1000 lat do 3000 lat [10]. W glebach tropikalnych lasów deszczowych tempo wymywania pierwiastków jest znacznie większe i obliczony przez Imura i wsp. [9] czas wymywania wynosi około 40 lat. Wszystkie podobne szacunki wyraźnie wskazują, że całkowite usunięcie zanieczyszczeń metalicznych z gleby jest prawie niemożliwe [1].

4. Remediacja gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi

W pierwszym kroku należy rozróżnić dwa pojęcia zbliżone ze sobą znaczeniowo: remediacja oraz rekultywacja, które odnoszą się do przywrócenia wartości przyrodniczych i użytkowych terenom zniszczonym przez działalność człowieka. Remediacja jest pojęciem węższym i jest częścią rekultywacji. Rekultywacja dotyczy terenów zdegradowanych geomechanicznie poprzez np. zalesienie obszarów wykarczowanych, zalewanie bądź zasypywanie terenów kopalnianych itd. Remediacja natomiast polega na polepszeniu stanu zanieczyszczonych gleb i wód gruntowych [11].

Na problem zanieczyszczenia gleb zwrócono uwagę w Europie na początku lat 80. XX wieku [2].

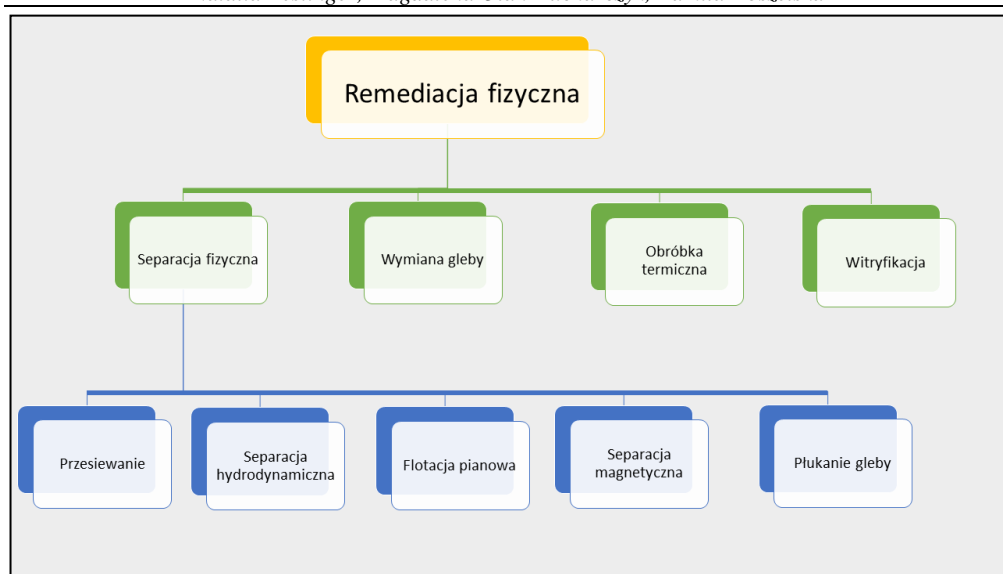
Remediacja gleb zanieczyszczonych bądź skażonych ma na celu zmniejszenie zagrożenia dla środowiska oraz obniżenie potencjalnego zagrożenia z poziomu nieakceptowalnego do poziomu bezpiecznego. Pojęcie zanieczyszczenia dotyczy powierzchniowej warstwy gleby i dużego obszaru, natomiast skażenie dotyczy dużo mniejszego obszaru, zarówno warstwy powierzchniowej, jak i warstw głębszych. Procesowi remediacji podlega zanieczyszczona gleba, skażone odpady, zanieczyszczona woda podziemna i powietrze glebowe. Remediacja terenu polega na usunięciu lub rozłożeniu obecnych zanieczyszczeń, przekształceniu ich w formy mniej toksyczne, trudno rozpuszczalne, lub zaburzeniu ich drogi migracji [2].

Aby móc zastosować remediację terenu zanieczyszczonego należy najpierw wstępnie scharakteryzować teren i zanieczyszczenie, następnie przeanalizować możliwe metody remediacji. W kolejnym kroku należy wybrać najodpowiedniejszą metodę remediacji i zastosować ją na danym terenie. Po przeprowadzonym procesie remediacji niezbędny jest monitoring terenu [2].

Wśród metod służących do remediacji gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi wyróżnia się szczególnie metody fizyczne (separacja fizyczna, wymiana gleby, obróbka termiczna, płukanie), chemiczne (stabilizacja chemiczna, obróbka nanocząsteczkami, zestalenie, chemiczne przemywanie gleby, procesy utleniania-redukcji, hydroliza) i biologiczne (bioakumulacja, fitoremediacja, bioremediacja) [6]. Techniki te mają na celu całkowicie usunąć jony metali bądź też przekształcić je w mniej toksyczne formy. Metody *ex situ* są metodami stosowanymi poza, a metody *in situ* w miejscu zaistnienia skażenia lub zanieczyszczenia. Wybór technologii remediacji zależy od możliwości zastosowania metody, mechanizmu procesu, charakteru i rodzaju zanieczyszczeń, rodzaju i składu gleby itd. [2, 6].

4.1. Fizyczna remediacja gleb

Remediacja fizyczna polega na przekształcaniu gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi w glebę mniej toksyczną dzięki procesom fizycznym takim jak separacja fizyczna, wymiana gleby, wityfikacja czy obróbka termiczna. Remediacja fizyczna jest dość prosta i szybka w wykonaniu, a także ma wysoką zdolność usuwania jonów metali. Jednakże metody te są drogie i stosowane jedynie w przypadku zanieczyszczenia niewielkich objętości gleby [12, 13]. Zasadniczo skuteczność remediacji fizycznej zależy od charakteru gleby (zawartości frakcji ilastej czy substancji humusowych, wilgoci, wielkości cząstek i ich kształtu oraz różnicy gęstości metali) [14]. Techniki remediacji fizycznej przedstawiono na rysunku 2.



Rysunek 2. Rodzaje remediacji fizycznej, opracowanie własne na podstawie [6]

Technika separacji fizycznej jest stosowana w przemyśle wydobywczym i przetwórstwie minerałów do wychwytywania minerałów rudnych ze skał bogatych w metale. Może mieć także zastosowanie do oczyszczania gleb wysoce zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Do technik separacji fizycznej można zaliczyć przesiewanie, flotację pianową, płukanie, separację hydrodynamiczną i magnetyczną [6, 13].

1. Przesiewanie – polega na przesiewaniu gleby przez sита o różnych rozmiarach oczek. Na ogólną separację cząstek zawierających metale wpływa rozmiar cząstek gleby oraz szybkość przesiewania. Metodą tą możliwe jest usuwanie miedzi, chromu, ołowiu, kadmu i niklu [15].
2. Separacja hydrodynamiczna – zależy od prędkości opadania cząstek w strumieniu wody lub od siły odśrodkowej przyłożonej do strumienia wody. Siła odśrodkowa jest silniejsza niż siła grawitacji, co umożliwia łatwiejsze oddzielenie drobnych cząstek gleby od dużych cząstek piasku [14]. Wydajność usuwania metali ciężkich z gleby może sięgać nawet 98% [16].
3. Flotacja pianowa – technika polegająca na wtryskiwaniu powietrza do zawiesiny gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi, co powoduje tworzenie się piany. Piana unosi się na powierzchni zawiesiny, w skład której wchodzi metale ciężkie. Proces separacji zależy od powinowactwa wiązania hydrofobowej powierzchni cząstek z pęcherzykami powietrza. Dodanie środków powierzchniowo czynnych zwiększa charakter hydrofobowy cząstek zawierających metale i zwiększa się skuteczność usuwania zanieczyszczeń. Literatura wskazuje na możliwość usunięcia z gleby kadmu, miedzi, ołowiu i cynku nawet w 80% [14, 17].
4. Separacja magnetyczna – proces, w którym siła magnetyczna jest stosowana do ekstrakcji metali z zanieczyszczonej gleby, wykorzystując ich zróżnicowane właściwości magnetyczne, które wpływają na skuteczność ich usuwania. Cząstki obecne w glebie mają różną podatność na pole magnetyczne, od ujemnych (organicznych), poprzez pośrednie (paramagnetyczne) aż po dodatnie (minerały ferromagnetyczne)

[14]. Cząstki o charakterze ferromagnetycznym można oddzielić, stosując pole magnetyczne o niskim natężeniu, podczas gdy cząstki paramagnetyczne oddziela się za pomocą pola magnetycznego o wysokim natężeniu. Separacja magnetyczna może służyć do oddzielenia miedzi, cynku, kadmu, niklu, chromu i manganu z gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi [18].

5. Płukanie gleby – wykonywane jest *ex situ*. Skuteczność usuwania metali zależy od ich właściwości fizycznych, charakteru cząstek gleby oraz rozpuszczalności jonów metali w kwasach i środkach chelatujących [6]. Płukanie jest skuteczne w usuwaniu ołowiu, miedzi, rtęci czy cynku [6, 19].

Wymiana gleby jest drugim rodzajem remediacji fizycznej metali ciężkich w glebach. Metodę tę stosuje się jedynie do oczyszczania niewielkich terenów, a zastąpiona gleba traktowana jest jako odpad [20]. Technika ta polega na usunięciu gleby zanieczyszczonej i zastąpieniu jej czystą, albo wymieszaniu gleby zanieczyszczonej z czystą, co zmniejsza stężenie jonów metali, ale ich całkowicie nie eliminuje. Przed wymianą zanieczyszczony obszar należy odizolować od otoczenia za pomocą barier, tak aby uniknąć zanieczyszczenia sąsiednich terenów [21].

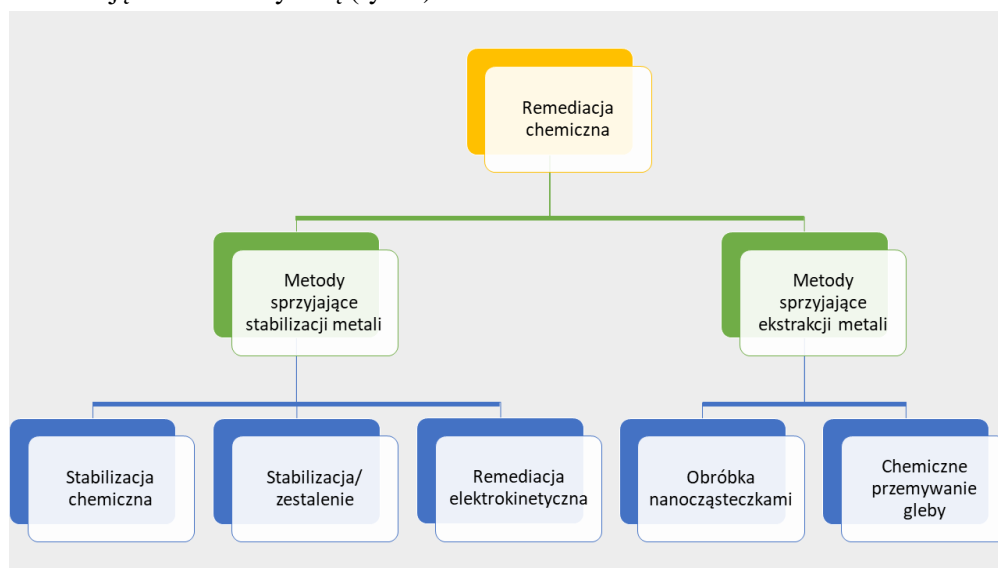
Do remediacji fizycznej zalicza się również obróbkę termiczną. Metoda ta polega na zastosowaniu ciepła w kontrolowanych warunkach temperaturowych do usuwania metali zanieczyszczających gleby. Ciepło to powoduje mobilizację i odparowanie substancji lotnych i półlotnych. Zdesorbowane zanieczyszczenia są zbierane za pomocą gazu nośnego lub próżni. Technika ta w przypadku zanieczyszczeń metalami stosowana jest w zakresie wysokich temperatur (powyżej 320°C) [22]. Po podgrzaniu gleby zanieczyszczonej rtęcią do temperatury 357°C następuje desorpcja metalu w wyniku jego wrzenia [23]. Do obniżenia stężenia cynku i miedzi dochodzi po podwyższeniu temperatury do 700°C [24].

Witryfikacja jest techniką kontrolowaną termicznie, w której zanieczyszczona metalami gleba jest podgrzewana w wysokiej temperaturze (powyżej 1500°C), co eliminuje możliwość poruszania się jonów metali ciężkich poprzez utrwalenie ich w materiale szklistym. Głównym źródłem ogrzewania zanieczyszczonej gleby jest wysokie napięcie elektryczne i plazma gazowa. Po przepuszczeniu wysokiego prądu elektrycznego przez rezystor umieszczony w glebie zostaje ona szybko podgrzana, co powoduje odparowanie lotnych, organicznych zanieczyszczeń i wyizolowanie nieorganicznych zanieczyszczeń metalami ciężkimi w postaci struktur krystalicznych. Zaobserwowano, że żelazo, nikiel i mangan ulegają immobilizacji w temperaturze 1350°C [25].

Jak wspomniano wcześniej, remediacja fizyczna jest dość prostą, szybką i skuteczną techniką postępowania z glebami zawierającymi metale ciężkie. Metoda wymiany gleby wykorzystywana jest z powodzeniem przy oczyszczaniu małych obszarów, a obróbka termiczna pozwala na oczyszczanie gleb z mniejszym zużyciem energii i niewielkimi ilościami wtórnych zanieczyszczeń w porównaniu z innymi metodami. Wadą metod fizycznych jest zmiana właściwości gleby (rozmiaru cząstek i struktury gleby), co ma wpływ na żyzność gleby. Proces ten wymaga dużych przestrzeni i dużego sprzętu, a dodatkowo dużego nakładu finansowego i kontroli emisji gazów. Co więcej, witryfikacja nie znajduje zastosowania w przypadku gleb zawierających duże ilości wilgoci i materii organicznej [6, 26].

4.2. Chemiczna remediacja gleb

Należy pamiętać, że o toksyczności metali w glebie decyduje nie tyle ich ilość, a forma, w jakiej występują. Techniki stabilizacyjne remediacji chemicznej polegają na zmodyfikowaniu sorpcyjnego kompleksu glebowego poprzez dodanie pewnych czynników poprawiających fizykochemiczne parametry wpływające na immobilizację metali ciężkich. Materiałami, jakie dodaje się do gleby, są naturalne minerały mające dobre właściwości sorpcyjne, które poprawiają odczyn gleby lub tworzą z metalami nierozpuszczalne związki. Obok technik stabilizacyjnych wykorzystuje się również techniki usuwające metale z gleby. W tym celu dodaje się do gleby płyn ekstrakcyjny zawierający odczynniki chemiczne, takie jak środki powierzchniowo czynne, kwasy, zasady, sole i środki chelatujące [2, 27]. Rozpuszczalność metali można zwiększyć za pomocą środków ługujących, które przekształcają trudno rozpuszczalne formy metali, tworzące w glebie fazę stałą, w bardziej rozpuszczalną formę [28]. Do metod chemicznych zalicza się stabilizację chemiczną, obróbkę nanocząsteczkami, stabilizację/zestalenie, chemiczne przemywanie gleby oraz remediację elektrokinetyczną (rys. 3).



Rysunek 3. Rodzaje remediacji chemicznej, opracowanie własne na podstawie [6]

Wśród metod chemicznych remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi wymienia się np. stabilizację chemiczną. Środki chelatujące desorbują metale ciężkie z gleby poprzez tworzenie silnych wiązań koordynacyjnych z metalami. Środki wielcząąsteczkowe wspomagają adsorpcję i wytrącanie w celu unieruchomienia zanieczyszczeń. Należy jednak podkreślić, że niektóre chelaty są łatwo rozpuszczalne w wodzie i ich stosowanie przyczynia się do wymywania metali z gleb, a nie do ich stabilizacji. Środki chelatujące mają wiele grup funkcyjnych, które mogą oddawać atomy azotu, siarki, tlenu i fosforu do wiązania z jonami metali [29]. Zaobserwowano też, że tlenek żelaza zmniejsza stężenie rozpuszczalnych form miedzi, ołowiu, chromu i cynku w zanieczyszczonej glebie [30].

Należy również zwrócić uwagę na stabilizację/zestalenie. Środki wiążące, takie jak asfalt, cement, glina i popiół lotny, są mieszane z glebą zanieczyszczoną metalami w celu

utworzenia stabilnej formy stałej, która zapobiega wymywaniu metalu. Proces stabilizacji ogranicza przemieszczanie się zanieczyszczeń, a środki zestalające zapobiegają dyfuzji zanieczyszczeń do środowiska w przyszłości. Proces ten jest mniej niebezpieczny dla systemów biotycznych i abiotycznych [6].

Kolejną techniką remediacji gleb jest remediacja elektrokinetyczna. W tej technice remediacji gleb wykorzystuje się bezpośrednio pole elektryczne w celu migracji zanieczyszczeń różnych jonów metali w kierunku przeciwnie naładowanej elektrody. Najpierw elektrody są zanurzone w roztworze elektrolitycznym, a następnie umieszczone w zanieczyszczonej metalami glebie tak, by ziemia znajdowała się pomiędzy dwoma elektrodami. Generowane jest pole elektryczne, które powoduje przemieszczanie jonów metali ciężkich w kierunku przeciwnie naładowanych elektrod. Jony metali ciężkich, które gromadzą się na elektrodach lub w glebie w ich pobliżu, poddaje się strącaniu, galwanizacji lub sorpcji za pomocą żywic jonowymiennych. Na skuteczność usuwania metali wpływa charakter zanieczyszczeń, zastosowane pole elektryczne, przewodność elektrolitu czy też substancja, z jakiej wykonana jest elektroda. Technika elektrokinetyczna opiera się na mechanizmach selektywnej migracji, elektroforezy i elektroosmozy [31]. Technika elektromigracji polega na migracji naładowanych cząstek poprzez zastosowanie prądu o dużym natężeniu. Ogólny proces elektromigracji zależy od napięcia pola elektrycznego oraz stężenia elektrolitu. W elektroforezie jony metali migrują wraz z naładowanymi kolidami w kierunku przeciwległej elektrody poprzez przyłożenie pola elektrycznego [6].

Pozostałe dwie metody remediacji opierają się na technikach sprzyjających usuwaniu metali ciężkich z matrycy. Przykładem jest obróbka nanocząsteczkami. Metoda ta w ostatnich latach zyskała na popularności w procesach oczyszczania gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Nanocząsteczki o średnicy poniżej 100 nm wykorzystywane są w procesie ekstrakcji metalu z zanieczyszczonej gleby. Metale podlegają adsorpcji, wytrącaniu, reakcjom utleniania i redukcji lub współstrącaniu na nanocząsteczkach żelaza [32]. Opisano nanocząstki na bazie krzemu do wychwytywania kadmu, ołowiu, miedzi i cynku z zanieczyszczonej gleby [33].

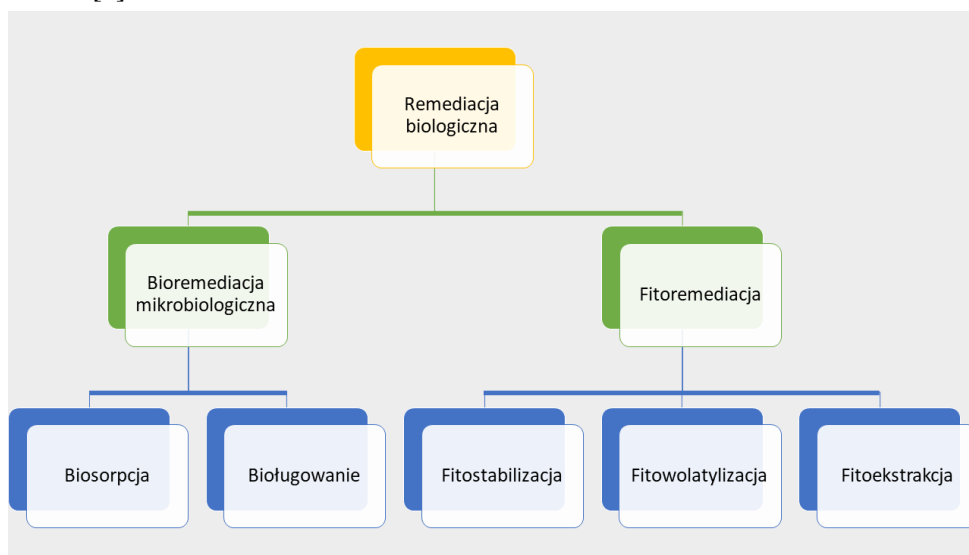
Proces chemicznego przemywania gleby jest procesem remediacji *ex situ*. Glebę przemywa się wodą, środkami powierzchniowo czynnymi, chelatorami oraz kwasami organicznymi i nieorganicznymi, które zwiększają rozpuszczalność metali. Kolejnym etapem remediacji, który prowadzi do usunięcia zanieczyszczeń z roztworu ługującego, jest wytwarzanie siarczków, węglanów, fosforanów i wodorotlenków metali. Pod koniec procesu cząstki stałe można oddzielić za pomocą procesu filtracji i sedymentacji [34]. Ponadto czysta gleba może być ponownie wykorzystana w danym miejscu [6]. Literatura donosi o zastosowaniu przy usuwaniu metali ciężkich z zanieczyszczonej gleby różnych kwasów, takich jak np. kwas poliakrylowy, kwas metylenofosfonowy, kwas glukonokarbonowy, kwas iminodibursztynowy, kwas poliasparaginowy, a także glutaminian N,N-dioctowy. Jednak stosowanie powyższych kwasów jest mniej skuteczne w porównaniu z płukaniem kwasem (etylenodiamino)tetraoctowym (EDTA) [34].

Metody chemiczne remediacji gleb są szybkie, skuteczne i mogą być wykorzystywane w glebach o niskiej przepuszczalności. Jednakże obecność środków chemicznych wpływa na właściwości gleby i powoduje wtórne zanieczyszczenie gleb wpływające na różnorodność biologiczną ekosystemów [6, 26].

4.3. Biologiczna remediacja gleb

Proces biologiczny jest naturalnym zjawiskiem, w którym mikroorganizmy i/lub rośliny są wykorzystywane do remediacji gleb zanieczyszczonych metalami (oczyszczania i stabilizacji). W tej technice metale i metaloidy są absorbowane przez organizmy żywe lub przekształcane w mniej toksyczne związki poprzez różne procesy biologiczne, tj. wydzielanie enzymów i zmiany morfologiczne komórek [35]. Procesy biologiczne można podzielić zgodnie z rysunkiem 4.

Jedną z zalet stosowania biologicznych metod remediacji jest możliwość ich wykorzystania zarówno *in situ*, jak i *ex situ*. Dodatkowo ogromne znaczenie ma nieinwazyjność względem środowiska, niskie koszty i wysoka akceptacja społeczna. Niestety biologiczna remediacja gleby jest długotrwała. Na efekty często należy czekać od kilku do nawet setek lat [2].



Rysunek 4. Rodzaje remediacji biologicznej, opracowanie własne na podstawie [6]

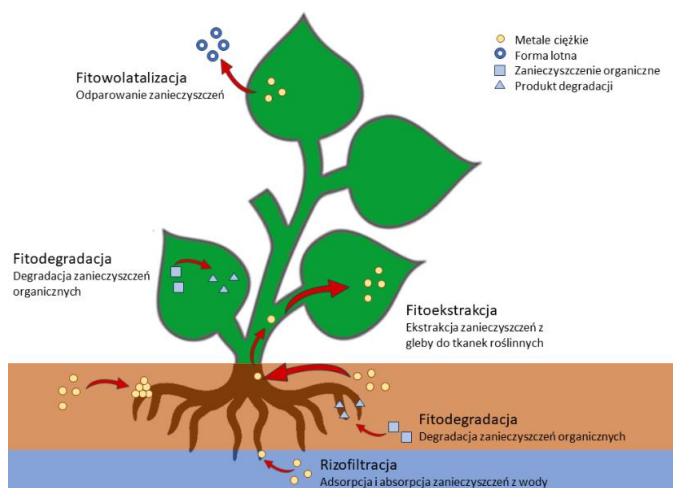
Bioremediacją nazywa się proces, który wykorzystuje występujące naturalnie mikroorganizmy (bakterie, grzyby, drożdże) lub organizmy allogeniczne wprowadzone do gleby (bioaugmentacja) w celu rozkładu substancji niebezpiecznych w warunkach tlenowych do związków o mniejszej toksyczności lub całkowicie nietoksycznych. Mikroorganizmy pochłaniają i przekształcają związki organiczne, aby uzyskać z nich substancje pokarmowe i energię. Od lat 90. XX wieku mówi się o możliwości zastosowania bioremediacji *in situ* gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi [36, 37].

Bioremediacja mikrobiologiczna polega na unieruchamianiu metali, ich utlenianiu i redukowaniu albo metabolizowaniu zanieczyszczeń zawierających metale ciężkie. Dodanie składników odżywczych, biosurfaktantów i nawozów zwiększa wydajność ekstrakcji metali. Na skuteczność usuwania metali wpływają różne czynniki, takie jak pH, temperatura, zasolenie, wilgotność, rodzaj bakterii i składników odżywczych, a także stężenie zanieczyszczenia [38]. Bioremediacja mikrobiologiczna dzieli się na biosorpcję i bioługowanie [26].

W biosorpcji różne rodzaje organizmów żywych (bakterie, grzyby, algi) są wykorzystywane do ekstrakcji jonów metali ciężkich ze skażonych gleb. Jony metali są unieruchamiane w strukturach komórkowych mikroorganizmów poprzez zewnątrzkomórkowe wiązanie jonów metali w ścianie komórkowej [35]. Wśród mikroorganizmów biorących udział w immobilizacji, czyli biosorpcji metali ciężkich w glebie, można wymienić *Shewanella oneidensis*, *Mucor circinelloides*, *Actinomucor* sp., *Mortierella* sp., *Aspergillus flavus*, *Sterigmatomyces halophilus* i wiele innych [39, 40].

Drugim rodzajem bioremediacji mikrobiologicznej jest bioługowanie, w którym mobilność jest zwiększana, a stabilność jonów metali ciężkich zmniejszana przez mikroorganizmy. Wynika to z wytwarzania przez mikroorganizmy kwasów organicznych łatwo rozpuszczających metale czy cząstki gleby [41]. Co więcej, lipidy, polisacharydy, lipopeptydy i biosurfaktanty wykazują wysoką aktywność powierzchniową, która zwiększa powinowactwo wiązania jonów metali i zdolność tworzenia chelatów [42].

Alternatywą bioremediacji jest fitoremediacja, która polega na remediacji gleb z wykorzystaniem roślin wyższych. Od dawna rośliny wyższe, ale również porosty i mszaki, znajdują zastosowanie do oceny stanu zanieczyszczenia środowiska [2]. Rośliny biorące udział w fitoremediacji są w stanie pochłaniać, przenosić i stabilizować zanieczyszczenia metalami z gleby. Korzenie roślin posiadają enzymy, które umożliwiają gromadzenie metali i osadzanie ich w biomase roślinnej nad glebą [2, 6]. Wśród fitoremediacji wymienia się: fitodegradację, fitoekstrakcję, fitostabilizację, fitowolatalizację, rizofiltrację i rizodegradację. Do remediacji gleby z zanieczyszczeń nieorganicznych wykorzystuje się fitoekstrakcję, fitostabilizację, fitowolatalizację i rizofiltrację [2] (rys. 5).



Rysunek 5. Proces fitoremediacji gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi, opracowanie własne na podstawie [43]

Fitoremediacja gleb jest procesem uprawy roślin, które pochłaniają, przenoszą i stabilizują metale ciężkie w środowisku silnie zanieczyszczonym. Proces ten nie tylko ma za zadanie tanio usunąć metale ciężkie, ale również przywrócić piękno krajobrazu terenom zniszczonym i zurbanizowanym. Co więcej, dzięki wykorzystaniu roślin teren jest chroniony przed erozją [2]. Fitoekstrakcja jest procesem powolnym, jednak w przypadku roślin o dużych korzeniach i pędach może względnie szybciej gromadzić duże ilości jonów metali z gleby [44].

Fitostabilizacja polega na biostabilizacji jonów metali ciężkich przez rośliny poprzez ograniczenie ich przemieszczania się w glebie. Zanieczyszczenia unieruchamiane są poprzez absorpcję oraz akumulację przez korzenie, adsorpcję na ich powierzchni, a także precypitację w ryzosferze. Ryzosfera jest przestrzenią obejmującą powierzchnię korzenia oraz otaczającą go glebę. Fitostabilizacja zmniejsza mobilność zanieczyszczeń, co ogranicza przedostawanie się ich do wód gruntowych i powietrza. Również zmniejszona jest bioprzyswajalność zanieczyszczeń, tak by nie były one włączane do łańcucha pokarmowego. Korzenie roślin mają fitochelatynę i metalotioneinę, które tworzą kompleksy z jonami metali i immobilizują metale w glebie zanieczyszczonej tymi jonami [6].

Fitoekstrakcja inaczej określana jest jako fitoakumulacja, ponieważ polega na usuwaniu nagromadzonych w glebie metali ciężkich i innych związków nieorganicznych, a następnie magazynowaniu ich w nadziemnych pędach roślin. Proces ten polega na pobieraniu przez korzenie zanieczyszczeń metalicznych obecnych w glebie, następnie translokacji i magazynowaniu w częściach naziemnych rośliny. Technika ta polega na wielokrotnym zbieraniu biomasy w celu obniżenia stężenia zanieczyszczeń metalami z gleby. Rośliny dobiera się, biorąc pod uwagę rodzaj zanieczyszczenia i jego stężenia. Pewne rośliny, zwane hiperakumulatorami, mają umiejętność pochłaniania, absorbowania niezwykle dużych ilości metali ciężkich. Definicja i graniczne wartości hiperakumulacji są stale dyskutowane. Przyjmowano, że hiperakumulatory pochłaniają: Cd > 100 mg, Cu i Ni > 1000 mg, Zn i Mn > 10 000 mg czy Pb > 800 mg w kg suchej masy, jednakże aktualnie dla niklu za granicę hiperakumulacji uznaje się zwykle 10000 mg/kg gleby. Rośliny po okresie wegetacji (od kilku tygodni do kilku miesięcy) są zbierane [2, 45, 46]. Przykładem detoksykacji metali ciężkich jest ich kompleksowanie w komórkach przez kwasy karboksylowe i wyspecjalizowane białka zwane metalotioneinami. Opisano około 400 gatunków roślin będących hiperakumulatorami, należących do różnych rodzin i najczęściej występujących w strefie zwrotnikowej i równikowej. Najczęściej rośliny te są endemitami, czyli roślinami z występowaniem ograniczonym do konkretnego obszaru. W Europie opisane zostały nieliczne gatunki roślin hiperakumulatorów. Głównie są to rośliny należące do rodzaju smagliczki (*Alyssum*) oraz tobołki (*Thlaspi*), które akumulują nikiel, ołów, kadm i cynk [2]. Hiperakumulatory biorą udział w fitoekstrakcji ciągłej i fitoekstrakcji wspomaganej. Fitoekstrakcja ciągła opiera się na procesach fizjologicznych, które pozwalają roślinom na akumulowanie jonów metali w całym okresie wegetacji. Taki proces po dobraniu odpowiednich hiperakumulatorów umożliwia oczyszczenie średnio zanieczyszczonej gleby w przeciągu kilku lat. Przykładowo: znaczne usunięcie zanieczyszczenia cynkiem na poziomie 440 mg/kg gleby w sprzyjających warunkach trwa do około 10 lat [2]. Fitoekstrakcja umożliwia usunięcie niewielkich ilości cynku i kadmu z wykorzystaniem innych roślin niż hiperakumulatory. Fitoekstrakcja nie znajduje jednak zastosowania dla gleby zanieczyszczonej Cu, Pb i Cr. Fitoekstrakcja wspomagana wykorzystuje zwiększenie pobierania przez rośliny metali poprzez dodanie do gleby substancji chelatujących. Związki te zwiększają fitoprzyswajalność jonów metali oraz ułatwiają ich transport do nadziemnych części roślin. Poza roślinami hiperakumulatorowymi w fitoekstrakcji wspomaganej można by wykorzystywać rośliny uprawne, jak chociażby owies, gorczycę czy jęczmień, jednak technika ta nie ma dużego zastosowania w praktyce, gdyż stwarza wtórne zagrożenie dla środowiska związane z uruchomieniem metali [2].

Do zalet fitoekstrakcji zaliczyć można prowadzenie procesu *in situ*, co nie powoduje w środowisku dodatkowych szkód wynikających z przemieszczania skażonej gleby. Dodatkowo proces ten nie degraduje oczyszczanej matrycy i ogranicza ryzyko skażenia innych matryc środowiskowych, np. wód. Niezaprzeczalną zaletą takiego oczyszczania gleb jest walor krajobrazowy wynikający z obsadzania terenów roślinnością, co spotyka się z ogólną akceptacją społeczną. Także nakłady finansowe są niższe w porównaniu z metodami fizykochemicznymi. Wadą jest długotrwałość procesu, a także niewielka mobilność metali. Przykładowo: ołów jest trudno przyswajalny i magazynowany przede wszystkim w korzeniach, co utrudnia usunięcie zmagazynowanego metalu z gleby. Prowadzi się badania nad manipulacją genetyczną zmierzającą do rozwoju nowych odmian szybko rosnących roślin mających zdolności akumulujące. Rośliny biorące udział w fitoekstrakcji stanowią niebezpieczeństwo, co wynika z ryzyka włączenia metali do łańcucha pokarmowego. Teren, na którym gleba jest oczyszczana, powinien być ogrodzony tak, by nie była możliwa rekreacja, chów zwierząt czy wykorzystywanie roślin jako pożywienia dla zwierząt i ludzi. Co więcej, problematyczne jest postępowanie z fitoakumulatorami po zakończonym procesie oczyszczania. Są one często składowane po uprzednim zmniejszeniu objętości poprzez pirolizę i stabilizację popiołów. Takie odpady stanowią ogromne zagrożenie jako odpady toksyczne. Jak na razie, odzysk metali ciężkich nie jest opłacalny [26].

Ciekawym rodzajem fitoekstrakcji jest fitogórnictwo, które opiera się na akumulowaniu metali o dużej wartości rynkowej celem pozyskiwania tych metali. Metodę tę głównie wykorzystuje się do pozyskiwania niklu z terenów i odpadów o dużym rozproszeniu (z zastosowaniem gatunków hiperakumulujących), gdzie klasyczne metody są niemożliwe do wdrożenia [46].

Fitowolatyliczacja polega na pobraniu przez rośliny zanieczyszczeń, które są przekształcane w formy lotne, a następnie emitowane do atmosfery w procesie transpiracji. Proces ten zachodzi, kiedy rosnące drzewa i rośliny pobierają wodę wraz z zanieczyszczeniem, która to woda dalej przemieszcza się do liści, a następnie wyparowuje do atmosfery. Proces ten wykorzystuje się w przypadku konieczności usunięcia zanieczyszczeń lotnych, głównie organicznych (np. rozpuszczalniki chloroorganiczne). Fitowolatyliczacja teoretycznie mogłaby służyć usuwaniu z wód i gleb nielicznych pierwiastków tworzących formy lotne, to jest arsenu, selenu czy rtęci [2]. Przykładowo: roślina traganek groniasty (*Astragalus racemosus*) magazynuje selen i wydziela go w formie selenku dimetylu, który ma charakterystyczny zapach czosnku [47]. Fitowolatyliczacja rtęci nie jest stosowana w praktyce, ale udowodniono, że byłaby możliwa pod warunkiem hodowli transgenicznych roślin z genem bakteryjnym *merA*, który jest odpowiedzialny za syntezę reduktazy rtęciowej. Enzym ten ma zdolność redukcji toksycznego jonu Hg^{2+} do mniej toksycznej lotnej metalicznej rtęci Hg^0 [2, 48]. Arsen zostaje przemieniony i usunięty w formie lotnej jedynie przez glony morskie, bakterie i grzyby [47]. Fitowolatyliczacja wiąże się z dużym ryzykiem skażenia środowiska, ponieważ lotne związki metali dostają się do atmosfery i docierają do dalej położonych terenów, powodując skażenie [2]. Na podstawie badań przeprowadzonych w ciągu ostatnich kilku lat stwierdzono, że rośliny z gatunku *Astragalus racemosus* i *Arabidopsis thaliana* zwiększają lotność selenu i rtęci, a także przekształcają selen w diselenek dimetylu, a rtęć(II) w rtęć elementarną [49].

4.4. Połączenie metod remediacji gleb

Ze względu na różny poziom skuteczności oraz kosztowność metod remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi zaczęto prowadzić badania łączące ze sobą metody fizyczne, chemiczne i biologiczne, uzyskując nierzadko lepsze parametry oczyszczania. Takie połączenia mają na celu zwiększenie skuteczności i szybkości usuwania metali, ale również usunięcie dodatkowych zanieczyszczeń znajdujących się w glebach [6].

4.4.1. Połączenie procesu remediacji chemicznej i biologicznej

Połączenie metod remediacji chemicznej i biologicznej obejmuje obróbkę chemiczną, po której następuje obróbka biologiczna, i odwrotnie. Takie postępowanie zwiększa skuteczność oraz ekonomiczność remediacji. Uznawane jest za przyjazną dla środowiska alternatywę dla pojedynczych technologii oczyszczania [50]. Dla przykładu, połączenie działania grzybów *Fusarium chlamydosporium* ze strącaniem chemicznym pozwoliło na zmniejszenie stężenia jonów metali chromu o 62% w badanych próbkach zanieczyszczonej gleby [51].

4.4.2. Połączenie procesu remediacji elektrokinetycznej i mikrobiologicznej

W metodzie tej początkowo gleby są elektrochemicznie przekształcane w użyteczne produkty uboczne i wytwarzają bioelektryczność poprzez mikrobiologiczne procesy metaboliczne. Ocenia się, że proces ten promuje biodostępność zanieczyszczeń, zwiększa wydajność bioremediacji poprzez strefy utleniania i redukcji, poprawia transport składników odżywczych, ekstrakcję zanieczyszczeń gleby oraz dostępność akceptorów elektronów [52]. Bakterie kwasolubne pomagają w elektrokinetyce, podczas gdy zasadowolubne sprzyjają wytrącaniu metali. Ze względu na wysoką wydajność usuwania, oszczędność energii i brak wtórnego zanieczyszczenia połączony proces bioremediacji elektrokinetycznej jest szeroko stosowany do remediacji zanieczyszczeń gleby [6].

4.4.3. Połączenie procesu remediacji elektrokinetycznej i fitoremediacji

Ta połączona metoda remediacji obejmuje obróbkę elektrokinetyczną, po której następuje obróbka fitoremediacyjna, i odwrotnie. W elektrokinetyce bezpośredni prąd elektryczny przepływa między elektrodami [53]. Fitoremediacja zależy jednak od mechanizmu pobierania przez rośliny zanieczyszczeń. Pole elektryczne o niskim natężeniu jest stosowane w pobliżu roślin rosnących w zanieczyszczonej glebie, co zwiększa biodostępność różnych form metali. Co więcej, to zintegrowane podejście zapewnia skuteczne wyniki w zakresie odzysku metali i jest bardziej ekonomiczne w porównaniu z innymi zintegrowanymi metodami. Przykładem jest zastosowanie zintegrowanej metody elektrokinetyczno-fitoremediacyjnej do usuwania ołowiu z zanieczyszczonej gleby i uzyskanie 2-4 razy skuteczniejszych wyników w porównaniu do osobnych metod remediacji. Jest to przykład fitoremediacji wspomaganiej EDTA, jednak taka technika nie ma dużego zastosowania praktycznego [54].

5. Wnioski

Zanieczyszczenie gleb metalami ciężkimi stanowi poważny problem ze względu na ich szkodliwość dla roślin, zwierząt oraz człowieka. Aby przeprowadzić proces remediacji, należy najpierw określić rodzaj i stężenie obecnego zanieczyszczenia. Na zdolność remediacji wpływa przepuszczalność, odczyn, temperatura oraz rodzaj gleby. Ze względu na cel remediacji stosowane metody dzieli się na metody służące stabilizacji oraz oczysz-

czaniu (usuwaniu) metali. Ze względu na zastosowane mechanizmy w obu strategiach można wyróżnić metody fizyczne, chemiczne i biologiczne.

Metody fizyczne stanowią najłatwiejsze metody usuwania metali ciężkich z zanieczyszczonej gleby, ale są dość pracochłonne i kosztowne w porównaniu z metodami biologicznymi i chemicznymi. Metody chemiczne są szybkie i charakteryzują się wysoką skutecznością oczyszczania gleb. Jednakże są drogie i raczej nieprzyjemne dla środowiska. Co więcej, znajdują zastosowanie szczególnie w małej skali. Natomiast metody biologiczne są przyjazne dla środowiska, ale wymagają szczególnych mikroorganizmów czy roślin w celu usunięcia określonego rodzaju zanieczyszczeń. Dodatkowo metody biologiczne charakteryzują się czasochłonnością. Do zalet takiego oczyszczania zalicza się prostotę wykonania i opłacalność. Rozwiązaniem staje się połączenie trzech metod remediacji w różnych konfiguracjach, tak by wyostrzyć zalety a zniwelować wady poszczególnych technik.

Literatura

1. Kabata-Pendias A., Pendias H., *Trace elements in soils and plants*, CRC Press, Boca Raton 2001.
2. Buczkowski R., Kondzielski I., Szymański T., *Metody remediacji gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi*, Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń 2002.
3. Antonkiewicz J., Gworek B., *Remediacja zanieczyszczonych gleb i ziem*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2023.
4. Mocek A., Drzymała S., Owczarzak W., *Podstawy analizy i klasyfikacji gleb*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2022.
5. Fischer A., Brodziak-Dopierała B., Steuer M., Rajczykowski K., Kowol J., *The concentration of cadmium in spice plants available on the market and in individual growing areas*, *Medycyna Środowiskowa*, 20, 2017, s. 27-33.
6. Kumar V., Rout C., Singh J., Saharan Y., Goyat R., Umar A., Akbar S., Baskoutas S., *A review on the clean-up technologies for heavy metal ions contaminated soil samples*, *Heliyon*, 9, 2023, s. 15472.
7. Chrzan A., *Zawartość wybranych metali ciężkich w glebie i korze sosny*, *Proceedings ECOpole*, 7, 2013, s. 547-552.
8. Alengebawy A., Abdelkhalek S.T., Qureshi S.R., Wang M.Q., *Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: ecological risks and human health implications*, *Toxics*, 9, 2021, s. 42.
9. Imura K., Ito H., Chino M., Morishita T., Hirata H., *Behavior of contaminant heavy metals in soil-plant system*, *Proceedings Environmental Science*, Tokyo 1977.
10. Bowen H.J.M., *Environmental Chemistry of the Elements*, Academic Press, New York 1979.
11. Siuta J., *Rekultywacja gruntów. Poradnik*, Wydawnictwo Instytutu Ochrony Środowiska, Warszawa 1998.
12. Park B., Son Y., *Ultrasonic and mechanical soil washing processes for the removal of heavy metals from soils*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 2017, s. 640-645.
13. Liao X., Li Y., Yan X., *Removal of heavy metals and arsenic from a co-contaminated soil by sieving combined with washing process*, *Journal of Environmental Sciences*, 41, 2016, s. 202-210.
14. Dermont G., Bergeron M., Mercier G., Richer-Laflèche M., *Soil washing for metal removal: A review of physical/chemical technologies and field applications*, *Journal of Hazardous Materials*, 152, 2008, s. 1-31.
15. Mustapha M.U., Halimoon N., *Screening and isolation of heavy metal tolerant bacteria in industrial effluent*, *Procedia Environmental Sciences*, 30, 2015, s. 33-37.

16. Fato F.P., Li D.-W., Zhao L.-J., Qiu K., Long Y.-T., *Simultaneous removal of multiple heavy metal ions from river water using ultrafine mesoporous magnetite nanoparticles*, ACS Omega, 4, 2019, s. 7543-7549.
17. Dermont G., Bergeron M., Mercier G., Richer-Lafleche M., *Metal-contaminated soils: remediation practices and treatment technologies*, Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management, 12, 2008, s. 188-209.
18. Jeong H., Ra K., *Investigations of metal pollution in road dust of steel industrial area and application of magnetic separation*, Sustainability, 14, 2022, s. 919.
19. Yi Y.M., Sung K., *Influence of washing treatment on the qualities of heavy metal-contaminated soil*, Ecological Engineering, 81, 2015, s. 89-92.
20. Valentim dos Santos J., Varón-López M., Fonsêca Sousa Soares C.R., Lopes Leal P., Siqueira J.O., de Souza Moreira F.M., *Biological attributes of rehabilitated soils contaminated with heavy metals*, Environmental Science and Pollution Research, 23, 2016, s. 6735-6748.
21. Derakhshan Nejad Z., Jung M.C., Kim K.-H., *Remediation of soils contaminated with heavy metals with an emphasis on immobilization technology*, Environmental Geochemistry and Health, 40, 2018, s. 927-953.
22. Chang T.C., Yen J.H., *On-site mercury-contaminated soils remediation by using thermal desorption technology*, Journal of Hazardous Materials, 128, 2006, s. 208-217.
23. He F., Gao J., Pierce E., Strong P.J., Wang H., Liang L., *In situ remediation technologies for mercury-contaminated soil*, Environmental Science and Pollution Research, 22, 2015, s. 8124-8147.
24. Sharma S., Tiwari S., Hasan A., Saxena V., Pandey L.M., *Recent advances in conventional and contemporary methods for remediation of heavy metal-contaminated soils*, 3 Biotech, 8, 2018, s. 216.
25. Navarro A., Cardellach E., Cañadas I., Rodríguez J., *Solar thermal vitrification of mining contaminated soils*, International Journal of Mineral Processing, 119, 2013, s. 65-74.
26. Rehman Z., Junaid M.F., Ijaz N., Khalid U., Ijaz Z., *Remediation methods of heavy metal contaminated soils from environmental and geotechnical standpoints*, Science of the Total Environment, 867, 2023, s. 161468.
27. Islam M.N., Taki G., Nguyen X.P., Jo Y.-T., Kim J., Park J.-H., *Heavy metal stabilization in contaminated soil by treatment with calcined cockle shell*, Environmental Science and Pollution Research, 24, 2017, s. 7177-7183.
28. Li Z., Wang L., Wu J., Xu Y., Wang F., Tang X., Xu J., Ok Y.S., Meng J., Liu X., *Zeolite-supported nanoscale zero-valent iron for immobilization of cadmium, lead, and arsenic in farmland soils: Encapsulation mechanisms and indigenous microbial responses*, Environmental Pollution, 260, 2020, s. 114098.
29. Seshadri B., Bolan N.S., Choppala G., Kunhikrishnan A., Sanderson P., Wang H., Currie L.D., Tsang D.C.W., Ok Y.S., Kim K., *Potential value of phosphate compounds in enhancing immobilization and reducing bioavailability of mixed heavy metal contaminants in shooting range soil*, Chemosphere, 184, 2017, s. 197-206.
30. Kumpiene J., Lagerkvist A., Maurice C., *Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – A review*, Waste Management, 28, 2008, s. 215-225.
31. Reddy K.R., Cameselle C., *Electrochemical remediation technologies for polluted soils, sediments and groundwater*, John Wiley & Sons, New Jersey 2009.
32. Guere M.T., Di L., Allahverdeyeva G., Petrucci E., Stoller M., Vilardi G., *The influence of heavy metals and organic matter on hexavalent chromium reduction by nano zero valent iron in soil*, Chemical Engineering Transactions, 47, 2016, s. 289-294.
33. Lin H., Wang Z., Liu C., Dong Y., *Technologies for removing heavy metal from contaminated soils on farmland: A review*, Chemosphere, 305, 2022, s. 135457.

34. Wang G., Pan X., Zhang S., Zhong Q., Zhou W., Zhang X., Wu J., Vijver M.G., Peijnenburg W.J.G.M., *Remediation of heavy metal contaminated soil by biodegradable chelator-induced washing: Efficiencies and mechanisms*, Environmental Research, 186, 2020, s. 109554.
35. Bano A., Hussain J., Akbar A., Mehmood K., Anwar M., Hasni M.S., Ullah S., Sajid S., Ali I., *Biosorption of heavy metals by obligate halophilic fungi*, Chemosphere, 199, 2018, s. 218-222.
36. Tichy R., Grotenhuis J.T.C., Rulkens W.H., *Bioleaching of zinc-contaminated soils with Thiobacilli*, [w:] *Integrated soil and sediment research: A basis for proper protection*, Kulwer Academic Publishers, Amsterdam 1993.
37. Zagury G.J., Narasiah K.S., Tyagi R.D., *Adaptation of indigenous iron-oxidizing bacteria for bioleaching of heavy metals in contaminated soils*, Environmental Technology, 15, 1994, s. 517-530.
38. Zabochnicka-Świątek M., Krzywonos M., *Potentials of biosorption and bioaccumulation processes for heavy metal removal*, Polish Journal of Environmental Studies, 23, 2014, s. 551-561.
39. Raghad J., Amin A.S., Asaad A.T., *Bioaccumulation of cadmium and lead by Shewanella oneidensis isolated from soil in Basra governorate*, African Journal of Microbiology Research, 10, 2016, s. 370-375.
40. Vellanki S., Navarro-Mendoza M.I., Garcia A., Murcia L., Perez-Arques C., Garre V., Nicolas F.E., Lee S.C., *Mucor circinelloides: growth, maintenance, and genetic manipulation*, Current Protocols in Microbiology, 49, 2018, s. 53.
41. Yang Z., Shi W., Yang W., Liang L., Yao W., Chai L., Gao S., Liao Q., *Combination of bioleaching by gross bacterial biosurfactants and flocculation: A potential remediation for the heavy metal contaminated soils*, Chemosphere, 206, 2018, s. 83-91.
42. Wen Y.-M., Wang Q.-P., Tang C., Chen Z.-L., *Bioleaching of heavy metals from sewage sludge by Acidithiobacillus thiooxidans – a comparative study*, Journal of Soils and Sediments, 12, 2012, s. 900-908.
43. Rigoletto M., Calza P., Gaggero E., Malandrino M., Fabbri D., *Bioremediation methods for the recovery of lead-contaminated soils: a review*, Applied Sciences, 10, 2020, s. 3528.
44. Dumbrava A., Birghila S., Munteanu M., *Contributions on enhancing the copper uptake by using natural chelators, with applications in soil phytoremediation*, International Journal of Environmental Science and Technology, 12, 2015, s. 929-938.
45. Nwaichi E.O., Dhankher O.P., *Heavy metals contaminated environments and the road map with phytoremediation*, Journal of Environmental Protection, 7, 2016, s. 41-51.
46. Brooks R.R., *The potential use of hyperaccumulators and other plants for phytomining*, [w:] *Plants that hyperaccumulate heavy metals*, CAB International, Wallingford 1997.
47. Salt D.E., Smith R.D., Raskin I., *Phytoremediation*, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 49, 1998, s. 643-668.
48. Heaton A.C.P., Rugh C.L., Wang N., Meagher R.B., *Phytoremediation of mercury- and methylmercury-polluted soils using genetically engineered plants*, Journal of Soil Contamination, 7, 1998, s. 497-509.
49. Hussein H.S., Ruiz O.N., Terry N., Daniell H., *Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots, and volatilization*, Environmental Science & Technology, 41, 2007, s. 8439-8446.
50. Pradhan D., Sukla L.B., Sawyer M., Rahman P.K.S.M., *Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: a review*, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 55, 2017, s.1-20.
51. Sharma S., Malaviya P., *Bioremediation of tannery wastewater by chromium resistant fungal isolate Fusarium chlamydosporium SPFS2-g*, Current World Environment, 9, 2014, s. 721.

52. Maini G., Sharman A.K., Knowles C.J., Sunderland G., Jackman S.A., *Electrokinetic remediation of metals and organics from historically contaminated soil*, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 75, 2000, s. 657-664.
53. Cao X., Ma L.Q., Shiralipour A., *Effects of compost and phosphate amendments on arsenic mobility in soils and arsenic uptake by the hyperaccumulator, Pteris vittata L.*, Environmental Pollution, 126, 2003, s. 157-167.
54. Lim J.M., Salido A.L., Butcher D.J., *Phytoremediation of lead using Indian mustard (Brassica juncea) with EDTA and electrodrics*, Microchemical Journal, 76, 2004, s. 3-9.

Remediacja gleb zanieczyszczonych metalami ciężkimi

Streszczenie

Gleba jest jednym z najważniejszych odnawialnych bogactw naturalnych Ziemi, a jednocześnie podstawą funkcjonowania wszystkich ekosystemów lądowych. Gleby, które są zanieczyszczone i zdegradowane, tracą częściowo lub całkowicie swoje pierwotne właściwości fizykochemiczne oraz funkcje biologiczne. Dlatego też niezbędne jest wprowadzenie działań mających na celu oczyszczenie takich gleb lub usunięcie ryzyka związanego z istnieniem zanieczyszczeń w glebach. Działania takie nie są łatwe i polegają przede wszystkim na określeniu rodzaju i stężenia zanieczyszczeń, a następnie opracowaniu najodpowiedniejszych strategii remediacyjnych, biorąc pod uwagę otrzymane dane. Istnieje wiele metod remediacji gleb z różnych zanieczyszczeń. Ze względu na cel remediacji stosowane metody dzieli się na metody służące stabilizacji (immobilizacji) oraz oczyszczaniu (usuwaniu) metali. Ze względu na zastosowane mechanizmy w obu strategiach można wyróżnić metody fizyczne, chemiczne i biologiczne. Każda z tych grup metod posiada zalety i wady, a na wybór wpływa wiele czynników. W ostatnim czasie coraz popularniejsze staje się połączenie dwóch lub trzech metod remediacji, by uzyskać jak najlepsze wyniki, eliminując wady poszczególnych metod remediacji.

Słowa kluczowe: remediacja, gleba, metale ciężkie, ochrona środowiska

Remediation of soils contaminated with heavy metals

Abstract

Soil is one of Earth's most important renewable natural resources, and at the same time the basis for the functioning of all terrestrial ecosystems. Soils that are polluted and degraded lose partially or completely their original physicochemical properties and biological functions. Therefore, it is necessary to introduce measures to clean up such soils. Such measures are not easy and consist primarily of determining the type and concentration of contaminants, and then developing the most appropriate remediation strategies taking into account the data obtained. There are many methods for remediating soils from various contaminants. Due to the purpose of remediation, the methods used are divided into methods for stabilization (immobilization) and cleanup involving the removal of metals. Due to the mechanisms used in both strategies, physical, chemical and biological methods can be distinguished. Each of these methods has advantages and disadvantages, and many factors influence the choice. Recently, it has become increasingly popular to combine two or three remediation methods to get the best results while eliminating the disadvantages of each remediation method.

Keywords: remediation, soil, heavy metals, environmental protection

Identyfikacja źródeł zanieczyszczeń w wodach na podstawie badań izotopowych azotu i siarki oraz modelowania matematycznego

1. Wprowadzenie

Zanieczyszczenie wód powierzchniowych i podziemnych jest problemem globalnym, wpływającym na uszczuplenie zasobów wód pitnych oraz stwarzającym zagrożenie utraty zdrowia i życia. Na skutek zanieczyszczenia wód pitnych codziennie umiera na świecie 14 tys. osób [1, 2]. Według raportu UNESCO z 2021 roku [3] z powodu biegunki wywołanej pićciem lub używaniem zanieczyszczonej wody w ciągu roku umiera około 830 tys. ludzi, w tej liczbie 300 tys. stanowią zgony dzieci do lat 5. Ten sam raport podaje, że światowe zużycie wody wzrosło sześciokrotnie w ciągu ostatniego stulecia i od lat 80. jest to wzrost o ok. 1% w skali rocznej.

Zubożeniu ilościowemu towarzyszy degradacja jakościowa spowodowana rozwojem przemysłu, miast, a także rolnictwem. Szacuje się, że około 80% ścieków przemysłowych i komunalnych trafia do środowiska bez uprzedniego oczyszczenia. Zanieczyszczenia trafiają zarówno do wód powierzchniowych, jak i podziemnych, co oddziałuje negatywnie na ekosystemy wodne, zdrowie ludzi, hamując zrównoważony rozwój społeczny [4].

Zanieczyszczenia mogą dostawać się do wód z ognisk punktowych (zrzuty ścieków), liniowych (drogi) oraz obszarowych (składowiska odpadów, pola uprawne) [5]. Ogniska punktowe są łatwiejsze do wykrycia [6]. W przypadku nieznanego ogniska zanieczyszczeń, wielu źródeł lub skażenia całego obszaru znacznie trudniej kontrolować migrację i usuwać zanieczyszczenie. Dodatkowo na transport substancji w środowisku gruntowo-wodnym wpływają procesy: absorpcji, utleniająco-redukcyjne, dyfuzji i rozpuszczania. Na sposób i szybkość przemieszczania się zanieczyszczeń w wodzie wpływ mają także niejednorodność gruntu i zmienne warunki przepływu wód [7].

Należy także podkreślić, że zanieczyszczenie może oddziaływać na środowisko gruntowo-wodne przez wiele lat. Dlatego też jego odnalezienie i zidentyfikowanie pozwalają na celowe działania oczyszczające, a tylko trwałe usunięcia zapewniają poprawę jakości wód.

Identyfikacja i lokalizacja zanieczyszczenia wymagają opracowania odpowiednich metod analitycznych oraz modelowych. Ich testowanie prowadzi do uzyskania wiarygodnych wyników. Łatwiejszy dostęp do modeli statystycznych, nowych języków programowania (Python, R) oraz zastosowanie nowej aparatury także poprawiają stan wiedzy o rozprzestrzenianiu się i źródłach zanieczyszczeń wód powierzchniowych i podziemnych.

Ustalenie genezy zanieczyszczenia wody jest problemem odwrotnym, tzn. na podstawie obserwacji dochodzimy do wniosków stwierdzających, co mogło zanieczyścić wodę, kiedy i gdzie. W ostatnich latach do tego celu stosowano specjalnie zaprojektowane sieci monitoringowe i analizy geoprzestrzenne [8], sieci neuronowe (ANN) [9]. Do

¹ k.samborska-goik@ietu, Zakład Badań i Rozwoju, Instytut Ekologii Terenów Uprzemysłowionych, <https://ietu.pl/>.

określenia źródła zanieczyszczeń wód podziemnych i powierzchniowych używano także: stochastycznych równań różniczkowych [10], modelowania procesów wielkoskalowych [11], filtru zespołowego Kalmana [12], interpolacji wielokwadratowej [13], metody Monte Carlo [14], uczenia maszynowego [15], modelowania Bayesa [16].

Od wielu lat metodami stosowanymi do identyfikacji zanieczyszczeń są także badania izotopowe składników rozpuszczonych w wodach, które pozwalają ustalić pochodzenie: azotanów ($\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{11}\text{B}$), siarczanów ($\delta^{34}\text{S}$), zasolenia ($\delta^{36}\text{Cl}$) oraz procesy, jakim podlegają zanieczyszczenia nieorganiczne i organiczne (biodegradacja, denitryfikacja, redukcja siarczanów). Najprostszą metodą określenia pochodzenia składników rozpuszczonych w wodach jest porównanie ich składu izotopowego z wartościami zmierzonymi w substancji źródłowej. Gdy na podstawie badań terenowych oraz studialnych istnieje podejrzenie, że uzyskane wyniki badań izotopowych mogą być efektem działania kilku źródeł, zastosowanie mogą mieć modele mieszania, modelowanie deterministyczne i stochastyczne.

Modele deterministyczne oparte są zwykle na rozkładach przestrzennych parametrów odpowiedzialnych za migrację zanieczyszczeń oraz biblioteki reakcji. Natomiast modele stochastyczne zazwyczaj upraszczają proces transportu i korzystają z rozkładów prawdopodobieństwa parametrów takich jak przewodność hydrauliczna czy koncentracje zanieczyszczeń. Do sprawdzonych modeli probabilistycznych należą modele oparte na metodzie Monte Carlo oraz teorii Bayesa. Te modele jako wynik podają prawdopodobny zakres procentowy udziału poszczególnych źródeł w całkowitym ładunku zanieczyszczenia.

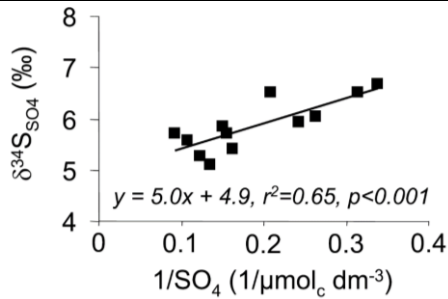
Celem pracy jest przedstawienie zastosowania badań izotopowych azotu ($\delta^{15}\text{N}$) i siarki ($\delta^{34}\text{S}$) oraz badań modelowych do określenia pochodzenia siarczanów i azotanów, których duże ilości w wodach mogą stanowić powód pogorszenia ich jakości i w konsekwencji braku przydatności do spożycia. W pracy pokazano zastosowanie modeli liniowych, modelu hydrogeochemicznego oraz modeli statystycznych, np. opartych na metodzie Monte Carlo oraz teorii Bayesa. Badania izotopowe oraz ich analiza przy użyciu metod matematycznych pozwalają z dużą precyzją określić udział różnych źródeł w całkowitym ładunku danego składnika, co może pomóc w lepszym zarządzaniu wodami, np. ograniczeniu spływu wód z terenów rolniczych zawierających azotany czy zapobieganiu wahań zwierciadła wód w strefie wietrzenia siarczków w celu zmniejszenia zawartości siarczanów.

2. Określenie źródeł siarczanów w wodach podziemnych

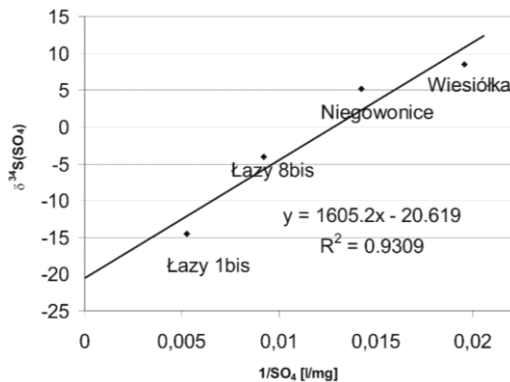
2.1. Mieszanie dwuskładnikowe

Siarczany rozpuszczone w wodach podziemnych mogą pochodzić z wielu źródeł: geogenicznych i antropogenicznych. Do źródeł naturalnych należą minerały siarczkowe, ewaporaty. Natomiast do źródeł antropogenicznych: emisje, siarczany zawarte w ściekach. Z zestawienia odwrotności stężeń oraz składu izotopowego rozpuszczonych siarczanów ($\delta^{34}\text{S}$) można wywnioskować, czy siarczany pochodzą z dwóch źródeł o różnym składzie izotopowym, czyli czy doszło do procesu mieszania.

W przypadku mieszania dwuskładnikowego wykres zależności składu izotopowego rozpuszczonego składnika od odwrotności jego stężeń przyjmuje postać liniową, na podstawie funkcji dopasowanej do zmierzonych wartości można określić skład izotopowy jednego ze składników – punkt przecięcia z osią y – $\delta^{34}\text{S}$ (rys. 1 i 2).



Rysunek 1. Zależność między siarczanami rozpuszczonymi w wodach podziemnych oraz ich składem izotopowym – wskazująca na dwa źródła siarczanów [17]



Rysunek 2. Zależność między siarczanami rozpuszczonymi w wodach podziemnych oraz ich składem izotopowym – wskazujące na dwa źródła siarczanów, przykład ze zbiornika Olkusz-Zawiercie; opracowanie własne [18]

Taką prawidłowość wykorzystano w określeniu genezy siarczanów w ujęciach wód podziemnych w zbiorniku Olkusz-Zawiercie (badania własne) [18]. Do określenia procentowego udziału źródeł siarczanów w wodach podziemnych użyto następującego równania:

$$\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4} = x\delta^{34}\text{S}_{\text{siarczki}} + (1 - x)\delta^{34}\text{S}_{\text{gips}} \quad (1)$$

Gdzie: $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ – obserwowany skład izotopowy siarczanów, x – udział procentowy siarczków w całkowitym ładunku siarczanów, $\delta^{34}\text{S}_{\text{siarczki}}$ – średni skład izotopowy siarczków, np. odczytany z zależności między składem izotopowym siarczanów i ich stężeniami, $\delta^{34}\text{S}_{\text{gips}}$ – średni skład izotopowy gipsu, np. z literatury, skład izotopowy siarczanów w ewaporatach jest dodatni i charakteryzuje się mniejszą zmiennością niż skład izotopowy siarczków.

Dodatkowo, z uwagi na to, że badania izotopowe siarczanów ($\delta^{34}\text{S}$) były wykonywane na kierunku przepływu wód, użyto drugiego modelu hydrogeochemicznego, który uwzględniał bilans masy, czyli zmianę stężeń siarczanów na drodze przepływu wód [19]:

$$\Delta m_{T,^{34}\text{S}_T} = (m_{T,S}\delta^{34}\text{S}_T)_{\text{final}} - (m_{T,S}\delta^{34}\text{S}_T)_{\text{initial}} \quad (2)$$

gdzie: $\Delta m_{T,^{34}\text{S}_T}$ – różnica stężeń i składu izotopowego na drodze przepływu, $m_{T,S}$ – stężenie molalne siarczanów, $\delta^{34}\text{S}_T$ – średni skład izotopowy siarczanów ($\delta^{34}\text{S}$), final i initial – miejsca poboru próbek siarczanów na drodze przepływu.

Ostatecznie końcowy udział procentowy dwóch źródeł siarczanów, tj. gipsu i siarczków, można ustalić z równań (3) i (4):

$$\alpha_{gips} = \frac{\Delta m_{T,34S_T} - \delta^{34}S_{siarczki} \Delta m_{T,S}}{\delta^{34}S_{gips} - \delta^{34}S_{siarczki}} \quad (3)$$

gdzie: α_{gips} – udział procentowy gipsu w całkowitym ładunku siarczanów, $\Delta m_{T,34S_T}$ – różnica stężeń i składu izotopowego na drodze przepływu, wg równania (2), $m_{T,S}$ – różnica stężeń molalnych siarczanów, $\delta^{34}S_{siarczki}$ – średni skład izotopowy siarczków ($\delta^{34}S$), $\delta^{34}S_{gips}$ – średni skład izotopowy gipsu ($\delta^{34}S$).

$$\alpha_{siarczki} = \frac{\Delta m_{T,S} - \alpha_{gips}}{2} \quad (4)$$

gdzie: $\alpha_{siarczki}$ – udział procentowy siarczków w całkowitym ładunku siarczanów.

Tabela 1. Udział procentowy siarczków i gipsu w siarczanach rozpuszczonych w wodach podziemnych wg dwóch modeli: liniowego i uwzględniającego bilans masy

Ujęcie	Stężenie siarczanów [mg/dm ³]	Udział procentowy źródeł siarczanów – model liniowy		Udział procentowy źródeł siarczanów – model z bilansem masy	
		Siarczki	Gips	Siarczki	Gips
Łazy 1 bis	189,7	82,4-87,35	12,65-17,6	83-99,98	0,02-17
Łazy 8 bis	108,4	54,24-54,81	45,19-45,76	67,63-88,17	11,83-32,37
Niegowonice	70,07	25,92-29,24	70,76-74,08	33,9-88,6	11,4-66,1
Wisiołka	51,05	15,49-20,22	79,78-84,51	1,19-3,12	96,88-98,81

Źródło: opracowanie własne.

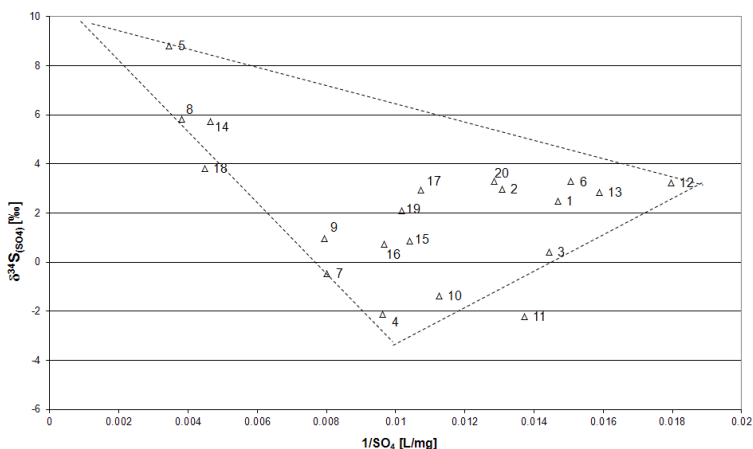
Badania izotopowe i modelowe dowiodły, że dominującym źródłem siarczanów w rejonie leja depresji (ujęcia: Łazy 1 bis i 8 bis) wywołanego eksploatacją ujęć wód oraz złożów rud cynku i ołowiu są wietrzejące siarczki. W tabeli 1 zestawiono wyniki obliczeń dla dwóch modeli w układzie jeden izotop ($\delta^{34}S$) i dwa źródła siarczanów (siarczki, gips), w drugim modelu hydrogeochemicznym, uwzględniającym bilans masy, zastosowano zmienny skład izotopowy siarczków. W tabeli zawarto też wyniki badań zawartości rozpuszczonych siarczanów w wodach. Z obliczeń oraz obserwacji wynika, iż stężenia siarczanów zwiększają się wraz z udziałem siarczków w całkowitym ładunku siarczanów – od 50 mg/dm³ przy udziale najmniejszym (od kilku do 20%) do prawie 200 mg/dm³ przy udziale ponad 80%. Wymywanie produktów utleniania siarczków w trakcie wahań zwierciadła (zmienna eksploatacja ujęć, wypełnianie się leja depresji) poważnie zagroziło jakości wód przeznaczonych do spożycia. Stężenia siarczanów w rejonie ujęcia Łazy 1 bis zbliżyły się do granicy wartości normatywnych, tj. 250 mg/dm³, a degradacja wód w sąsiednich ujęciach spowodowała wyłączenie ich z eksploatacji.

Podobna metodyka określenia genezy siarczanów w wodach podziemnych została zastosowana przez Chen i wsp. [20] – zarówno analizy hydrogeochemiczne, jak i badania izotopowe siarczanów dowiodły pochodzenia tego składnika z rozpuszczania gipsu w zwykłych wodach podziemnych oraz z utleniania pirytu w wodach kopalnianych.

Uproszczony dwuskładnikowy model mieszania użyto również dla ustalenia genezy siarczanów w wodach źródeł termalnych w Basenie Sichuan w Chinach. W tej formacji geologicznej ustalono dwa źródła geogeniczne, gips z formacji dolnego triasu o średniej wartości $\delta^{34}S$ równej 35‰ i siarczki znajdujące się w osadach górnego triasu charakteryzujące się średnią wartością $\delta^{34}S$ równą 0,32‰. Dominującym źródłem siarczanów w wodach termalnych okazał się gips [21].

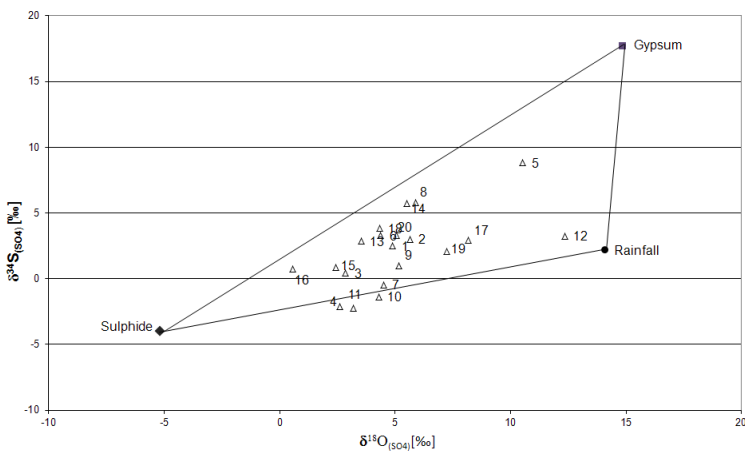
2.2. Mieszanie trójskładnikowe

Na rysunku 3 przedstawiono wykres zależności składu izotopowego siarczanów od odwrotności stężeń wskazujący na pochodzenie tego składnika z trzech źródeł, zmierzone wartości izotopu siarki ($\delta^{34}\text{S}$) oraz odwrotności stężeń tworzą nie linię prostą, jak w przypadku mieszania dwuskładnikowego, ale trójkąt. Pomiarzy dotyczą obszaru wychodni, czyli terenu bezpośredniego zasilania opadami atmosferycznymi zbiorników węglanowych. W pierwszej kolejności na podstawie warunków geologicznych i hydrogeologicznych wytypowano trzy możliwe źródła siarczanów: siarczki, ewaporaty i opad atmosferyczny (siarczany pochodzące z powierzchni).



Rysunek 3. Zależność między siarczanami rozpuszczonymi w wodach podziemnych oraz ich składem izotopowym – wskazująca na trzy źródła siarczanów, przykład ze zbiorników triasowych: Gliwice, Olkusz-Zawiercie, Chrzanów; opracowanie własne na podstawie [22]

Następnie w oparciu o ich możliwe składy izotopowe, izotop $\delta^{34}\text{S}$ oraz $\delta^{18}\text{O}$ w siarczanach (rys. 4) oraz model liniowy (rów. 5) określono procentowy udział trzech źródeł w całkowitym ładunku jonu siarczanowego (badania własne) – tabela 2.



Rysunek 4. Skład izotopowy siarczanów ($\delta^{34}\text{S}$ i $\delta^{18}\text{O}$) ze zbiorników triasowych: Gliwice, Olkusz-Zawiercie, Chrzanów wraz ze średnim składem izotopowym możliwych źródeł; opracowanie własne na podstawie [22]

Do obliczeń użyto średnich składów izotopowych dla izotopów siarki i tlenu ($\delta^{34}\text{S}$ i $\delta^{18}\text{O}$), określonych na podstawie danych literaturowych oraz układu równań dla trzech źródeł siarczanów oraz dwóch izotopów:

$$\begin{cases} \delta_T = f_A \delta_A + f_B \delta_B + f_C \delta_C \\ \lambda_T = f_A \lambda_A + f_B \lambda_B + f_C \lambda_C \\ 1 = f_A + f_B + f_C \end{cases} \quad (5)$$

gdzie: δ_T – obserwowany skład izotopowy siarki w siarczanach będący wynikiem mieszania, λ_T – obserwowany skład izotopowy tlenu w siarczanach będący wynikiem mieszania, $f_{A,B,C}$ – udział procentowy poszczególnych źródeł w siarczanach, tj. siarczków, ewaporatów i opadu, $\delta_{A,B,C}$ – skład izotopowy siarki w trzech źródłach, $\lambda_{A,B,C}$ – skład izotopowy tlenu pochodzący z trzech źródeł.

Zbiorcze wyniki modelu (tab. 2) pokazują, że dominującym źródłem siarczanów w wodach podziemnych w węglanowych zbiornikach w rejonie wychodni są siarczki, średnio ten udział wynosi blisko 50%, drugim źródłem jest gips – około 30%. Stąd można wywnioskować, że pomimo tego, iż wody występują na obszarze potencjalnie narażonym na zanieczyszczenia pochodzące z powierzchni (obszar infiltracji bezpośredniej), pochodzenie siarczanów jest związane z minerałami występującymi naturalnie w skałach.

W tabeli 2 szarym zacienieniem zaznaczono punkty, w których stężenia są bardzo wysokie, nawet ponadnormatywne (ponad 250 mg/dm^3). Jak wynika z obliczeń modelowych, stężenia te są kontrolowane przede wszystkim przez źródła geologiczne, w punktach 18, 14 i 8 są to przede wszystkim siarczki. W tych ujęciach należy zwrócić uwagę na prowadzenie eksploatacji w sposób niepowodujący nagłych i dużych wahań zwierciadła, które są przyczyną wymywania produktów wietrzenia z powiększonej strefy aeracji.

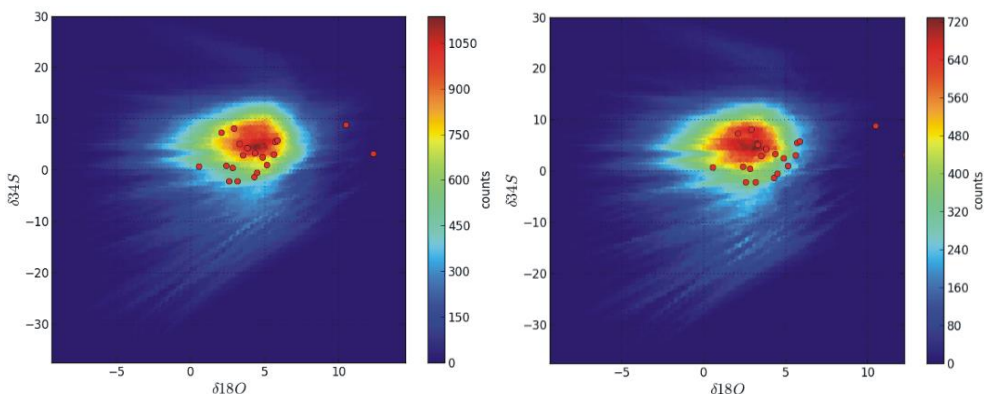
Tabela 2. Udział procentowy źródeł w siarczanach rozpuszczonych w wodach podziemnych wg modelu liniowego wraz ze zmierzonymi stężeniami

Punkt obserwacyjny (wg rys. 3)	Stężenia siarczanów [mg/dm^3]	Udział procentowy źródeł siarczanów – model z bilansem masy (pkt wg rys. 3)		
		Siarczki	Gips	Opad
1	68,1	48,80	21,52	29,68
2	76,5	44,98	23,22	31,80
3	69,3	58,99	12,21	28,80
4	103,8	69,69	0	30,31
5	289,5	20,85	51,20	27,95
6	66,4	51,72	27,85	20,43
7	124,7	50,02	2,95	47,03
8	262,7	44,46	41,30	14,24
9	125,9	46,94	10,89	42,17
10	88,9	57,37	0	42,63
11	72,92	71,15	0	28,85
12	55,67	9,55	10,78	79,67
13	70,2	55,98	26,77	17,25
14	214,8	46,39	41,42	12,19

15	96,17	61,28	16,03	22,69
16	103,3	71,02	19,13	9,84
17	93,3	31,6	17,5	50,90
18	223,4	52,03	31,4	16,58
19	98,2	36,17	13,96	49,87
20	77,9	48,02	26,44	25,53
Minimum	55,67 (12)	9,55 (12)	0 (4, 10, 11)	9,84 (16)
Maksimum	289,5 (5)	71,15 (11)	51,2 (5)	79,67 (12)
Średnia arytmetyczna	119,08	48,85	19,73	31,42
Mediana	94,73	49,41	18,32	28,83

Źródło: opracowanie własne na podstawie [22].

W określeniu pochodzenia siarczanów na terenie wychodni zbiorników węglanowych wykorzystano również metodę Monte Carlo. Na podstawie rozkładów prawdopodobieństwa dla trzech źródeł wygenerowano zestaw 500 losowych danych izotopowych. Dane te przemnożono przez możliwe kombinacje trzech źródeł, których jest 5151, zgodnie z równaniem (6).



Rysunek 5. Mapy ciepłe danych izotopowych wygenerowanych za pomocą metody MC oraz dane zmierzone, strona lewa przedstawia wyniki, które brały pod uwagę 40% udział siarczków jako źródła siarczanów, natomiast strona prawa to 50% udział siarczków; opracowanie własne

$$n. comb = \frac{\left[\left(\frac{100}{i}\right) + (s-1)\right]!}{\left(\frac{100}{i}\right)!(s-1)!} \quad (6)$$

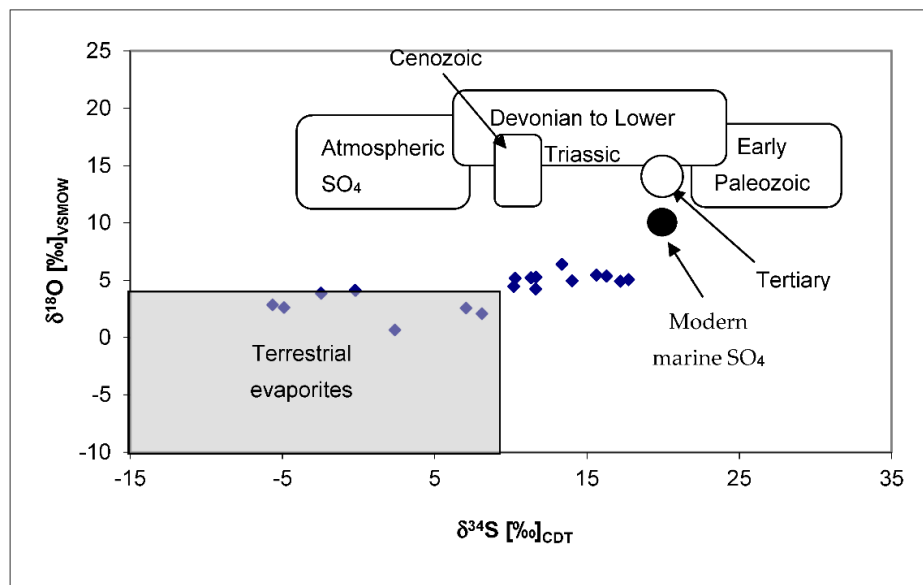
gdzie: n. comb – liczba kombinacji udziału procentowego trzech źródeł, s – ilość źródeł, i – przyrost udziału procentowego źródła, w tym przypadku równy 1.

W efekcie otrzymano ponad 2,5 mln wartości, które porównano z wartościami obserwowanymi na mapach ciepłych (rys. 5).

Zarówno prosty model liniowy, jak i metoda probabilistyczna, oparta o rozkłady prawdopodobieństwa źródeł oraz możliwe kombinacje ich udziału w całkowitym ładunku siarczanów, wskazują, że dominującym źródłem siarczanów w wodach podziemnych w strefie zasilania są siarczki.

2.3. Mieszanie wieloskładnikowe

W przypadku wielu rozproszonych źródeł siarczanów ich identyfikacja jest trudna, natomiast ustalenie udziału procentowego wręcz niemożliwe. W takiej sytuacji przybliżoną metodą ustalenia genezy siarczanów jest porównanie zakresu składu izotopowego źródeł ($\delta^{34}\text{S}$ i $\delta^{18}\text{O}$) z obserwacjami (rys. 6).



Rysunek 6. Skład izotopowy źródeł siarczanów wraz z wartościami zmierzonymi dla zbiornika wód termalnych Buda oraz zwykłych wód podziemnych, obszar zacieniony przedstawia ewaporaty lądowe, reszta to siarczany w opadach oraz ewaporaty pochodzenia morskiego o różnym wieku [23]

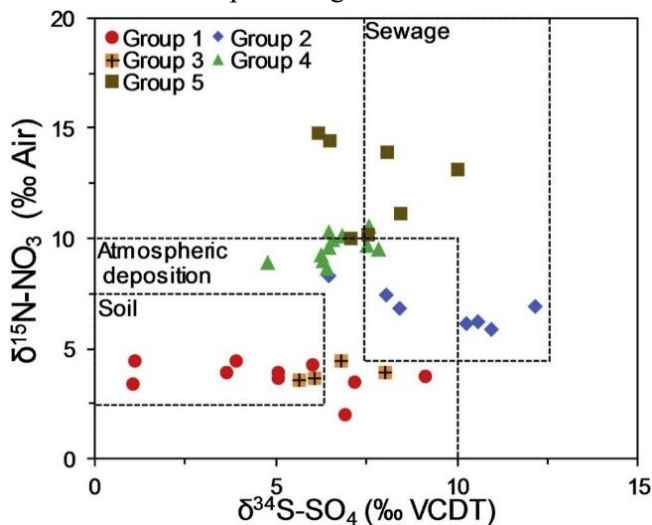
Gdy źródła wykazują podobny skład izotopowy, trudno jednoznacznie wskazać źródło siarczanów oraz wykluczyć proces mieszania tylko na podstawie diagramów. W takim przypadku powszechną techniką jest posiłkowanie się analizą warunków hydrogeologicznych (dróg krążenia) oraz dodatkowymi analizami hydrogeochemicznymi. Taką analizę przeprowadzono dla zbiornika krasowego wód termalnych Buda na Węgrzech. Wody termalne tego zbiornika charakteryzują się składem izotopowym siarczanów $\delta^{34}\text{S}$ wynoszącym od 9‰ do 18‰, przy średniej wartości równej 13,2‰. Skład ten jest zbliżony z wartościami zmierzonymi w próbkach ewaporatów permskich, dla których wartości $\delta^{34}\text{S}$ mieszczą się w zakresie od 9,51‰ do 20,93‰ (średnia 12,78‰). Pochodzenie siarczanów z ewaporatów potwierdzono analizą warunków hydrogeochemicznych i zawartości jonów głównych.

Natomiast skład izotopowy siarczanów rozpuszczonych w wodach niskotermalnych (temp. wody od 15°C do 30°C) tej formacji jest zdecydowanie ujemny, od -5,6‰ do -2,5‰. To może wskazywać, że procesem kontrolującym stężenia siarczanów w tych wodach jest wietrzenie siarczków. Reszta zmierzonych wartości, odpowiadających zwykłym wodom podziemnym, jest zapewne skutkiem mieszania się siarczanów z wielu źródeł.

Ustalenie genezy siarczanów w wodach podziemnych w zurbanizowanym obszarze doliny Monterrey także musiało uwzględnić mieszanie wieloskładnikowe [16]. Dla bada-

nego obszaru ustalono kilka źródeł siarczanów i azotanów: ścieki, substancje występujące naturalnie w gruncie i depozycja atmosferyczna (rys. 7). Źródła te charakteryzują się dużą zmiennością wartości izotopów siarki $\delta^{34}\text{S}$ i azotu $\delta^{15}\text{N}$, dodatkowym problemem jest zachodzenie na siebie tych zakresów. Biorąc także pod uwagę to, że siarczany są pochodzenia antropogenicznego, trudno było na podstawie czynników takich jak budowa geologiczna oraz skład chemiczny wód ustalić jednoznacznie ich genezę.

W tym przypadku użyto stochastycznego modelu mieszania MixSIR, napisanego w języku R i opartego na teorii Bayesa. Model ten zakładał cztery źródła siarczanów: opady i depozycja atmosferyczna, siarczany zawarte w gruncie, ścieki i nawozy oraz ewaporaty. Dla każdego ze źródeł na podstawie danych literaturowych określono skład izotopowy, obliczenia modelowe pozwoliły ustalić, że głównym źródłem siarczanów w wodach są ścieki i nawozy (40,6% \pm 18%), drugim depozycja z atmosfery (24,9% \pm 10%). Siarczany, które pochodzą z rozpuszczania ewaporatów i innych minerałów zawartych w gruncie rodzimym, stanowią odpowiednio 18,4% \pm 5,5% oraz 16,1% \pm 11,9%. Model mieszania potwierdził, że siarczany i azotany pochodzą głównie ze źródeł antropogenicznych, czyli ścieków i nawozów. Ustalenie tych źródeł pomogło wypracować zalecenia dotyczące redukcji zanieczyszczeń, czyli np. wprowadzić ograniczenia stosowania nawozów i wprowadzania ścieków wprost do gruntu.

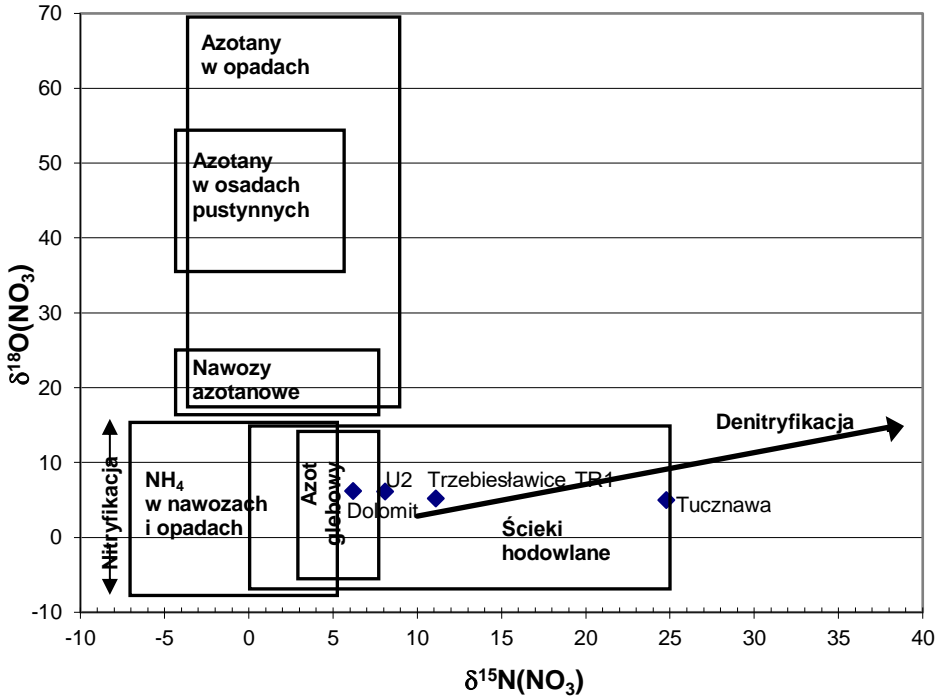


Rysunek 7. Skład izotopowy źródeł siarczanów i azotanów, podano trzy źródła: substancje rozproszone w gruncie, depozycja atmosferyczna oraz ścieki [16]

3. Określenie źródła azotanów w wodach podziemnych

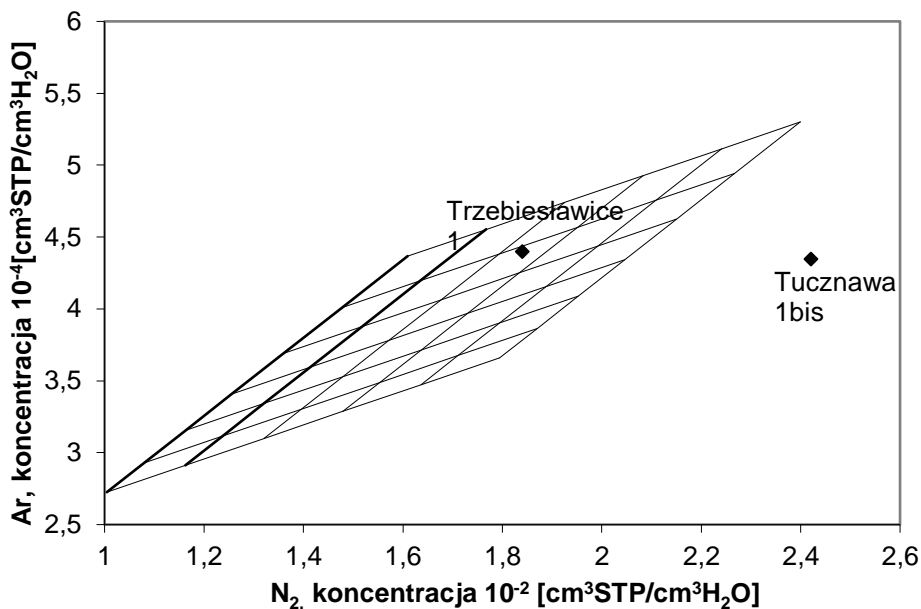
W sprawozdaniu Komisji Europejskiej (KE) w sprawie wdrożenia dyrektywy azotanowej (dane z lat 2016-2019) ostrzega się, że azotany nadal powodują zanieczyszczenie wód w Unii Europejskiej [24]. Komisja Europejska podkreśla, że nadmierna ilość azotanów w wodzie jest szkodliwa dla zdrowia ludzkiego, jak i dla ekosystemów, gdyż powoduje niedobór tlenu i eutrofizację. Azotany w wodach podziemnych pochodzą zazwyczaj z wielu rozproszonych źródeł, są to źródła naturalne, czyli azot zawarty w glebie, oraz źródła antropogeniczne, czyli nawozy naturalne i mineralne, a także ścieki. Pierwszym (najprostym) rozwiązaniem w określeniu pochodzenia azotanów rozpuszczonych w wo-

dach na podstawie składu izotopowego azotanów ($\delta^{15}\text{N}$) jest, jak w przypadku izotopów siarki, porównanie obserwacji ze składem izotopowym źródeł, np. za pomocą diagramu (rys. 8). Pomimo że jest to metoda opracowana pod koniec lat 90. XX wieku, jest nadal powszechnie stosowana [25, 26].



Rysunek 8. Skład izotopowy źródeł azotanów oraz procesy wpływające na skład izotopowy azotanów w wodach; opracowanie własne na podstawie [27]

W przypadku wartości $\delta^{15}\text{N}$ zmierzonych w azotanach wód podziemnych zbiornika Olkusz-Zawiercie (rys. 8) można z pewnością uznać, że źródłami azotanów są ścieki hodowlane i/lub azot glebowy (badania własne). W jednym przypadku – punktu w Tucznowie – z uwagi na wysokie wartości izotopu $\delta^{15}\text{N}$ zachodzi przypuszczenie, że stężenia azotanów mogą być zredukowane w proces denityfikacji (proces redukcji azotanów do azotu atmosferycznego). Ten proces wzbogaca pozostałe jony azotanowe w cięższe izotopy azotu ($\delta^{15}\text{N}$) i tlenu ($\delta^{18}\text{O}$), dodatkowym potwierdzeniem tego procesu są wyniki badań gazowych. Nadwyżka azotu pochodząca z procesu denityfikacji może być oszacowana przez pomiar stosunku N_2/Ar . Stosunek ten odzwierciedla równowagę się wód zasilających z atmosferą i zmienia się w zależności od temperatury. Wynosi od 37,3 przy temperaturze 5°C do 38,3 przy temperaturze 20°C. Z wykresu zależności rozpuszczonego w wodzie azotu do argonu (rys. 9) wynika, że dla wód z ujęcia Trzebiesławice 1 stosunek N_2/Ar wynosi około 40, jest to wartość wyższa niż należałoby się spodziewać w wodach podziemnych, w których źródłem azotu są wody opadowe. Prawdopodobnie jest to spowodowane obecnością pęcherzyków powietrza. Natomiast w wodach ujęcia Tucznowa 1 bis stosunek ten wynosi 55, co wskazuje na proces denityfikacji.



Rysunek 9. Wykres zależności rozpuszczonego Ar do N₂; opracowanie własne

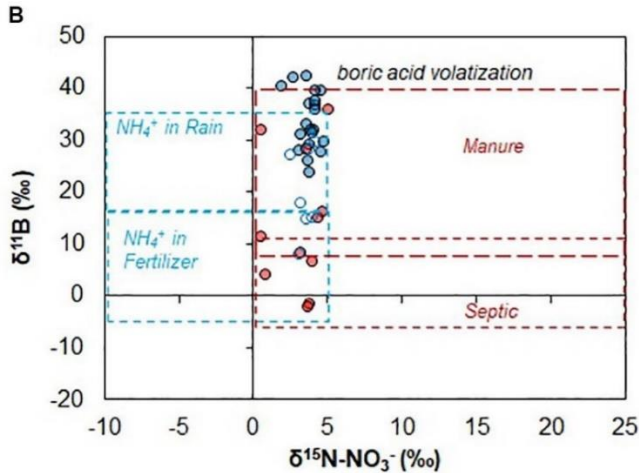
Poza identyfikacją źródeł azotanów na podstawie izotopów azotu i tlenu oraz przesłanek hydrogeochemicznych czy środowiskowych można zastosować także izotop boru ($\delta^{11}\text{B}$) [28-30]. Rysunek 10 przedstawia diagram w układzie dwóch izotopów $\delta^{11}\text{B}$ i $\delta^{15}\text{N}$, zmierzone wartości dwóch izotopów są porównane z ich źródłami, głównie pochodzenia antropogenicznego (jon amonowy w nawozach, nawóz naturalny, ścieki oraz depozycja z atmosfery).

Jak widać na rysunku 10, próbki wykazują niewielką zmienność izotopu $\delta^{15}\text{N}$, zakres od około 0 do 5‰ i bardzo duże zróżnicowanie izotopu boru $\delta^{11}\text{B}$, co pozwala na lepszą identyfikację źródeł. Oczywiście jeśli zakresy składu izotopowego zachodzą na siebie, można wykonać dodatkowe badania dotyczące składu chemicznego wód, które jednoznacznie mogą potwierdzić pochodzenie azotanów (np. obecność bakterii ze ścieków), określić drogi krążenia wód podziemnych i kierunek spływu powierzchniowego.

Podobnie jak w przypadku identyfikacji źródeł siarczanów, w zagadnieniu genezy azotanów rozpuszczonych w wodach możemy wykonać analizę jakościową, która pozwala wyłącznie na identyfikację źródeł oraz analizę ilościową pozwalającą ustalić, ile azotanów pochodzi z konkretnego źródła. Do analizy ilościowej służą modele matematyczne, dla azotanów i trzech źródeł można przekształcić równanie (5) w sposób następujący:

$$\begin{cases} \delta^{15}\text{N} = f_A \delta^{15}\text{N}_A + f_B \delta^{15}\text{N}_B + f_C \delta^{15}\text{N}_C \\ \delta^{18}\text{O} = f_A \delta^{18}\text{O}_A + f_B \delta^{18}\text{O}_B + f_C \delta^{18}\text{O}_C \\ 1 = f_A + f_B + f_C \end{cases} \quad (7)$$

gdzie: $\delta^{15}\text{N}$ – obserwowany skład izotopowy azotu w azotanach będący wynikiem mieszania, $\delta^{18}\text{O}$ – obserwowany skład izotopowy tlenu w azotanach będący wynikiem mieszania, f_A, B, C – udział procentowy poszczególnych źródeł w azotanach, np. azotu glebowego, nawozów i azotu z depozycji atmosferycznej, $\delta^{15}\text{N}_A, B, C$ – skład izotopowy azotu w trzech źródłach, $\delta^{18}\text{O}_A, B, C$ – skład izotopowy tlenu pochodzący z trzech źródeł.



Rysunek 10. Zastosowanie dwóch izotopów: azotu i boru do identyfikacji źródeł zanieczyszczeń w wodach [30]

Do układu równań można, podobnie jak dla siarki, dodać element odpowiadający za stężenia, czyli określić transfer masy od każdego ze składników [31].

Deutsch i wsp. [32], używając modelu mieszania (równanie 7), analizowali udział wód nawadniających, wód podziemnych oraz opadu atmosferycznego jako źródeł azotanów w wodach rzeki Warnow w Niemczech; udział ten wynosił odpowiednio 86%, 11% i 4%. Model mieszania został zweryfikowany innym modelem – MONERIS, który został stworzony do określenia ładunku substancji pochodzących z nawożenia w rzekach (ang. *modelling nutrient emissions in river*). Obydwa modele pokazały bardzo zbieżne wyniki.

Natomiast Voss i wsp. [33] określili udział trzech źródeł azotanów, tj. ścieków, depozycji atmosferycznej oraz wymywania naturalnych składników mineralnych z gruntu dla 12 dopływów do Morza Bałtyckiego.

Prosty model liniowy może być stosowany dla przypadków, gdy zanieczyszczenie pochodzi od maksymalnie trzech źródeł lub gdy sensowne jest zagregowanie takich źródeł do maksymalnie trzech, np. jeśli ścieki i nawozy organiczne mają podobny skład izotopowy i mogą być potraktowane jako zanieczyszczenie obszarowe. Dodatkowo używanie równań analitycznych takich jak modele liniowe (równania: 1,5,7) oraz model hydrogeochemiczny (równania 2-4) jest pracochłonne i skomplikowane. Dlatego też do określenia genezy azotanów używa się także gotowych modeli matematycznych takich jak IsoSource [34].

IsoSource jest modelem dopuszczającym mieszanie się wielu składników ($n + 1$), tolerancja przyrostu procentowego udziału źródeł wynosi od 1% do 2%, a błąd bilansu masy wynosi od 0,01% do 0,05%. IsoSource określa udział poszczególnych źródeł metodą iteracyjną. Jeśli różnica pomiędzy średnią ważoną udziału poszczególnych źródeł i wartością zmierzoną jest mniejsza od 0,01‰, rozwiązanie jest uznawane za prawdopodobne. IsoSource był stosowany do badań atmosfery, łańcuchów pokarmowych oraz do ustalenia genezy azotanów w wodach powierzchniowych, jest modelem prostym, intuicyjnym i posiada interfejs graficzny, dlatego nie wymaga wiedzy z zakresu programowania.

Lu i wsp. [35] użyli modelu IsoSource do określenia pochodzenia azotanów w wodach powierzchniowych formacji krasowej Guilin. Autorzy artykułu ustalili trzy potencjalne

źródła: nawozy, ścieki oraz azot organiczny zawarty w gruncie. Obliczenia modelowe dały szerokie zakresy obecności źródeł w rozpuszczonych azotanach. Udział dla nawozów wynosi od 23% do 78%, ścieków od 6% do 58%, a dla azotu rozproszonego w gruncie od 6% do 38%. Sheng i wsp. [36] również zastosowali model IsoSouce. Przy jego pomocy analizowali pochodzenia azotanów u ujścia Underground River, do tego celu używając danych dla dwóch izotopów: $\delta^{15}\text{N}$ oraz $\delta^{18}\text{O}$, a także czterech źródeł: nawozów (46,4%), organicznego azotu w gruncie (32,6%), jonu amonowego (18,6%) oraz depozycji z atmosfery (2,4%).

Innym modelem matematycznym, który został stworzony do określenia genezy składników na podstawie ich składu izotopowego, jest model mieszania SIAR (ang. *stable isotope analysis in R*) [37]. Podstawą naukową modelu SIAR jest teoria Bayesa. Model SIAR wymaga podania danych *a priori* oraz wykorzystuje rozkład Dirichleta. SIAR, podobnie jak IsoSource, pomaga ustalić prawdopodobny udział źródeł w całkowitym ładunku danego składnika, a następnie rozkład prawdopodobieństwa dla tego udziału. Obliczenia oparte są na następującym równaniu:

$$X_{ij} = \sum_{k=1}^K P_k (S_{jk} + c_{jk}) + \varepsilon_{ij} \quad (8)$$

Gdzie: X_{ij} – obserwowany skład izotopowy, izotopu j w mieszaninie i źródeł, P_k – proporcja źródła k , S_{jk} – wartość źródła k , izotopu j od źródła i , które charakteryzuje się normalnym rozkładem o średniej μ i wariancji ω [$N(\mu_{jk}, \omega_{2jk})$], c_{jk} – współczynnik frakcjonowania izotopowego dla izotopu j oraz źródła i , który charakteryzuje się normalnym rozkładem o średniej λ i wariancji τ [$N(\lambda_{jk}, \tau_{2jk})$], ε – błąd rezydualny.

SIAR został użyty do oszacowania udziału 5 potencjalnych źródeł azotanów, tj.: depozycji atmosferycznej, nawozów sztucznych, nawozów sztucznych zawierających jon amonowy, azotu organicznego z gruntu, ścieków i nawozu naturalnego [38]. Natomiast Zhang i wsp. [39], używając modelu SIAR, dowiedli, że zanieczyszczenia azotanami wód Żółtej Rzeki pochodzi głównie z nawożenia pól nawozami zawierającymi azot (udział: od 61% do 69%).

W sekcji 2 omówiono pochodzenie źródła siarczanów w wodach podziemnych w rejonie doliny Monterrey w Meksyku. W przykładzie tym rozpatrywano układ dwóch izotopów i kilku źródeł. Jednym z izotopów był $\delta^{15}\text{N}$ (rys. 6), dla którego wytypowano 3 możliwe źródła, tj.: azot organiczny zawarty w gruncie, ścieki i nawozy oraz depozycję z atmosfery. Udział tych źródeł w ładunku azotanów był następujący: 60,6% \pm 12,4%, 37,8% \pm 12,5% oraz 1,6% \pm 1,2%. Wyniki zostały obliczone modelem MixSIAR [40], który również opiera się na teorii Bayesa.

4. Podsumowanie i wnioski

Badania izotopowe na świecie rozpoczęły się w pierwszych dekadach XX wieku, wraz z odkryciem trytu (^3H), radioaktywnego węgla (^{14}C) oraz dynamicznego rozwoju metod spektrometrycznych, które umożliwiły pomiary stosunków trwałych izotopów [41]. W Polsce rozwój badań znacznikowych rozpoczął się w latach 70. XX wieku, badania izotopowe znalazły zastosowanie w określeniu dróg krążenia wód, ich wieku oraz procesów hydrogeochemicznych. Pierwsze prace dotyczyły przede wszystkim izotopów trwałych tlenu $\delta^{18}\text{O}$, deuteru ^2H oraz trytu ^3H .

Pewne prawidłowości i metody analizy badań izotopowych opracowane kilka dekad temu są stosowane do dzisiaj, tak jest np. ze światową linią opadów (ang. *meteoric water line*) [42, 43], określeniem wieku wód metodą trytową [44, 45]. Okazuje się, że nawet

wyniki badań izotopowych wykonane kilkadziesiąt lat temu można powtórnie reinterpretować przy użyciu nowych modeli matematycznych [46].

Od lat 90. w analizie wyników badań izotopowych stosowane są diagramy zestawiające skład izotopowy źródeł składników oraz zmierzone wartości izotopów, jak np. diagram opracowany przez Kendall [27] dla źródeł azotu, który jest powszechnie stosowany do dzisiaj [47, 48].

Oczywiście nie można powiedzieć, że rozwój wiedzy na temat badań izotopowych i ich zastosowania stanął w miejscu, wręcz przeciwnie – wg bazy danych naukowych Google Scholar liczba artykułów przeglądowych dotyczących identyfikacji źródeł wód i składników w nich rozpuszczonych na podstawie badań izotopowych jest wysoka i w latach 2021 oraz 2022 wynosiła odpowiednio 5760 i 5780. Rozwój ten jest oparty na coraz lepszych metodach analitycznych, które spowodowały, że badania izotopowe są tańsze i bardziej dostępne. Skokiem technologicznym było np. wprowadzenie na rynek przenośnego spektrometru mas, który wykorzystuje spektroskopię strat we wnącej optycznej (SSWO). Przełomowe było też wdrażanie modeli matematycznych i rozwój nowych języków programowania, takich jak R oraz Python. Dzięki nim analizy środowiskowe zostały wsparte twardymi dowodami z obliczeń modelowych.

Znaczniki izotopowe mają szerokie zastosowanie w monitoringu środowiska, monitoringu emisji, studiowaniu ekosystemów, śledzeniu procesów geochemicznych i wywołanych antropogenicznie, sprawdzaniu oryginalności produktów.

W niniejszej pracy skupiono się na dwóch izotopach: siarki $\delta^{34}\text{S}$ oraz azotu $\delta^{15}\text{N}$. W pierwszym przypadku pokazano, jak można interpretować wyniki badań izotopowych siarczanów za pomocą prostego dwuskładnikowego modelu liniowego oraz modelu hydrogeochemicznego uwzględniającego bilans masy. Następnie opisano bardziej skomplikowany model dla mieszania się siarczanów pochodzących z trzech źródeł i układu dwóch izotopów: $\delta^{34}\text{S}$ i $\delta^{18}\text{O}$. Dodatkowo dla przypadku trzech źródeł siarczanów wykonano obliczenia statystyczne przy pomocy metody Monte Carlo.

Udowodniono, że izotopy siarki są dobrymi znacznikami procesów hydrogeochemicznych, zwłaszcza jeśli badania te poprzedza szczegółowa analiza warunków środowiskowych, takich jak określenie warunków występowania i krążenia wód. Izotopy siarki ($\delta^{34}\text{S}$) mogą wskazywać procesy rozpuszczania minerałów zawierających siarkę, ale również wskazać na procesy wywołane działalnością człowieka, np. zanieczyszczenia pochodzące ze ścieków, nawozów. W niniejszej pracy przedstawiono szczególny przypadek procesu naturalnego indukowanego przez działalność człowieka, tj. wymywania produktów wietrzenia siarczków z leja depresji. Jest to proces degradujący jakość wód podziemnych (AMD – kwaśny drenaż wód) i często powodujący niezdatność wód do ich spożycia. Informacja o tym, że siarczany w wodach pochodzą z utleniania siarczków zawartych w skale/gruncie może prowadzić do bardziej racjonalnej gospodarki wodami i zwracania szczególnej uwagi na wahania zwierciadła w trakcie eksploatacji wód.

Zanieczyszczenie wód azotanami jest problemem globalnym, jest to składnik, którego geneza w wodach jest zwykle złożona, bo może pochodzić z wielu rozproszonych źródeł o zbliżonym składzie izotopowym. W niniejszej pracy przedstawiono klasyczne podejście do analizy składu izotopowego azotanów ($\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{18}\text{O}$), czyli porównanie zmierzonych wartości z zakresem zmierzonym w źródłach, na diagramie zaproponowanym przez Kendall [27]. Oprócz tego zaprezentowano najnowsze trendy w identyfikacji źródeł azotanów wraz z ich ilościową analizą, czyli podaniem przybliżonego zakresu

udziału procentowego każdego ze źródeł w całkowitym ładunku azotanów. Są to modele statystyczne, takie jak IsoSouce, SIAR oraz MixSIAR. Modele SIAR oraz MixSIAR są to modele stochastyczne, zbudowane w języku R w oparciu o teorię Bayesa, która zyskuje coraz większą popularność w badaniach geośrodowiskowych. Badania modelowe mają nie tylko charakter demonstracyjny, ale również są niezwykle praktyczne. Informacja na temat pochodzenia azotanów z nawożenia pól czy ścieków może pomóc w opracowaniu czynności naprawczych oraz określić lepsze procedury korzystania z wód oraz zagospodarowania terenu w rejonach bezpośredniego zasilania ujęć wód bądź terenach źródłkowych.

Podziękowania

Chciałabym podziękować swoim profesorom: prof. dr. hab. A. Rózkowskiemu, prof. dr. hab. S. Hałasowi, prof. dr. hab. P. Małoszewskiemu za wprowadzenie w świat hydrogeologii izotopowej.

Literatura

1. Letchinger M., *Pollution and water quality*, Project Oceanography, Neighbourhood Water Quality Fall, 2000, s. 13-27.
2. Pink D.H., *Investing in tomorrow's liquid gold*, World Journal of Analytical Chemistry, 2, 2006, s. 42-46.
3. UNESCO, *The United Nations World Water Development Report 2021: Valuing Water*, United Nations, France 2021, <https://www.unwater.org/publications/un-world-water-development-report-2021> [data dostępu: 1.08.2023].
4. Xu X., Yang H., Li C., *Theoretical model and actual characteristics of air pollution affecting health cost: A review*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(6), 2022, 3532.
5. Macioszczyk A., Dobrzyński D., *Hydrogeochemia strefy aktywnej wymiany wód podziemnych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
6. Hogan C.M., *Water pollution*, [w:] Kroschwitz J., *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, John Wiley & Sons, Inc., USA, Washington 2010, s. 1-29.
7. Guo Z., Brusseau M.L., *The impact of well-field configuration and permeability heterogeneity on contaminant mass removal and plume persistence*, Journal of Hazardous Materials, 333, 2017, s. 109-115.
8. Prakash O., Datta B., *Optimal monitoring network design for efficient identification of unknown groundwater pollution sources*, International Journal of GEOMATE, 23, 2014, s. 2031-2049.
9. Foddis M.L., Ackerer P., Montisci A., Uras G., *ANN-based approach for the estimation of aquifer pollutant source behaviour*, Water Science & Technology: Water Supply, 15, 2015, s. 1285-1294.
10. Higuchi T., Igarashi G., Tohjima Y., Wakita H., *Time series analysis of groundwater radon using stochastic differential equations*, Journal of Physics of the Earth, 43, 2009, s. 117-130.
11. Majdalani S., Ackerer P., *Identification of groundwater parameters using an adaptive multiscale method*, Groundwater, 49, 2011, s. 548-559.
12. Li L., Zhou H., Franssen H.J.H., Gómezhernández J.J., *Groundwater flow inverse modeling in non-multigaussian media: Performance assessment of the normal-score ensemble Kalman filter*, Hydrology and Earth System Sciences, 8, 2012, s. 6749-6788.
13. Li Z., Mao X., *Global multiquadric collocation method for groundwater contaminant source identification*, Environmental Modelling and Software, 26, 2011, s. 1611-1621.
14. Hosseini A.H., Deutsch C.V., Mendoza C.A., Biggar K.W., *Inverse modeling for characterization of uncertainty in transport parameters under uncertainty of source geometry in heterogeneous aquifers*, Journal of Hydrology, 405, 2011, s. 402-416.

15. Wu J., Song C., Dubinsky E.A., Stewart J.R., *Tracking major sources of water contamination using machine learning*, *Frontiers in Microbiology*, 11, 2021, s. 616692.
16. Torres-Martínez J.A., Mora A., Knappett P.S., Ornelas-Soto N., Mahlknecht J., *Tracking nitrate and sulfate sources in groundwater of an urbanized valley using a multi-tracer approach combined with a Bayesian isotope mixing model*, *Water Research*, 182, 2020, s. 115962.
17. Mörth C.M., Laudon H., Mellqvist E., Torssander P., Giesler R., *Sources of stream water sulfate during the spring snowmelt in boreal streams: evidence from $\delta^{34}\text{S}$ isotope measurements*, *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 113(G1), 2008.
18. Samborska K., Halas S., *^{34}S and ^{18}O in dissolved sulfate as tracers of hydrogeochemical evolution of the Triassic carbonate aquifer exposed to intense groundwater exploitation (Olkusz–Zawiercie region, southern Poland)*, *Applied Geochemistry*, 25(9), 2010, s. 1397-1414.
19. Aly I., Plummer L.N., Aggarwal P., *NETPATH-WIN: An interactive user version of the mass-balance model*, *NETPATH, Groundwater*, 2010, s. 1-7.
20. Chen C., Li B., Zhu M., Wang X., Liu G., Deng Y., *Multi-isotope identification of key hydrogeochemical processes and pollution pathways of groundwater in abandoned mining areas in southwest China*, *Environmental Science and Pollution Research*, 30(32), 2023, s. 78198-78215.
21. Xiao Q., Jiang Y., Shen L., Yuan D., *Origin of calcium sulfate-type water in the Triassic carbonate thermal water system in Chongqing, China: A chemical and isotopic reconnaissance*, *Applied Geochemistry*, 89, 2018, s. 49-58.
22. Samborska K., Halas S., Bottrell S.H., *Sources and impact of sulphate on groundwaters of Triassic carbonate aquifers, Upper Silesia, Poland*, *Journal of Hydrology*, 486, 2013, s. 136-150.
23. Fórizs I., Szabó V.R., Deák J., Halas S., Pelc A., Trembaczowski A., Lorberer Á., *The origin of dissolved sulphate in the thermal waters of Budapest inferred from stable S and O isotopes*, *Geosciences*, 9(10), 2019, s. 433.
24. European Commission, Report from the Commission on the Council and The European Parliament on the implementation of Council Directive 91/676/EEC concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources based on Member State reports for the period 2016–2019, Brussels 2021.
25. Kou X., Ding J., Li Y., Li Q., Mao L., Xu C., Zheng Z., Zhuang S., *Tracing nitrate sources in the groundwater of an intensive agricultural region*, *Agricultural Water Management*, 250, 2021, 106826.
26. Matiatos I., Lazogiannis K., Papadopoulos A., Skoulikidis N.T., Boeckx P., Dimitriou E., *Stable isotopes reveal organic nitrogen pollution and cycling from point and non-point sources in a heavily cultivated (agricultural) Mediterranean river basin*. *Science of the Total Environment*, 901(1), 2023, 166455.
27. Kendall C., *Tracing nitrogen sources and cycling in catchments*, [w:] Kendall C., McDonnell J.J. (red.), *Isotope tracers in catchment hydrology*, Elsevier, New York 1998, s. 519-576.
28. Widory D., Kloppmann W., Chery L., Bonnin J., Rochdi H., Guinamant J.L., *Nitrate in groundwater: an isotopic multi-tracer approach*, *Journal of Contaminant Hydrology*, 72(1-4), 2004, s. 165-188.
29. Widory D., Petelet-Giraud E., Brenot A., Bronders J., Tirez K., Boeckx P., *Improving the management of nitrate pollution in water by the use of isotope monitoring: the $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{11}\text{B}$ triptych*, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 49(1), 2013, s. 29-47.
30. Tamborski J., Brown C., Bokuniewicz H., Cochran J.K., Rasbury E.T., *Investigating boron isotopes for identifying nitrogen sources supplied by submarine groundwater discharge to coastal waters*, *Frontiers in Environmental Science*, 8, 2020, s. 126.

31. Phillips D.L., Koch P.L., *Incorporating concentration dependence in stable isotope mixing models*, *Oecologia*, 130, 2002, s. 114-125.
32. Deutsch B., Mewes M., Liskow I., Voss M., *Quantification of diffuse nitrate inputs into a small river system using stable isotopes of oxygen and nitrogen in nitrate*, *Organic Geochemistry*, 37, 2006, s. 1333-1342.
33. Voss M., Deutsch B., Elmgren R., Humborg C., Kuuppo P., Pastuszak M., Rolff C., Schulte U., *Source identification of nitrate by means of isotopic tracers in the Baltic Sea catchments*, *Biogeosciences*, 3, 2006, s. 663-676.
34. Phillips D.L., Gregg, J.W., *Source partitioning using stable isotopes: coping with too many sources*, *Oecologia*, 136, 2003, s. 261-269.
35. Lu L., Li W.L., Pei J.G., Wang Z., *A quantitative study of the sources of nitrate of Zhaidi underground river in Guilin based on IsoSource*. *Acta Geoscientica Sinica*, 35, 2014, s. 248-254.
36. Sheng T., Yang P.H., Xie G.W., Hong A.H., Cao C., Xie S.Y., Shi W.Y., *Nitrate-nitrogen pollution sources of and underground river in Karst agricultural area using 15N and 18O isotope technique*, *Environmental Science Proceedings*, 39, 2018, s. 4547-4555.
37. Parnell A.C., Inger R., Bearhop S., Jackson A.L., *Source partitioning using stable isotopes: Coping with too much variation*, *PLoS One*, 5, 2010, s. 9672.
38. Xue D., De Baets B., Van Cleemput O., Hennessy C., Berglund M., Boeckx P., *Classification of nitrate polluting activities through clustering of isotope mixing model outputs*, *Journal of Environmental Quality*, 42, 2013, s. 1486-1497.
39. Zhang Y., Shi P., Li F., Wei A., Song J., Ma J., *Quantification of nitrate sources and fates in rivers in an irrigated agricultural area using environmental isotopes and a Bayesian isotope mixing model*, *Chemosphere*, 208, 2018, s. 493-501.
40. Stock B., Jackson A., Ward E., Parnell A., Phillips D., Semmens B., *Analyzing mixing systems using a new generation of Bayesian tracer mixing models*, *PeerJ Physical Chemistry*, 6, 2018, s. 5096.
41. Zuber A., Róžański K., Ciężkowski W., *Metody znacznikowe w badaniach hydrogeologicznych. Poradnik metodyczny*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2007.
42. Fritz M., Wetterich S., McAlister J., Meyer H., *A new local meteoric water line for Inuvik (NT, Canada)*, *Earth System Science Data*, 14(1), 2022, s. 57-63.
43. Hatvani I.G., Smati A.E., Erdélyi D., Szatmári G., Vreča P., Kern Z., *Modeling the spatial distribution of the meteoric water line of modern precipitation across the broader Mediterranean region*, *Journal of Hydrology*, 617, 2023, 128925.
44. Telloli C., Rizzo A., Salvi S., Ubaldini A., *Characterization and analysis of groundwater recharge through tritium measurements*, *Adv. Geosci.*, 57, 2022, s. 21-36.
45. Di Renzo D., Rizzo A., Telloli C., Salvi S., Marrocchino E., Nieto Yábar D., Vaccaro C., *Geochemical and isotopic tracers to define the aquifer's vulnerability: the case study of the alluvial multi-aquifer system of the Friulian plain*, *Environmental Monitoring and Assessment*, 195(6), 2023, 781.
46. Samborska K., Rózkowski A., Małoszewski P., *Estimation of groundwater residence time using environmental radioisotopes (14C, T) in carbonate aquifers, southern Poland*, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, 49(1), 2013, s. 73-97.
47. Delesantro J.M., Duncan J.M., Riveros-Iregui D., Błaszczak J.R., Bernhardt E.S., Urban D.L., Band L.E., *The nonpoint sources and transport of baseflow nitrogen loading across a developed rural-urban gradient*, *Water Resources Research*, 58(7), 2022, e2021WR031533.
48. Biddau R., Dore E., Da Pelo S., Lorrain M., Botti P., Testa M., Cidu R., *Geochemistry, stable isotopes and statistic tools to estimate threshold and source of nitrate in groundwater (Sardinia, Italy)*, *Water Research*, 232, 2023, 119663.

Identyfikacja źródeł zanieczyszczeń w wodach na podstawie badań izotopowych azotu i siarki oraz modelowania matematycznego

Streszczenie

Zanieczyszczenie wód powierzchniowych i podziemnych jest problemem globalnym, wpływającym na uszczuplenie zasobów wód pitnych oraz stwarzającym zagrożenie utraty zdrowia i życia. Znaczniki izotopowe są coraz powszechniejsze w badaniach dotyczących śledzenia zanieczyszczeń w wodach powierzchniowych i podziemnych. Wynika to z większego dostępu do tych badań, wprowadzania nowych technik badawczych oraz opracowania nowych modeli matematycznych. Szczegółowa analiza warunków hydrogeologicznych, środowiskowych oraz wyniki badań izotopowych pozwalają na określenie procesów geogenicznych, czyli zachodzących naturalnie w wodach, procesów wywołanych przez człowieka i procesów hybrydowych, czyli indukowanych przez człowieka, ale zachodzących naturalnie w środowisku. Dodatkowo analiza matematyczna wyników badań pozwala na precyzyjne określenie udziału poszczególnych źródeł w całkowitym ładunku. Odpowiedzi na kluczowe zagadnienia dotyczące tego, skąd pochodzą zanieczyszczenia oraz ile ich jest pozwalają na podejmowanie czynności naprawczych, remediacyjnych oraz wypracowanie nowych zasad użytkowania terenu czy korzystania z wód. Niniejsza praca dotyczy w sposób szczegółowy tylko dwóch składników, czyli siarczanów oraz azotanów. Są to składniki naturalnie występujące w wodach, jednak ich duże ilości (tj. 50 mg/l dla azotanów oraz 250 mg/l dla siarczanów) powodują, że woda nie może być traktowana jako woda zdalna do spożycia. W pracy prześlędono metody określenia genezy tych składników na podstawie prostych modeli liniowych, modelowania hydrogeochemicznego oraz bardziej skomplikowanych modeli statystycznych, wykorzystujących wyniki badań izotopowych. W opracowaniu sięgnięto też do przybliżonych metod określenia pochodzenia składników, takich jak diagramy zestawiające skład izotopowy źródeł i próbek. Autorka wyraża nadzieję, że tak przedstawione metody stosowania badań izotopowych oraz ich matematycznej interpretacji przybliżą to zagadnienie szerszemu gronu naukowców.

Słowa kluczowe: modelowanie matematyczne, znaczniki izotopowe, wody podziemne, wody powierzchniowe, hydrogeochemia

Identification of water pollution sources based on nitrogen and sulphur isotopes and mathematical modelling

Abstract

Contamination of surface and groundwater is a global problem that affects the depletion of drinking water resources and poses a threat to health and life. Isotope tracers are increasingly being used in research to detect contaminants in surface and groundwater. This is due to greater access to these studies, the introduction of new analytical techniques and the development of new mathematical models. A detailed analysis of hydrogeological and environmental conditions, together with the results of isotopic studies, makes it possible to identify geogenic processes, i.e. those that occur naturally in water bodies, anthropogenic processes and hybrid processes, i.e. those that are triggered by human activity but occur naturally in the environment. In addition, mathematical analysis of the test results allows the contribution of individual sources to the total load to be accurately determined. Answers to the key questions of where the pollution comes from and how much is coming from particular sources are needed to take the right clean-up action and to develop new rules for land or water use. This work looks in detail at just two constituents, sulphates and nitrates. These are components that occur naturally in water, but their high levels (i.e. 50 mg/l for nitrates and 250 mg/l for sulphates) mean that the water cannot be treated as drinking water. The paper examines methods for determining the origin of sulphates and nitrates based on simple linear models, hydrogeochemical modelling and more complex statistical models using the results of isotopic studies. The study also uses approximate methods for determining the origin of constituents, such as plots showing the isotopic composition of sources and samples. The author hopes that the methods of using isotopic studies and their mathematical interpretation presented in this way will bring the subject closer to a wider group of scientists.

Keywords: mathematical modelling, isotope tracers, groundwater, surface water, hydrogeochemistry

Czy *Photobacterium* spp. izolowane z mięsa stanowią zagrożenie dla zdrowia?

1. Wprowadzenie

Badania bakterii zdolnych do luminescencji, w tym przedstawicieli rodzaju *Photobacterium*, prowadzone są od ponad 120 lat. Niedawny szybki wzrost liczby znanych gatunków w tym rodzaju jest odzwierciedleniem z jednej strony dużego zainteresowania fotobakteriami, a z drugiej strony – rozwojem metod identyfikacji i charakterystyki tych bakterii [1].

Photobacterium spp. to pospolite bakterie psychrofilne środowisk morskich. Występują w postaci wolno żyjącej w wodach i osadach morskich, ale także w interakcji z morskimi zwierzętami. Bioluminescencyjne szczepy żyją np. w symbiozie ze zwierzętami głębinowymi w ich narządach świetlnych (fotoforach) [2, 3]. Fotobakterie znane są również w siedliskach morskich jako saprotrofy [1]. W tym kontekście niektóre gatunki, jak *P. phoreum* i *P. iliopiscarium*, stanowią poważny problem w przemyśle spożywczym. Powodują one przyspieszone psucie się schłodzonych ryb i owoców morza w związku z produkcją m.in. amin biogennych [4-7]. Takie skażenie produktów spożywczych jest poważnym problemem zdrowia publicznego ze względu na skutki fizjologiczne i toksykologiczne [8].

Niektóre fotobakterie, np. *P. damsela*, uznane są za patogeny zarówno dla gatunków ryb dzikich, np. rekinów, płaszczyk, jak i dla ryb gospodarczych, np. pstrąg tęczy, węgorz, dorada. Mogą powodować posocnicę krwotoczną i zakażenia ran [9-11]. Znane są także liczne przypadki izolowania *P. damsela* od gadów, np. żółwi, ale też mięczaków, skorupiaków, a nawet delfinów i wielorybów [12-15]. Wykazano, że podgatunek *P. damsela* subsp. *damsela* jest patogenny także dla ludzi i może powodować zakażenia ran, posocnicę oraz inne infekcje, np. układu moczowego [16-18]. Przypadki śmiertelne dotyczą głównie osób starszych, natomiast osoby młode mają dużo większe szanse na wyzdrowienie [19].

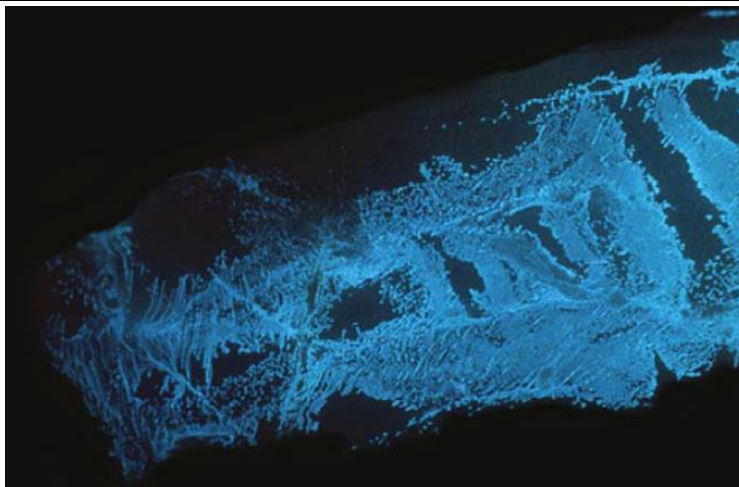
Badania prowadzone w ostatniej dekadzie wskazują, że fotobakterie mogą być izolowane nie tylko z ryb i owoców morza, ale także z innych typów mięsa, tj. wieprzowego, drobiowego i wołowego [20-24]. Podobnie jak w przypadku ryb, powodują przyspieszone psucie się tych produktów (fot. 1).

Skażenie mięsnych produktów żywnościowych bakteriami z rodzaju *Photobacterium* może stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka, stąd w ostatnich latach zauważyć można wzrost zainteresowania tym problemem oraz próby wyjaśnienia, w jaki sposób dochodzi do skażenia żywności bakteriami morskimi, a także jakie skutki dla zdrowia może mieć występowanie tego typu zanieczyszczenia mikrobiologicznego [23].

Celem pracy jest omówienie rodzaju *Photobacterium*, ze szczególnym uwzględnieniem gatunków chorobotwórczych dla ludzi.

¹ s.andrzejczak-grzadko@wnb.uz.zgora.pl, Katedra Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.

² 104874@stud.uz.zgora.pl, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.uz.zgora.pl.



Fotografia 1. Wzrost fotobakterii na kawałku ryby [25]

2. Charakterystyka rodzaju *Photobacterium*

Rodzaj *Photobacterium* należy do rodziny *Vibrionaceae*. Obecnie wyróżniamy ok. 50 gatunków fotobakterii, m.in. *P. angustum*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *P. fischeri*, *P. histaminum*, *P. iliopiscarium*, *P. indicum*, *P. leiognathi*, jednak ze względu na intensywne badania nad tym rodzajem bakterii lista ta stale ulega zmianom [26]. Historycznie istniało pewne nieporozumienie w związku z rodzajami *Vibrio* i *Photobacterium*, jeśli chodzi o identyfikację taksonomiczną. Analizy filogenetyczne sekwencji genu 16S rRNA umieszczają obecnie fotobakterie w klasie *Gamma-proteobacteria* i rzędzie *Vibrionales* [27].

Photobacterium spp. to bakterie Gram-ujemne, fakultatywnie beztlenowe i ruchliwe. Są powszechnie kojarzone ze zwierzętami morskimi. Przedstawiciele tego rodzaju są szeroko rozpowszechnieni w środowiskach morskich i zwykle żyją w przybrzeżnych, otwartych oceanach i głębinach morskich [1]. Charakterystykę rodzaju zawarto w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka rodzaju *Photobacterium*

	Test	Opis
Morfologia kolonii	rozmiar	średni
	kształt	okrągły, wypukły
	kolor	kremowy
Morfologia komórki	kształt	cylicydryczny
Charakterystyka fizjologiczna	ruch	+
	wzrost przy 6,5% NaCl	+
Charakterystyka biochemiczna	barwienie metodą Grama	-
	produkcja oksydazy	+
	produkcja katalazy	+
	reakcja Vogesa-Proskauera	-

	wytwarzanie indolu	+
	produkcja H ₂ S	-
	produkcja ureazy	V
	produkcja reduktazy azotanowej	+
	produkcja β-galaktozydazy	-
Hydroliza	żelatyny	+
	eskuliny	V
	kazeiny	V
Produkcja kwasu z	glicerolu	+
	galaktozy	+
	D-glukozy	+
	D-fruktozy	V
	D-mannozy	-
	mannitolu	V
	maltozy	V
	glikogenu	V

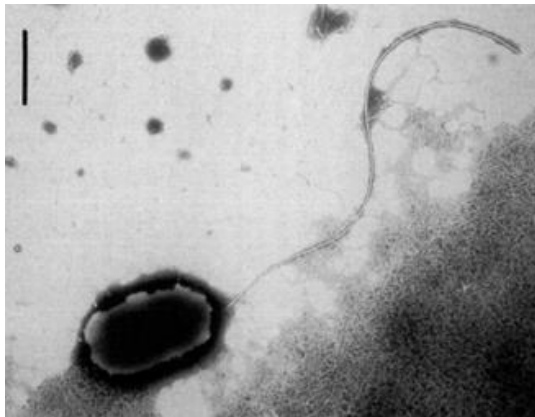
+ = dodatni; - = ujemny; V = zmienna (+/-)

Źródło: opracowanie własne na podstawie [28].

P. damsela początkowo zostały wyizolowane z owrzodzeń skóry stawonogów bytujących w wodach klimatu umiarkowanego i sklasyfikowane jako *Vibrio damsela* [29]. Dopiero po czasie gatunek ten, w oparciu o cechy fenotypowe, został przeniesiony do rodzaju *Photobacterium*. Na podstawie badań drogi rozwojowej bakterii okazało się, że patogen ryb *Pasteurella piscicida* jest blisko spokrewniony z *P. damsela*, dlatego też zaproponowano, aby gatunek *P. damsela* zawierał dwa podgatunki, tj. *P. damsela* subsp. *damsela* (Pdd) i *P. damsela* subsp. *piscicida* (Pdp). Sprowadzenie tych dwóch bakterii do jednego gatunku odbyło się na podstawie analizy filogenetycznej, ponieważ pod względem szczegółowej charakterystyki morfologicznej i biochemicznej podgatunki te są wyraźnie rozróżnialne [30]. Na początku lat 90. XX wieku Okuzumi i wsp. (1994) [4] opisali natomiast gatunek silnie halofilnej bakterii zdolnej do produkowania histaminy, którą nazwano *P. histaminum*.

Fotobakterie to pałeczki o rozmiarach komórki od ok. 0,8 μm do 1,3 μm na ok. od 1,8 μm do 2,4 μm. Mogą rozwijać się zarówno w środowisku beztlenowym, jak i tlenowym. Mają zdolność do poruszania się za pomocą rzęski polarnej, czyli pojedynczej i umiejscowionej biegunowo (fot. 2) [31, 32].

Cechą charakterystyczną niektórych gatunków w obrębie rodzaju *Photobacterium* jest zdolność do luminescencji. Umiejętność ta jest związana z obecnością operonu *lux*, który składa się z dwóch głównych genów regulatorowych, tj. *luxI* i *luxR*, oraz innych genów *luxCDABEG*. Kodują one związki chemiczne produkujące światło [25].



Fotografia 2. *Photobacterium histaminum* (Okazumi i wsp. 1994) [4]

Fotobakterie do wzrostu potrzebują sodu, dlatego też w warunkach laboratoryjnych nieprawidłowo rosną na pożywkach o standardowej lub obniżonej zawartości chlorku sodu [5]. Na wzrost świecących bakterii duży wpływ ma nie tylko stopień zasolenia, ale także temperatura i pH ośrodka, w jakim się znajdują. Z tego powodu liczebność i występowanie danego gatunku w wodach przybrzeżnych koreluje ze zmianami warunków środowiska [33].

Testy wrażliwości na środki przeciwbakteryjne wykazują, że fotobakterie są wrażliwe na norfloksacyne, gentamycyne, neomycyne, sulfametoksazol, tetracycline i streptomycyne [34]. Inne źródła podają jednak, że u *P. damsela* subsp. *piscicida* obserwować już można oporność na amipicyline, rifampicyne, cefotaksym, a także ciprofloksacyne, natomiast u *P. damsela* subsp. *damsela* dodatkowo na oksytetracycline [18].

3. Chorobotwórczość rodzaju *Photobacterium*

Niektóre gatunki z rodzaju *Photobacterium*, tj. *P. rosenbergii*, *P. jeanii*, *P. sanctipauli* oraz dwa podgatunki *P. damsela*, zostały zgłoszone jako wywołujące szereg patologii u żywicieli zwierzęcych, takich jak koralowce, gąbki, ryby i zwierzęta homeotermiczne [14, 35-37]. Niestety, niewiele wiadomo na temat mechanizmów patogenyzy *P. rosenbergii* i *P. sanctipauli*, które powodują bielenie koralowców oraz ich śmierć. Natomiast obydwie podgatunki *P. damsela* zyskały dużą uwagę jako patogeny koralowców, ryb i ssaków, w tym również człowieka [38].

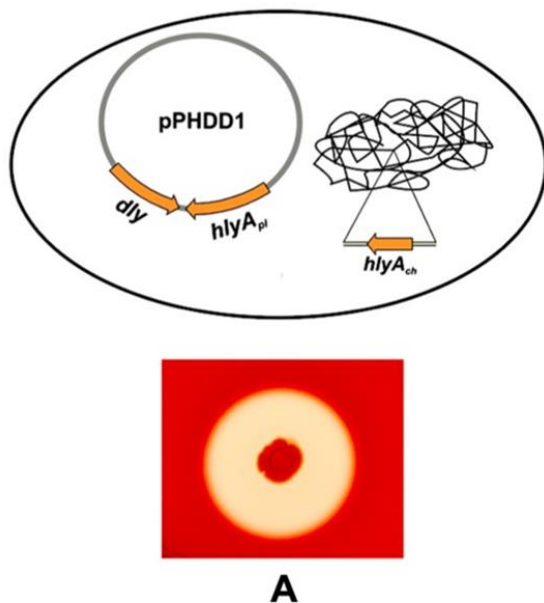
P. damsela subsp. *piscicida* (Pdp), jest czynnikiem wywołującym fotobakteriozę ryb, zwaną także pasterelozą ze względu na wcześniejszą nazwę tego patogenu (*Pasteurella piscicida*). Jest to poważna choroba, która dotyka różne hodowane gatunki ryb morskich, jednocześnie jest jedną z najbardziej śmiertelnych infekcji występujących w akwakulturze [39]. Ostra fotobakterioza charakteryzuje się wielogniskową martwicą występującą w takich narządach jak śledziona, wątroba czy nerki. Bakterie gromadzą się w naczyniach włosowatych, fagocytach i przestrzeniach śródmiąższowych. Przewlekłe zmiany można rozpoznać po pojawieniu się białych guzków w narządach wewnętrznych [40]. *P. damsela* subsp. *piscicida* na pierwszym etapie infekcji wykorzystuje zdolności adhezyjne i inwazyjne, wykazując dużą zdolność do wiązania się z nabłonkiem jelitowym ryb. W adhezji pośredniczy receptor białkowy lub glikoproteinowy, a internalizacja, czyli wniknięcie bakterii, jest zależna od mikrofilamentów aktyny i metabolizmu komórkowego, który

także odgrywa aktywną rolę, jednak nie jest do końca poznany w tym procesie [41]. Pdp wykazuje najwyższą chorobotwórczość w sezonie letnim, następnie jesienią, wiosną i zimą na końcu. Jako leczenie polecana jest ciproflaksacyna, jako że obydwa podgatunki *P. damsela*e są na nią w większości przypadków wrażliwe [42].

W związku z tym, że *P. damsela*e subsp. *piscicida* powoduje większe straty ekonomiczne niż podgatunek *P. d. damsela*e, to na niej skupia się większość badań, w tym również oceny wrażliwości na antybiotyki [30]. U *P. d. piscicida* stwierdzono obecność koniugacyjnych plazmidów oporności wielolekowej. Przypuszcza się w związku z tym, że skoro oba podgatunki *P. damsela*e występują często w tym samym środowisku, dochodzi pomiędzy nimi do transferu genów, co skutkuje nabyciem oporności antybiotykowej także przez drugi podgatunek [18, 43].

Drugi podgatunek, *P. damsela*e subsp. *damsela*e (Pdd), zamieszkuje wody i osady morskie, ale też morskie zwierzęta [44]. Mikroorganizmy te uważane są za główny patogen kilku gatunków dzikich i hodowlanych ryb, powodują infekcje ran i posocznicę krwotoczną. Jest to również oportunistyczny patogen ludzki, powodujący m.in. martwicze zapalenie powięzi [14]. Pdd stanowi duże zagrożenie dla ludzi. Do infekcji dochodzi poprzez kontakt drobnoustrojów z ranami powstającymi przy oporządzaniu ryb, w wyniku kontaktu tkanki podskórnej ze środowiskiem morskim lub po zjedzeniu surowych owoców morza. Spotkano się także z rozwojem infekcji drogą moczową poprzez kontakt ze słoną wodą [3, 9, 13]. Najczęściej z tego typu zachorowaniami spotykano się do tej pory na wybrzeżach Stanów Zjednoczonych Ameryki, Australii i Japonii. Jednym z poważniejszych skutków infekcji *P. damsela*e subsp. *damsela*e jest martwicze zapalenie powięzi, które w skrajnych przypadkach może prowadzić do śmierci. W tego typu sytuacjach zaleca się oczyszczenie chirurgiczne ran, a nawet amputację zainfekowanego obszaru, ponieważ infekcja może rozchodzić się po organizmie w bardzo krótkim czasie [45, 46]. Choroby takie jak cukrzyca, zaburzenia funkcjonowania wątroby czy przewlekłe osłabienia mogą sprzyjać zakażeniu *P. damsela*e subsp. *damsela*e. Jednak nie jest to warunek konieczny, ponieważ osoby zdrowe także są podatne na ten rodzaj infekcji [47-49]. Co jest istotne, zauważono, że pojawienie się ognisk choroby w gospodarstwach rybnych jest często poprzedzone podwyższeniem temperatury wody w miesiącach letnich [50]. Z badań wynika, że szczepy *P. damsela*e subsp. *damsela*e mają bardzo zbliżone determinanty wirulencji zarówno dla żywicieli poikilo-, jak i homeotermicznych. Bakteryjne produkty zewnątrzkomórkowe (ECP), tj. fosfolipazy, substancje cytotoksyczne i hemolityczne, mogą być odpowiedzialne za uszkodzenie zainfekowanych komórek, a w konsekwencji uwolnienie mikroorganizmów i inwazję sąsiednich komórek. Wykazano, że ECP szczepów *P. damsela*e są śmiertelne dla różnych gatunków ryb, ale też dla homeotermicznych linii komórkowych [51]. Vences i wsp. (2017) wykazali, że aktywność fosfolipazy i kolagenazy przyczynia się do zjadliwości Pdd. Powszechnie wiadomo, że istnieje ścisły związek między zdolnością mikroorganizmu do wywoływania chorób a produkcją toksyn bakteryjnych [9]. W przypadku *P. damsela*e subsp. *damsela*e opisano kilka termolabilnych toksyn cytolitycznych. Jedną z nich, nazwaną damselizyną (Dly), a będącą fosfolipazą-D aktywną wobec sfingomieliny, wykazała silną aktywność hemolityczną [51]. Wykazano również, że obecność genu *dly* nie jest warunkiem wstępnym dla aktywności hemolitycznej i patogenności Pdd, ponieważ szczepy *dly*-ujemne posiadają potencjał wirulencji dla zwierząt, a także wykazują toksyczność dla linii komórkowych homeotermicznych i poikilotermicznych [52, 53]. Rivas i wsp. (2011) zidentyfikowali

i scharakteryzowali plazmid pPHDD1 wielkości 150 kb, który zawiera geny zarówno dla damselizyny, jak i fobalizyny (HlyApl) [54]. Ta ostatnia jest małą toksyną tworzącą pory o aktywności hemolizyny (PFT) [38]. Badania nad właściwościami damselizyny udowodniły, że jest ona aktywna wobec erytrocytów kilkunastu gatunków zwierząt stałocieplnych, w tym m.in. myszy (rys. 1) [54].



Rysunek 1. Fenotyp hemolityczny *P. damsela* subsp. *damsela* na agarze z krwią owczą. Szczepy posiadające plazmid pPHDD1 wytwarzają trzy hemolizyny powodujące szerokie halo hemolityczne w agarze z krwią (A) [54]

Każda hemolizyna przyczynia się do wirulencji Pdd w różnym stopniu, chociaż tylko szczepy produkujące Dly powodują śmierć u ryb, demonstrując znaczenie plazmidu dla wirulencji tych bakterii. Pomimo istotności pPHDD1 wiele wirulentnych szczepów *P. damsela* subsp. *damsela* jest pozbawionych plazmidu. Aktywność hemolityczna wykazywana przez te szczepy jest wynikiem obecności hemolizyny PhlyC, kodowanej przez chromosomowy gen *hlyAch* [14, 55]. Niewiele wiadomo na temat właściwości adhezyjnych *P. damsela* subsp. *damsela*, chociaż Khouadja i wsp. (2014) ustalili, że podgatunek ten posiada zdolność przylegania do śluzu ryb [56]. Z badań prowadzonych na różnych szczepach Pdd wynika natomiast, że ma on również zdolność do wytwarzania histaminy, tak samo silnej jak w przypadku *P. histaminum*. Duże ilości tej aminy są w stanie wywołać zatrucie pokarmowe. Szczegółowe analizy porównawcze wskazują jednak, że prawdopodobnie *P. histaminum* nie jest osobnym gatunkiem i przez autorów uznawany jest jedynie za wariant *P. damsela* subsp. *damsela* [57].

4. Podsumowanie

Photobacterium spp. są bakteriami występującymi najczęściej w środowiskach morskich, mogą być jednak również izolowane z różnych typów surowego mięsa i ryb [1, 3]. Występowanie fotobakterii w produktach żywnościowych przyspiesza ich psucie, ale również stanowi zagrożenie dla zdrowia człowieka, w związku z patogennością

i toksygennością niektórych gatunków [54]. Większość dotychczas opisanych przypadków klinicznych miała postać infekcji ran, które mogą, ale nie muszą, powikłać się w śmiertelne martwicze zapalenie powięzi. Problemem w sytuacji zainfekowania, np. poprzez skałeczenie w momencie oprawiania ryb lub mięsa zanieczyszczonego fotobakteriami, jest ich zdolność do produkcji hemolizyn [46]. W związku z możliwością występowania *Photobacterium* spp. na różnych typach mięsa oraz istniejącymi w wielu krajach na świecie tradycjami kulinarnymi polegającymi na spożywaniu surowego mięsa, np. ryb lub wołowiny, ryzyko infekcji/zatrucia zwiększa swój zasięg. Temat zanieczyszczeń produktów spożywczych fotobakteriami wymaga zatem dogłębnego przeanalizowania danych oraz szeroko zakrojonych analiz eksperymentalnych.

Literatura

1. Urbańczyk H., Ast J.C., Dunlap P.V., *Phylogeny, genomics, and symbiosis of Photobacterium*, FEMS Microbiology Reviews, 35, 2011, s. 324-342.
2. Hendrie M.S., Hodgkiss W., Shewan J.M., *The identification, taxonomy and classification of luminous bacteria*, Microbiology, 64, 1970, s. 151-169.
3. Labella A.M., Arahal D.R., Castro D., Lemos M.L., Borrego J.J., *Revisiting the genus Photobacterium: taxonomy, ecology and pathogenesis*, International Microbiology, 20, 2017, s. 1-10.
4. Okuzumi M., Hiraishi A., Kobayashi T., Fujii T., *Photobacterium histaminum* sp. nov., a histamine-producing marine bacterium, Int. J. Syst. Bacteriol., 44, 1994, s. 631-636.
5. Dalgaard P., Mejlholm O., Christiansen T.J., Huss H.H., *Importance of Photobacterium phosphoreum in relation to spoilage of MAP fish products*, Letters in Applied Microbiology, 24, 1997, s. 373-378.
6. Dalgaard P., Madsen H.L., Samieian N., Emborg J., *Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (Belone belone belone) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage*, Journal of Applied Microbiology, 101, 2006, s. 80-95.
7. Mace S., Joffraud J.J., Cardinal M., Malcheva M., Cornet J., Lalanne V., Chevalier F., Serot T., Pilet M.F., Dousset X., *Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (Salmo salar) fillets stored under modified atmosphere packaging*, International Journal of Food Microbiology, 160, 2013, s. 227-238.
8. Møller C.O.D.A., Ücok E.F., Rattray F.P., *Histamine forming behaviour of bacterial isolates from aged cheese*, Food Research, 128, 2019, 108719.
9. Vences A., Rivas A.J., Lemos M.L., Husmann M., Osorio C.R., *Chromosome-encoded hemolysin, phospholipase and collagenase, contribute to virulence for fish in plasmidless isolates of Photobacterium damsela subsp. damsela*, Applied Environmental Microbiology, 83, 2017, e00401-17.
10. Terceti M.S., Ogut H., Osorio C.R., *Photobacterium damsela subsp. damsela, an emerging fish pathogen in the Black Sea: Evidence of a multiclonal origin*, Applied Environmental Microbiology, 82(13), 2016, s. 3736-3745.
11. Do Vale A., Silva M.T., dos Santos N.M., Nascimento D.S., Reis-Rodrigues P., Costa-Ramos C., Ellis A.E., Azevedo J.E., *AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of Photobacterium damsela subsp. piscicida with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils*, Molecular Microbiology, 58, 2005, s. 1025-1038.
12. Fujioka R.S., Greco S.B., Cates M.B., Schroeder J.P., *Vibrio damsela from wounds in bottlenose dolphins Tursiops truncatus*, Diseases of Aquatic Organisms, 4, 1988, s. 1-8.
13. Fouz B., Conchas R.F., Magariños B., Toranzo A.E., *Vibrio damsela strain virulence for fish and mammals*, FHS/AFS Newsletter, 20, 1992, s. 3-4.

14. Rivas A.J., Lemos M.L., Osorio C.R., *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans, *Frontiers Microbiology*, 4, 2013, s. 283-289.
15. Oliver-Guimerá A., Lourdes Abarca M., Cuvertoret-Sanz M., Domingo M., *Fatal Photobacterium damsela*-induced enteritis in a leatherback turtle *Dermochelys coriacea*, *Diseases of Aquatic Organisms*, 135(2), 2019, 151-156.
16. Clarridge J.E., Zigelboim-Daum S., *Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of Vibrio damsela associated with a fatal wound infection*, *Journal of Clinical Microbiology*, 21, 1985, s. 302-306.
17. Alvarez J.R., Lamba S., Dyer K.Y., Apuzzio J.J., *An unusual case of urinary tract infection in a pregnant woman with Photobacterium damsela*, *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 80682, 2006, s. 1-3.
18. Essam H.M., Abdellrazeq G.S., Tayel S.I., Torky H.A., Fadel A.H., *Pathogenesis of Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream, *Microbial Pathogenesis*, 99, 2016, s. 41-50.
19. Schröttner P., Tille E., Lück C., Bunk B., *Wound infection caused by Photobacterium damsela* in a 32-year-old woman: case report and review of the literature, *GMS Infection Diseases*, 8, 2020.
20. Hilgarth M., Fuertes S., Ehrmann M., Vogel R.F., *Photobacterium carnosum* sp. nov., isolated from spoiled modified atmosphere packaged poultry meat, *Systematic and Applied Microbiology*, 41, 2018, s. 44-50.
21. Hilgarth M., Lehner E.M., Behr J., Vogel R.F., *Diversity and anaerobic growth of Pseudomonas spp. isolated from modified atmosphere packaged minced beef*, *Journal of Applied Microbiology*, 127, 2019, s. 159-174.
22. Höll L., Hilgarth M., Geissler A.J., Behr J., Vogel R.F., *Prediction of in situ metabolism of photobacteria in modified atmosphere packaged poultry meat using metatranscriptomic data*, *Microbiology Research*, 222, 2019, s. 52-59.
23. Fuertes-Perez S., Hauschild P., Hilgarth M., Vogel R.F., *Biodiversity of Photobacterium spp. isolated from meats*, *Frontiers in Microbiology*, 10, 2019, 2399.
24. Li N., Zhang Y., Wu Q., Gu Q., Chen M., Zhang Y., Sun X., Zhang J., *High-throughput sequencing analysis of bacterial community composition and quality characteristics in refrigerated pork during storage*, *Food Microbiology*, 83, 2019, 86-94.
25. Dunlap P.V., *Bioluminescence, microbial*, [w:] Schaechter M. (red.), *Encyclopedia of microbiology*, Elsevier, Oxford 2009, s. 45-61.
26. Parte A.C., Sardà Carbasse J., Meier-Kolthoff J.P., Reimer L.C., Göker M., *List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 2020, s. 5607-5612.
27. Seo H.J., Bae S.S., Lee J.H., Kim S.J., *Photobacterium frigidophilum* sp. nov., a psychrophilic, lipolytic bacterium isolated from deep-sea sediments of Edison Seamount, *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 2005, 1661-1666.
28. Reichelt J.L., Baumann P., *Taxonomy of the marine, luminous bacteria*, *Archives of Microbiology*, 94, 1973, s. 283-330.
29. Love M., Teebken-Fisher D., Hose J.E., Farmer J.J. 3rd, Hickman F.W., Fanning G.R., *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*, *Science*, 214(4525), 1981, s. 1139-1140.
30. Thyssen A., Grisez L., van Houdt R., Ollevier F., *Phenotypic characterization of the marine pathogen Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1998, s. 1145-1151.
31. Kaysner C.A., *Vibrio species*, [w:] Lund B., Baird-Parker A.C., Gould G.W., *The microbiological safety and quality of food*, Springer, New York 2000, s. 1336-1362.
32. Molin G., *Modified atmospheres*, [w:] Lund B., Baird-Parker A.C., Gould G.W., *The microbiological safety and quality of food*, Springer, New York 2000, s. 214-234.

33. Waters P., Lloyd D., *Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analysed on gradient plates*, Microbiology, 131, 1985, s. 2865-2869.
34. Moi I.M., Roslan N.N., Leow A.T.C., Ali M.S.M., Rahman R.N.Z.R.A., Rahimpour A., Sabri S., *The biology and the importance of Photobacterium species*, Applied Microbiology and Biotechnology, 101, 2017, s. 4371-4385.
35. Thompson F.L., Thompson C.C., Naser S., Hoste B., Vandemeulebroecke K., Munn C., Bourne D., Swings J., *Photobacterium rosenbergii sp. nov. and Enterovibrio coralii sp. nov., vibrios associated with coral bleaching*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 2005, s. 913-917.
36. Chimetto L.A., Cleenwerck I., Thompson C.C., Brocchi M., Willems A., De Vos P., Thompson F.L., *Photobacterium jeanii sp. nov., isolated from corals and zoanthids*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 2010, s. 2843-2848.
37. Moreira A.P.B., Duytschaever G., Chimetto Tonon L.A., Froes A.M., de Oliveira M.L., Amado-Filho G.M., Francini-Filho R.B., De Vos P., Swings J., Thompson C.C., Thompson F.L., *Photobacterium sanctipauli sp. nov. isolated from bleached Madracis decactis (Scleractinia) in the St Peter & St Paul Archipelago, Mid-Atlantic Ridge*, Brazilian Peer Journal, 2, 2014, s. 427.
38. Rivas A.J., von Hoven G., Neukirch C., Meyenburg M., Qin Q., Füsler S., Boller K., Lemos M.L., Osorio C.R., Husmann M., *Phobalysin, a small β -pore forming toxin of Photobacterium damsela subsp. damsela*, Infection and Immunity Journal, 83, 2015, s. 4335-4348.
39. López-Doriga M.V., Barnes A.C., dos Santos N.M., Ellis A.E., *Invasion of fish epithelial cells by Photobacterium damsela subsp. piscicida: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum*, Microbiology, 146, 2000, s. 21-30.
40. Andreoni F., Magnani M., *Photobacteriosis: prevention and diagnosis*, Journal of Immunology Research, 2014, 2014, 793817.
41. Eissa I.A.M., Derwa H.I., Ismail M., El-Lamie M., Dessouki A.A., Elsheshtawy H., Bayoumy E.M., *Molecular and phenotypic characterization of Photobacterium damsela among some marine fishes in Lake Tamsah*, Microbial Pathogenesis, 114, 2018, s. 315-322.
42. Wang R., Feng J., Su Y., Ye L., Wang J., *Studies on the isolation of Photobacterium damsela subsp. piscicida from diseased golden pompano (Trachinotus ovatus Linnaeus) and antibacterial agents sensitivity*, Veterinary Microbiology, 23, 2013, s. 957-963.
43. Chiu T.H., Kao L.Y., Chen M.L., *Antibiotic resistance and molecular typing of Photobacterium damsela subsp. damsela, isolated from seafood*, Journal of Applied Microbiology, 114(4), 2013, s. 1184-1192.
44. Serracca L., Ercolini C., Rossini I., Battistini R., Giorgi I., Prearo M., *Occurrence of both subspecies of Photobacterium damsela in mullets collected in the river Magra (Italy)*, Canadian Journal of Microbiology, 57, 2011, s. 437-440.
45. Goodell K.H., Jordan M.R., Graham R., Cassidy C., Nasraway S.A., *Rapidly advancing necrotizing fasciitis caused by Photobacterium (Vibrio) damsela: a hyperaggressive variant*, Critical Care Medicine, 32(1), 2004, s. 278-281.
46. Matanza X.M., Osorio C.R., *Exposure of the opportunistic marine pathogen Photobacterium damsela subsp. damsela to human body temperature is a stressful condition that shapes the transcriptome, viability, cell morphology, and virulence*, Frontiers in Microbiology, 11, 2020, 1771.
47. Morris J.G., Miller H.G., Wilson R., Tacket C.O., Hollis D.G., Hickman F.W., *Illness caused by Vibrio damsela and Vibrio hollisae*, Lancet, 319(8284), 1982, s. 1294-1297.
48. Barber G.R., Swygert J.S., *Necrotizing fasciitis due to Photobacterium damsela in a man lashed by a stingray*, The New England Journal of Medicine, 342(11), 2000, s. 824.

49. Yamane K., Asato J., Kawade N., Takahashi H., Kimura B., Arakawa Y., *Two cases of fatal necrotizing fasciitis caused by Photobacterium damsela in Japan*, Journal of Clinical Microbiology, 42(3), 2004, s. 1370-1372.
50. Pedersen K., Skall H.F., Lassen-Nielsen A.M., Bjerrum L., Olesen N.J., *Photobacterium damsela subsp. damsela, an emerging pathogen in Danish rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum), mariculture*, Journal of Fish Diseases, 32, 2009, s. 465-472.
51. Kothary M.H., Kreger A.S., *Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by Vibrio damsela*, Infection and Immunity Journal, 49, 1985, s. 25-31.
52. Labella A., Sánchez-Montes N., Berbel C., Aparicio M., Castro D., Machado M., Borrego J.J., *Toxicity of Photobacterium damsela subsp. damsela strains isolated from new cultured marine fish*, Diseases of Aquatic Organisms, 92, 2010, s. 31-40.
53. Osorio C.R., Collins M.D., Toranzo A.E., Barja J.L., Romalde J.L., *16S rRNA gene sequence analysis of Photobacterium damsela and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis*, Applied of Environmental Microbiology, 65(7), 1999, s. 2942-2946.
54. Rivas A.J., Balado M., Lemos M.L., Osorio C.R., *The Photobacterium damsela subsp. damsela hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid*, Infection and Immunity Journal, 79, 2011, s. 4617-4627.
55. Vences A., Rivas A.J., Lemos M.L., Husmann M., Osorio C.R., *Chromosome-encoded hemolysin, phospholipase and collagenase, contribute to virulence for fish in plasmidless isolates of Photobacterium damsela subsp. Damsela*, Applied of Environmental Microbiology, 83, 2017, e00401-17.
56. Khouadja S., Lamari F., Bakhrouf A., Gaddour K., *Virulence properties, biofilm formation and random amplified polymorphic DNA analysis of Photobacterium damsela subsp. damsela isolates from cultured sea bream (Sparus aurata) and sea bass (Dicentrarchus labrax)*, Microbial Pathogenesis, 69-70, 2014, s. 13-19.
57. Kimura B., Hokimoto S., Takahashi H., Fujii T., *Photobacterium histaminum Okuzumi et al. 1994 is a later subjective synonym of Photobacterium damsela subsp. damsela*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50, 2000, s. 1339-1342.

Czy *Photobacterium* spp. izolowane z mięsa stanowią zagrożenie dla zdrowia?

Streszczenie

Bakterie z rodzaju *Photobacterium* to szeroko rozpowszechnione mikroorganizmy morskie, związane również z morskimi zwierzętami. Pomimo tego coraz częstsze są doniesienia o izolowaniu tych drobnoustrojów z różnego typu mięs, takich jak drób, wołowina czy wieprzowina. W obrębie rodzaju *Photobacterium* znane są gatunki chorobotwórcze dla zwierząt, ale notowane są również infekcje ludzi z ich udziałem. *P. damsela* subsp. *damsela* to gatunek o potwierdzonym potencjale chorobotwórczym w stosunku do człowieka. *P. histaminum* zaś odpowiedzialny może być za poważne zatrucia pokarmowe. Występowanie tych bakterii w mięsie ryb oraz innych jego rodzajach stwarza ryzyko infekcji oraz zatrucia.

Słowa kluczowe: *Photobacterium*, chorobotwórczość, mięso

Do *Photobacterium* spp. isolated from meat pose a health risk?

Abstract

Bacteria of the *Photobacterium* genus are widespread marine micro-organisms, also associated with marine animals. However, there are increasing reports of the isolation of these microorganisms from various types of meat such as poultry, beef and pork. Within the *Photobacterium* genus, species are known to be pathogenic in animals, but human infections involving them have also been reported. *P. damsela* subsp. *damsela* is a species with an open pathogenic potential for humans. *P. histaminum*, on the other hand, may be responsible for serious food poisoning. The presence of these bacteria in fish meat and other types of fish meat poses a risk of infection and poisoning.

Keywords: *Photobacterium*, pathogenicity, meat

Obecne i potencjalne zastosowanie wydzielin ślimaków oraz izolowanych z nich substancji bioaktywnych w medycynie i kosmetyce

1. Wprowadzenie

Ślimaki (*Gastropoda*) to liczna gromada zwierząt należąca do typu mięczaków (*Mollusca*). Można je znaleźć prawie we wszystkich typach siedlisk, od dna oceanów po rejonny tundry. Są bardzo zróżnicowane pod względem wielkości, kształtu, długości życia i cyklu życiowego. Z roku na rok rośnie liczba opisanych gatunków, ponieważ prowadzone są badania w mniej dostępnych rejonach. Szacuje się, że na świecie występuje ponad 100 tysięcy gatunków ślimaków, z czego większość w wodach słonych a około 10 tysięcy w wodach słodkich [1]. Ślimaki lądowe stanowią 25% wszystkich gatunków. Według Pylon i wsp. kolejne 100 tysięcy gatunków może zostać dopiero opisane [2]. Inne proporcje rozpowszechnienia tych mięczaków obserwuje się w Polsce. Spośród łącznej liczby 220 gatunków większość (170) stanowią ślimaki lądowe, a tylko część to ślimaki słodkowodne (10) i morskie (6). Łącznie wszystkie gatunki ślimaków stanowią ponad 70% wszystkich mięczaków w Polsce [3, 4].

Według światowego rejestru gatunków morskich WoRMS (ang. *World Register of Marine Species*) w typie mięczaków znajduje się 19 gromad, m.in. *Gastropoda*, która liczy 11 podgromad [2]. W jej obrębie wyodrębnia się trzy podgromady: płucodyszne (*Pulmonata*), przodoskrzelne (*Prosobranchia*) oraz tyłoskrzelne (*Opisthobranchia*). Do pierwszej z nich, obejmującej ponad 35 tysięcy gatunków lądowych i wodnych, zalicza się zarówno ślimaki obdarzone muszlą, jak i te posiadające częściowo zredukowaną muszlę (tzw. półnagie), a także organizmy, u których muszla jest zredukowana do płytki wapiennej [1]. Prawie wszystkie gatunki ślimaków w Polsce należą do tej podgromady, w tym błotniarka stawowa (*Lymnaea stagnalis*), przytulik strumieniowy (*Ancylus fluviatilis*), zatoczek pospolity (*Planorbis planorbis*), ślimak winniczek (*Helix pomatia*) i ślimak zaroślowy (*Arianta arbustorum*) [5]. Innymi przedstawicielami tej podgromady są ślimak ogrodowy (*Cornu aspersum*, dawniej *Helix Aspersa Muller*) i *Lissachatina fulica* [6]. Podgromada przodoskrzelnych jest najliczniejsza, obejmuje ponad połowę żyjących współcześnie gatunków ślimaków, głównie morskich i słodkowodnych. Przedstawicielami przodoskrzelnych w Polsce są zagrzebki (*Bithynia*) i żyworódki (*Viviparus*) [5]. Podgromada tyłoskrzelnych obejmuje około 14 tysięcy gatunków, głównie morskich, zasie-

¹ s80119@365.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

² s78058@365.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

³ s78750@365.sum.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

⁴ eadamek@sum.edu.pl, Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

dłających strefy przybrzeżne. W Morzu Bałtyckim występuje m.in. wypławczak garbaty (*Limapontia capitata*) i *Lamellidoris muricatus* [5].

Ślimaki wydzielają śluz, który wygląda jak żel i pełni wiele funkcji, m.in. chroni je przed wysychaniem, ułatwia poruszanie się, służy do odstraszenia drapieżników, rozpoznawania innych ślimaków czy podążania śladem do znanego miejsca przeznaczenia. Niekiedy umożliwia odpoczywającemu ślimakowi bierne przyleganie do powierzchni, np. skały [7]. Dla przykładu – śluz wydzielany w postaci długich, delikatnych nici przez np. nieruchome gatunki morskie z rodzaju *Vermetus* tworzy unoszącą się w wodzie formę sieci do łapania planktonu. Co pewien czas „sieć” wraz ze zdobyczą jest wciągana do otworu gębowego [8]. Ze śluzu, m.in. *Haustellum brandaris* (rodzina *Muricidae*), pozyskiwano barwnik (purpurę tyryjską, 6,6'-dibromoindygo) służący w starożytności jako pigment do barwienia tkanin [9].

Drapieżne ślimaki morskie z rodziny *Naticidae* wykorzystują radułę i kwaśną wydzielinę (kwas siarkowy, pH = 2) do przebijania się przez skorupę i unieruchamiania innych mięczaków [10]. Pod wpływem kwasu następuje rozpuszczenie skorupy, składającej się m.in. z węglanu wapnia oraz konchioliny (substancji białkowej). Morskie ślimaki drapieżne wydzielają także jady, za pomocą których paraliżują złapaną zdobycz.

Z powodu dużej liczby i różnorodności substancji bioaktywnych zawartych w wydzielinach ślimaków nadal nie poznano wszystkich ich właściwości. Niniejsza praca ma na celu przybliżenie wyników najnowszych badań opisujących potencjalne wykorzystanie składników aktywnych biologicznie wyizolowanych z wydzielin ślimaków lądowych i morskich, głównie w medycynie i w kosmetyce. Ponieważ stosowanie produktów pochodzenia zwierzęcego jest powszechną praktyką na świecie, przedstawiamy też możliwy kierunek, w jakim mogą być prowadzone dalsze prace doświadczalne ze składnikami bioaktywnymi wyizolowanymi z tych wydzielin.

2. Substancje bioaktywne w wydzielinie ślimaków morskich

W rzędzie *Neogastropoda* (podgromada przodoskrzelnych) wyróżnia się nadrodzinę *Conoidea*, do której zalicza się, m.in. rodziny *Turridae*, *Terebridae* i ślimaki stożkowe (*Conidae*). Większość z należących do nich gatunków ma gruczoł jadowy i kolec jadowy używany do unieruchamiania ofiary (drobnych kręgowców i bezkręgowców) lub w samoobronie [11].

Do rodziny *Turridae* należy około 4000 gatunków małych, mięsożernych ślimaków występujących w morzach w strefie głębinowej [11, 12]. Większość gatunków ma zmodyfikowaną radułę, dzięki czemu mogą za jej pomocą aplikować jad. Ze względu na niewielkie rozmiary tych organizmów trudno jest wyizolować z nich substancje bioaktywne wchodzące w skład złożonych toksyn (tzw. turritoksyny), choć szacuje się, że ich liczba może przekroczyć 10 tysięcy [13]. Peptydy wyizolowane z jadu *Lophiotoma olangoensis* są bogate w cysteinę i zawierają zwykle od 80 do 110 aminokwasów, a więc są znacznie większe niż związki izolowane z jadu ślimaków stożkowych [13]. Niektóre turritoksyny wyizolowane z *Polystira albida* i *Gemmula periscelida* (określone jako PaIAa oraz GpIAa) zawierają dużą liczbę reszt argininowych, tyrozynowych i metioninowych. Uznano, że nie są one podobne do innych znanych toksyn obecnych w jadzie ślimaków z nadrodziny *Conoidea* i stanowią nową klasę peptydów [12]. Badano także turritoksynę ubi3a wyizolowaną z jadu *Lophiotoma bisaya*. Stwierdzono, że po wstrzyknięciu (doczaszkowym) myszom wywołuje u nich drżenie i choć nie zidentyfikowano

specyficznego receptora docelowego, to wykluczono aktywność nikotynowych receptorów acetylocholino (nAChR, ang. *nicotinic acetylcholine receptor*) [14].

Rodzina *Terebridae* obejmuje około 300 gatunków ślimaków morskich o charakterystycznych wydłużonych muszlach, przypominających wiertło. Te drapieżniki żyjące w cieplejszych wodach (w piasku) posiadają, podobnie jak ślimaki stożkowe, jadowity kolec, którym unieruchamiają zdobycz. Jednak tylko niektóre gatunki mają wyspecjalizowaną radulę (używaną jako harpun) i gruczoły jadowe [15]. Ich jad (tzw. teretoksyna) wykazuje podobieństwo do jadu wydzielanego przez ślimaki stożkowe, choć różni się sekwencjami i stopniem modyfikacji potranslacyjnych [16]. Przykładowo, z *Terebra subulata* wyizolowano trzy teretoksyny (Agx-S6a, Agx-S7a oraz AgxS11), które nie wykazują żadnych modyfikacji potranslacyjnych [17]. Dotychczas najwięcej substancji bioaktywnych wyizolowali Gorson i wsp. z jądów *Cinguloterebra anilis* oraz *T. subulata*. W swojej pracy opisali ponad 130 związków o potencjalnym charakterze teretoksyn oraz enzymy, w tym karboksylazę γ -glutamylową, 4-hydroksylazę proliłową i sulfotransferazę tyrozylową [16]. Teretoksyny wykazują podobne działanie na układ nerwowy jak toksyny wydzielane przez ślimaki stożkowe. Związek wyizolowany z *Terebra guttata* spowodował paraliż u wieloszczetów [18], a wstrzyknięcie teretoksyny *T. subulata* i *Hastula hectica* do organizmu nicienia *Caenorhabditis elegans* wywołało u niego nieskoordynowane ruchy, a następnie paraliż [17, 19]. Stwierdzono także, że teretoksyny z jadu *Terebra argus* i *Terebra consobrina* oddziałują głównie na nAChR, a nie mają wpływu na kanały sodowe lub potasowe bramkowane napięciem [20].

Ślimaki należące do rodziny *Conidae* charakteryzują się stożkowatymi (stąd pochodzi ich nazwa zwyczajowa „stożki”), grubościennymi muszlami. Zasadlają morza i oceany wód subtropikalnych i tropikalnych, choć można je spotkać na rafach, w strefach przybrzeżnych, na skałach oraz w środowisku łąk glonów. Niektóre gatunki stożków bytują na sporych głębokościach. W wodach chłodniejszych występują nieliczne gatunki, np. w Morzu Śródziemnym jest to *Conus ventricosus*, a u wybrzeży Kalifornii – *Conus californicus* [21].

Każdy z odkrytych dotąd gatunków ślimaków stożkowych (ponad 500) jest drapieżnikiem polującym na małe ryby i wieloszczety, kielże, krewetki lub inne mięczaki. Stożki posiadają bardzo rozciągliwy otwór gębowy, dzięki czemu mogą połknąć rybę o podobnej wielkości jak ich muszle. Polując na swoje ofiary, atakują je za pomocą „zęba” przypominającego kształtem harpun. Podczas ataku wydzielają jad, który w swoim składzie ma między innymi tzw. konotoksyny (konopeptydy). Są to małe cząsteczki, na które składa się od 10 do 30 aminokwasów, choć wyizolowano związki zbudowane z 60 aminokwasów [22, 23]. Omawiane neurotoksyny zawierają fragmenty, w których występują liczne wiązania disiarczkowe. Każdy ślimak stożkowy ma charakterystyczny dla niego zestaw konotoksyn. Mają one powinowactwo do określonych izoform receptorów związanych z białkiem G i kanałów jonowych, w tym wielu kanałów jonowych bramkowanych ligandem lub napięciem. Przypuszcza się, że stożki mają fenotyp mutujący, który syntetyzuje w danym momencie konkretny konopeptyd. Oznacza to, że w przypadku zmiany warunków środowiskowych dochodzi do zmiany fenotypu tych organizmów, co przejawia się zmianami w sekwencji aminokwasów syntezowanego konopeptydu [24]. Dzięki temu mogą wykazywać większą specyficzność. Konotoksyny ślimaków morskich działają wielokierunkowo na komórki atakowanego organizmu. Mogą wykazywać działanie antagonistyczne na presynaptyczne, bramkowane napięciem kanały wapniowe, których

blokada prowadzi do zahamowania uwalniania neuroprzekazników. Inny mechanizm ich działania polega na kompetycyjnym lub niekompetycyjnym antagonizmie w stosunku do postsynaptycznych nikotynowych receptorów dla acetylocholino, co zapobiega depolaryzacji płytki końcowej mięśnia ofiary. Kolejny – trzeci wiąże się z inhibicją kanałów sodowych bramkowanych napięciem w komórkach mięśniowych ofiary [25].

W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania peptydami jako lekami. Ich synteza chemiczna jest jednak skomplikowana ze względu na dużą ilość wiązań disiarczkowych i dodatkowych modyfikacji potranslacyjnych, które często doprowadzają do nieprawidłowego fałdowania i agregacji peptydu [21].

2.1. Działanie przeciwbólowe konopeptydów

Jedynym, jak dotąd, zatwierdzonym nieopioidowym lekiem na nieuleczalny silny ból neuropatyczny jest Prialt® (zykonotyd) [26].

Lek zawiera w swoim składzie ω -konotoksynę, która ostatecznie znajduje zastosowanie w terapii, a wydzielono ją podczas badania dwóch gatunków ślimaków stożkowych, tzn. *Conus geographus* oraz *Conus magus*. Ich jady zawierają fizjologicznie i genetycznie spokrewnione ω -konotoksyny zdolne do paraliżu ryb, mianowicie GVIA (*C. geographus*) oraz MVIIA⁵ (*C. magus*). Ustalono, że neurotoksyny *C. geographus*, które mogą również spowodować śmierć ludzi, nieodwracalnie łączą się z kanałami wapniowymi bramkowanymi napięciem. W przypadku ω -konotoksyny *C. magus* – jej wiązanie było słabsze, dlatego została wybrana do dalszych badań. Po ustaleniu sekwencji aminokwasów MVIIA został on zsyntezowany, a produkt wykazywał oczekiwaną aktywność biologiczną wobec myszy i ryb. W 2004 roku ω -konotoksyna MVIIA została zatwierdzona przez amerykańską instytucję rządową – Federalną Agencję ds. Leków i Żywności (FDA, ang. *Food and Drug Administration*) i udostępniona na rynku pod nazwą Prialt® jako „podstawowa alternatywa dla morfiny”. W ślad za Ameryką poszła Europa, gdzie Europejska Agencja Leków (EMA, ang. *European Medicines Agency*) również postanowiła zarejestrować lek, dopuszczając jego obrót we wszystkich państwach członkowskich Unii Europejskiej oraz na terenie państw należących do Europejskiego Obszaru Gospodarczego. W Stanach Zjednoczonych został on wprowadzony do obrotu w 2004 roku, a w Europie w 2005 roku [26, 27].

2.1.1. Mechanizm działania i farmakokinetyka ω -konotoksyny

ω -Konotoksyna MVIIA jest selektywnym inhibitorem bramkowanych napięciem kanałów wapniowych i nie ma powinowactwa do innych receptorów i kanałów jonowych. Kanały te są zlokalizowane w neuronach i odpowiadają za napływ jonów Ca^{2+} wskutek depolaryzacji. Działanie tych kanałów powoduje uwalnianie neurotransmiterów, transkrypcje genów, aktywację przekazników II rzędu i modulację pobudliwości neuronalnej. W rdzeniu kręgowym występują one najczęściej w rogach tylnych, które odbierają

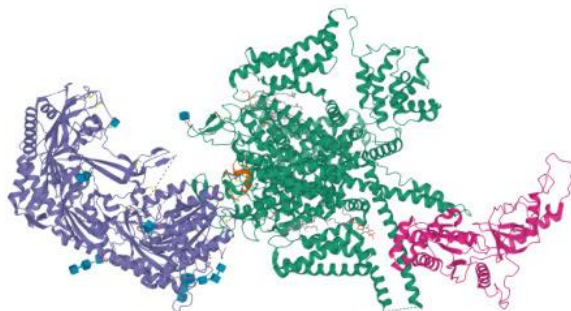
⁵ Różnorodność konopeptydów wymaga złożonego systemu klasyfikacji. W skrócie, na poziomie strukturalnym, konopeptydy są opisywane przez liczbę i rozmieszczenie reszt cysteiny (klasyfikacja *Cysteine Framework*). Stosowana jest też klasyfikacja w nadrodziny genów – zgodnie z podobieństwem peptydów sygnałowych. Opisano co najmniej 28 nadrodzin genów, m.in. A, B1, B2, B3, C, D, E, F, G, H, I1, I2, I3, J, K, L, M, N, O1, O2, O3, P, S, T, V oraz Y. Przykładowo, nadrodzina A ma sześć ram: I, II, IV, VI/VII, XIV i XXII. Konopeptydy działające na układ nerwowy są również klasyfikowane według ich aktywności farmakologicznej, tworząc 11 kanonicznych rodzin farmakologicznych. Zaktualizowane informacje dotyczące klasyfikacji konopeptydów są dostępne na stronie ConoServer [24].

sygnały wysyłane z aferentnych receptorów nocyceptywnych [27]. Wskutek inhibicji przekazywania sygnałów bólowych przez rdzeń kręgowy pacjenta dochodzi do zmniejszenia silnego, przewlekłego bólu.

Niezwykłą cechą tej substancji jest to, że pod względem chemicznym jej skład jest identyczny z 25-aminokwasowym peptydem, produktem ślimaka *C. magus*. Podobnie jak większość peptydów, ma niską biodostępność po podaniu doustnym, jest podatna na degradację przez enzymy żołądkowo-jelitowe oraz nie przenika bariery krew–mózg. Dlatego może być podawana jedynie przez cewnik dooponowy, w bardzo powolnym wlewie ciągłym za pomocą mikropompy infuzyjnej [26]. Takie podanie pozwala na ciągłą infuzję bardzo małych dawek substancji, ponieważ dawka początkowa wynosi 2,4 µg/dzień. U większości pacjentów stosuje się dawki od 6 µg/dzień do 10 µg/dzień, a maksymalna dawka dobową wynosi 21,6 µg [28]. Co najważniejsze, gdy jest podawana nawet przez długi czas, to nie traci ona swoich właściwości przeciwbólowych. Takie podanie pozwala na osiągnięcie działania znieczulającego na poziomie blokady uwalniania neurotransmiterów, które przekazywałyby uczucie bólu do dalszych części drogi – jąder wzgórza i kory mózgowej. Dodatkowo zykonytyd działa ochronnie na włókna nerwowe, zapobiegając patologicznemu wnikaniu jonów Ca^{2+} do neuronów u osób, u których doszło do urazów niedokrwiennych i mechanicznych mózgu [27].

Zykonytyd jedynie w śladowych ilościach przenika do krwioobiegu, rozprowadza się głównie w płynie mózgowo-rdzeniowym. Objętość dystrybucji w płynie mózgowo-rdzeniowym wynosi około 100 cm³, a w osoczu 30 dm³. Stopień związania z białkami osocza wynosi około 50%. Z płynu mózgowo-rdzeniowego związek jest usuwany w tempie odpowiadającym tempu wymiany płynu, natomiast okres połowicznej eliminacji z osocza wynosi 1,3 godziny. Tylko w niewielkim stopniu (<1%) lek wydalą się z moczem. Zykonytyd działa nawet 100 razy silniej niż morfina i z tego względu jest stosowany w leczeniu ostrego bólu, a nawet w obwodowej neuropatii spowodowanej urazem rdzenia kręgowego [27].

W leczeniu przewlekłego bólu opioidy często tracą swoje działanie, rozwijając tolerancję oraz powodując uzależnienie fizyczne i psychiczne. Zykonytyd stał się alternatywą dla opioidów, ponieważ nie wykazuje tego typu działania. Stwierdzono jednak występowanie pewnych działań niepożądanych u osób przyjmujących ten lek. Najczęściej (więcej niż 1 na 10 pacjentów) obserwowano zawroty głowy, oczopląs, oszołomienie, bóle głowy, zaburzenia chodu, senność i nieostre widzenie [29]. Komitet ds. Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (CHMP, ang. *Committee for Medicinal Products for Human Use*) uznał jednak, że korzyści wynikające ze stosowania zykonytydu są większe niż ryzyko i zalecił przyznanie pozwolenia na dopuszczenie wyrobu Prialt® do handlu. Obecnie trwają badania oceniające skutki długotrwałego stosowanie tego leku. W praktyce Prialt® nie jest jednak często podawany; zyskał miano *last resort* (ostatnia deska ratunku), ponieważ jest relatywnie drogi i wymaga implantacji pompy [26]. Jest on uznany jako tzw. „lek sierocy”, czyli stosowany w rzadkich chorobach, ponieważ liczba pacjentów z długotrwałym silnym bólem, wymagających podania zastrzyku przeciwbólowego bezpośrednio do kręgosłupa, jest niska [29].



Rysunek 1. Ludzki kanał wapniowy bramkowany napięciem (VGCC, ang. *voltage-gated calcium channel*) typu N (Cav2.2) w obecności zykonytydu (zaznaczony kolorem pomarańczowym) przy rozdzielczości 3,0 Å [30]

2.1.2. Inne konotoksyny o potencjalnym działaniu przeciwbólowym

Oprócz szczegółowo omówionej ω -konotoksyny MVIIA także inne konopeptydy ślimaków stożkowych były przedmiotem badań klinicznych.

Produkt oznaczony jako AM336 (Leconotide) jest syntetyczną wersją konotoksyny CVIDD (lokonotydu), którą wyizolowano z *Conus catus*. Wstępne badania wykazały, że jest bardziej selektywny w stosunku do VGCC typu N i ma większe okno terapeutyczne niż zykonytyd. Dodatkową zaletą podania AM336 jest możliwość wstrzyknięcia dożylnego bez konieczności stosowania pompy dordzeniowej [31]. Dostępne informacje wskazują, że przeszedł do fazy I/IIa (ocena bezpieczeństwa oraz wstępne ustalenie dawki) badań klinicznych w firmie Zenyth® (Rumunia). Aktualnie prace nad lekiem zostały zawieszono w związku z bankructwem firmy [32].

Xen2174 (analog konotoksyny MrIA), charakteryzujący się zwiększoną stabilnością i wydłużonym czasem działania (badania *in vivo* na modelach zwierzęcych), również był opracowywany jako alternatywna terapia przewlekłego bólu [33]. Sama konotoksyna MrIA została uznana za nieodpowiedniego kandydata na lek ze względu na N-końcową asparaginę, która ogranicza jej stabilność. Jednak zastąpienie tej cząsteczki asparaginy resztą piroglutaminianu znacząco poprawiło stabilność peptydu bez pogorszenia jego aktywności biologicznej, w tym bez wystąpienia dodatkowych niepożądanych skutków ubocznych. Analog MrIA wszedł do badań klinicznych pod nazwą Xen2174 w 2008 roku. Przeszedł pomyślnie fazę IIa badań klinicznych w leczeniu bólu nowotworowego i był w fazie IIb (określenie skuteczności leku) z podwójnie ślepą próbą w celu określenia skuteczności i bezpieczeństwa w leczeniu bólu pooperacyjnego. Badania zostały jednak przerwane [34].

α -Konotoksyna Vc1.1 jest selektywna dla neuronalnego podtypu receptora $\alpha 9\alpha 10$ nAChR szczura. Została zaproponowana jako potencjalny środek przeciwbólowy. Firma Metabolic Pharmaceuticals Ltd. (Australia, od 2009 roku Polynovo Ltd.) wprowadziła peptyd (pod nazwą ACV1) do badań klinicznych w leczeniu bólu neuropatycznego, w tym rwy kulszowej, półpaśca oraz neuropatii cukrzycowej i doszła do badań klinicznych fazy II (określenie skuteczności klinicznej). Wkrótce zostały one zawieszono, ponieważ pojawiły się informacje wskazujące, że Vc1.1 ma niskie powinowactwo do ludzkiego podtypu $\alpha 9\alpha 10$ nAChR. Jednak w innych badaniach stwierdzono, że Vc1.1 hamuje VGCC typu N poprzez receptor kwasu gamma-aminomasłowego ($GABA_B$, ang. *gamma-amino-*

butyric acid) z dziesięciokrotnie większą siłą niż $\alpha 9\alpha 10$ nAChR. Doprowadziło to do ponownego zainteresowania się tą konotoksyną [35].

Na początku XXI wieku firma Cognetix Inc® (Stany Zjednoczone) prowadziła badania kliniczne z wykorzystaniem syntetycznej wersji contulakiny-G (CGX-1160), która selektywnie hamuje receptor neurotensyny I oraz konantokiny-G (CGX-1007), która selektywnie hamuje receptor kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA, ang. *N-methyl-d-aspartic acid*). Pierwszy z produktów, CGX-1160, wykazał obiecujące wyniki we wstępnych badaniach fazy Ib (szeroki margines bezpieczeństwa), został jednak wycofany przed dalszymi etapami badań klinicznych [35].

Z jadu *C. geographus* wyizolowano 16-aminokwasowy peptyd: kontalukin-G. Wykazuje on wysokie podobieństwo do neurotensyny, która jest syntetyzowana w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie moduluje przekaznictwo dopaminergiczne. Lek znalazł się w I fazie (ocena bezpieczeństwa) badań klinicznych, jednak zostały one przerwane. Było to spowodowane zaobserwowaniem, że agoniści receptora dla neurotensyny biorą udział w promocji nowotworzenia w kilku typach raka [36].

W tabeli 1 zamieszczono najistotniejsze informacje dotyczące badań klinicznych z wykorzystaniem konopeptydów w ciągu ostatnich 30 lat.

Tabela 1. Aktualnie prowadzone badania nad konopeptydami oraz fazy ich rozwoju

Nazwa związku	Punkt uchwytu	Gatunek	Faza badań klinicznych
Ω -konotoksyna MVIIA (PRIALT®)	kanały wapniowe typu N	<i>C. magus</i>	zaakceptowany przez FDA
A-konotoksyna VC1.1 (ACV1)	neuronalny receptor nikotynowy dla acetylocholiny	<i>C. victoriae</i>	faza II, przerwana
X-konotoksyna MR1A (XEN 2174)	transporter norepinefryny	<i>C. marmoreus</i>	faza II, przerwana
Contulakin-G (CGX-1160)	(CGX-1160) receptor dla neurotensyny	<i>C. geographus</i>	faza I, wstrzymana
Conantokin-G (CGX-1007)	receptor NR28/NMDA	<i>C. geographus</i>	faza I, przerwana

Źródło: opracowanie własne na podstawie [35, 36].

2.2. Potencjalne działanie przeciwwzimmnicze

Malaria (zimnica) jest chorobą pasożytniczą wywoływaną przez pierwotniaki. Dla człowieka najgroźniejszym jest zarodziec sierpowaty (*Plasmodium falciparum*). Odpowiada on za większość zakażeń wśród mieszkańców krajów tropikalnych i subtropikalnych, zwłaszcza Afryki Subsaharyjskiej, jak i wśród podróżujących w te rejony turystów. Rocznie rozpoznaje się około 200-300 milionów nowych przypadków, z czego około 600 tysięcy chorych umiera [37]. Ta choroba jest szczególnie niebezpieczna dla dzieci do piątego roku życia. Po ukłuciu przez komara sporozycy (inwazyjne postaci zarodźca) są przenoszone do wątroby, skąd – po namnożeniu – trafiają do krwi i zarażają erytrocyty [38].

Większość patologicznych powikłań malarii jest spowodowanych adhezją zainfekowanych zarodźcem erytrocytów do receptorów w układzie naczyniowym. Receptory te są również prawdopodobnym punktem uchwytu dla konotoksyn ślimaka z gatunku *Conus nux*. Po infekcji erytrocytu na jego powierzchni pojawiają się specyficzne domeny adhezyjne zarodźca malarii (peptydy PfEMP-1, *P. falciparum erythrocyte membrane*

protein-1), które umożliwiają adhezję zainfekowanej komórki do receptorów CD36, ICAM-1 (ang. *intercellular adhesion molecule-1*) naczyń śródbłonna i CSA na powierzchni syncytiotrofoblastu łożyska. Padilla i wsp. wykazali, że część frakcji jadu *C. nux* zapobiega *in vitro* adhezji zainfekowanych erytrocytów do śródbłonna naczyniowego i łożyska. Omawiane działanie inhibicyjne wykazują konotoksyny z nadrodziny T, M i O2. Są to jedne z pierwszych badań nad antyadhezyjną, wspomagającą terapią malarii wywołaną przez *P. falciparum*. Obecnie stosowane leki przeciw pasożytnicze nie zapobiegają bowiem trwałej cytoadhezji erytrocytów zakażonych pierwotniakiem, przez co choroba jest często śmiertelna [39].

2.3. Potencjalne działanie przeciwcukrzycowe

Ślimaki *C. geographus* polują na swoje ofiary metodą „sieci”, tzn. otwierają „fałszywe usta”, zamykają w nich ofiarę, a następnie atakują ją jadem. Aby ofiara nie uciekła, ślimaki wydzielają substancje, które wykazują działanie pseudonarkotyzujące i uniemożliwiają ofierze ucieczkę. Wśród tych związków, zwanych *nirvana cabal*, zidentyfikowano konantokinę-G (antagonistę receptora NMDA), kontalukinę-G (agonistę receptora dla neurotensyny) i Lys-konopresynę-G (agonistę receptora dla wazopresyny) [40]. W ramach projektu CONBIOS (*Cone snail toxins as therapeutic agents: Decoding biological mechanisms of conotoxin folding*) z programu „Ludzie”, wdrażającego siódmy program ramowy UE w zakresie badań i rozwoju technologicznego (2007-2013), prowadzono ocenę potencjalnego zastosowania konotoksyn jako substancji o działaniu terapeutycznym. Stwierdzono, że w jadzie stożków *C. geographus* i *C. bullatus* występuje dodatkowa cząsteczka insuliny. Powstała ona w drodze ewolucji, aby ułatwić łapanie ofiar poprzez wywoływanie wstrząsu hipoglikemicznego. Insulina stożków jest wydalana do wody, a następnie wchłaniana przez ryby. W wyniku tego działania u ryb zostaje aktywowany receptor insuliny, co prowadzi do gwałtownego spadku stężenia glukozy we krwi (hipoglikemii) i tym samym utrudnia ofierze poruszanie się. Insulina wyizolowana z jadu stożków (Con-Ins G1) charakteryzowała się wysokim podobieństwem sekwencyjnym z insuliną ryb i ludzi. Jej podobieństwo do insuliny ludzkiej potwierdziła analiza transkrypcyjna i analiza rentgenowska, a badania funkcjonalne wykazały, że pobudza ona ludzki receptor insuliny. Według naukowców insulina zawarta w jadzie stożków może być stosowana do produkcji nowych leków wykorzystywanych w leczeniu cukrzycy [41].

Wang i wsp. badali insulinę (Con-Ins G1) wyizolowaną z *C. geographus* pod kątem wykorzystania w terapii cukrzycy, tzn. skrócenia czasu działania insuliny rekombinowanej. Opracowany przez naukowców rekombinat proinsuliny stożka (Con-ProIns G1) o sile działania 25,9 IU/mg użyto u myszy z cukrzycą normalną oraz indukowaną streptozotocyną. Test glukozy we krwi na czczo i doustny test tolerancji glukozy wykazały, że rekombinowany cI G1 może szybko obniżyć poziom glukozy we krwi u zwierząt, ale przez krótki czas [42].

Innym punktem uchwytu w terapii cukrzycy mogą być kanały potasowe bramkowane napięciem, zwłaszcza $K_v1.7$. Odpowiadają one za wytworzenie sygnałów elektrycznych w komórkach beta trzustki, które – w dalszej kolejności – inicjują wydzielanie insuliny regulowane stężeniem glukozy. Finol-Urdaneta i wsp. badali *in vitro* oraz *in vivo* wpływ konopeptydu o nazwie konkunicyna-S1 (Conk-S1) na uwalnianie insuliny z izolowanych wysp trzustkowych szczurów szczepu *Sprague-Dawley*. Badacze wykazali, że Conk-S1 silnie hamował homotetrameryczne kanały $K_v1.7$, jak również kanały heteromeryczne.

W efekcie badany konopeptyd nasilał *in vivo* stymulowane glukozą wydzielanie insuliny w wyspach trzustkowych, a także wzmagal wydzielanie insuliny i zwiększal tolerancję glukozy [43]. Wyniki tych badań mogal być przydatne w długoterminowym leczeniu cukrzycy typu 2.

2.4. Potencjalne działanie przeciw *Toxoplasma gondii*

Toksoplazmoza to zakaźna choroba pasożytnicza, która rozwija się po zakażeniu pierwotniakiem *Toxoplasma gondii*. Jest on przenoszony na człowieka ze zwierząt domowych (kotów), u których występuje w przewodzie pokarmowym w różnych postaciach rozwojowych. Do zarażenia człowieka dochodzi drogą pokarmową (np. przez spożycie surowego mięsa zawierającego cysty *T. gondii* lub spożycie nieumytych owoców i warzyw zanieczyszczonych odchodami zwierząt), przez łożysko (toksoplazmoza wrodzona) bądź poprzez przetoczenie krwi od zarażonego dawcy [44]. W przypadku toksoplazmozy wrodzonej śmiertelność sięga 10% [45].

U pacjentów z toksoplazmozal nabytal stosuje się leki przeciwpierwotniakowe, głównie pirymetaminę i sulfadiazynę w połączeniu z kwasem foliowym [46]. Nie ma jednak możliwości całkowitego wyleczenia choroby, ponieważ nieznanne są leki działające na cysty tkankowe, które są obecne w tkankach organizmu przez całe życie. Z tego powodu trwalal poszukiwania nad nowymi związkami, które mogal mieć zastosowanie w terapii toksoplazmozy.

De León-Nava i wsp. badali wpływ syntetycznej toksyny cal14.1a (s-cal14.1a) wyizolowanej ze śluzu *C. californicus* na tachyzoitowal postac *T. gondii*. Monowarstwyl komórek HEp-2 byly atakowane tachyzoitami pasożyta przez 2 godziny, a następnle eksponowane (przez 2 i 24 godziny) na wzrastajalac stęzenia s-cal14. Wyniki badań *in vitro* wykazaly, że s-cal14.1a (w stęzeniach mikromolowych) zmniejszal przeżywalnośc pasożytów i hamuje ich inwazję do komórek gospodarza odpowiednio o 50% i 61%. Ponadto proliferacja wewnątrzkomórkowa *T. gondii* znacznie się zmniejszyła, podczas gdy żywotnośc komórek HEp-2 pozostala niezmiennona. Według naukowców konotoksyna s-cal14.1a ma znaczący wpływ na tachyzoity toksoplazmy w ich postaci pozakomórkowej i moze „dosięgnal” pasożytów wewnątrzkomórkowych pomimo naturalnych barier, takich jak błona komórkowa [47].

2.5. Potencjalne działanie przeciwnowotworowe

Właściwoścyl substancjyl zawartych w jadzie ślimaków morskich badano również pod kątem potencjalnego wykorzystania w terapii nowotworów. Badań takich jest jednak znacznie mniej niż w przypadku ślimaków lądowych. Ju i wsp. badali przeciwnowotworowy efekt konotoksyn V114b, Mr3d.1, Mr3e.1, Mr3.8, Tx3a.1, TCP wyizolowanych z jadu *Conus virgo*, *Conus marmoreus* i *Conus textile* w hodowlach komórek raka jajnika (linia ID8). Komórkyl badanej linii inkubowano w obecnoścyl wymienionych peptydów (o stęzeniu w zakresie od 0 do 160 $\mu\text{mol/l}$) i po 72 godzinach oceniano ich żywotnośc. Stwierdzono, że najsilniejszy efekt cytotoksyczny wykazywala konotoksyna Tx3a.1, która w stęzeniu 24 $\mu\text{mol/l}$ spowodowala redukcję żywotnoścyl u 45% komórek. W celu osięgnięcia podobnego efektu stęzenie innych peptydów musialo być większe, np. dla Mr mieścilo się w przedziale od 3,8 $\mu\text{mol/l}$ do 48 $\mu\text{mol/l}$ [48].

3. Substancje bioaktywne izolowane z wydzieliny ślimaków lądowych

Gruczoły ślimaków znajdujące się w jego odnóżach wydzielają dwa rodzaje śluzu: kryptozynę i limozynę. Tylko pierwszy z wymienionych posiada właściwości, które umożliwiają zastosowanie głównie w preparatach do pielęgnacji skóry. Wynika to z faktu, że główną funkcją kryptozyny jest regeneracja tkanek ślimaka uszkodzonych podczas jego poruszania się po terenie [7].

Filtrat śluzu ślimaków jest jasnym płynem o odczynie słabo kwaśnym (pH = 4,8), który zawiera od około 91% wag. do 98% wag. wody oraz liczne związki biologicznie czynne [49]. W filtracie śluzu *C. aspersum* obecne są m.in. białka (1,54 g)⁶, kwas glikolowy (około 1 g), kolagen (0,32 g), witamina C (0,13 g), elastyna (0,092 g), alantoina (0,081 g), witamina E (<0,1 g), kwas hialuronowy (<0,1 g), 13-cis-retinol (<10 µg), witamina B12 (<10 µg), witamina B3 (<10 µg) oraz mikroelementy: Cu (0,504 mg), Ni (0,082 mg) [50]. Skład śluzu jest zmienny i zależy m.in. od gatunku ślimaków oraz miejsca ich występowania [39]. Zawartość białek, węglowodanów i tłuszczów w wydzielinie *Collisella digitalis*, bytującego w strefie przybrzeżnej północno-wschodniego Pacyfiku, wynosi 29,7, 8,1 oraz 0,8% suchej masy. W śluzie *Nucella emarginata*, ślimaka zasiedlającego strefę przybrzeżną Pacyfiku, od Kalifornii do Meksyku, zawartość wymienionych związków wynosi odpowiednio 1,3, 25,4 oraz 0,2% suchej masy [51]. Z kolei w śluzie ślimaków z rodzaju *Nacella*, występujących w wodach przybrzeżnych wokół Antarktydy, zawartość białek, węglowodanów i tłuszczów wynosi 31,1, 12,4 oraz 2,5% suchej masy [52]. W kwestii mikroelementów: analiza filtratu śluzu *Arion subfuscus* wykazała znaczne ilości Zn (średnio 20 mg), Fe i Mn (0,7 mg) oraz mniejsze Cu (0,2 mg), a także brak Ni, obecnego w śluzie *C. aspersum* [53].

3.1. Właściwości śluzu ślimaków lądowych

3.1.1. Działanie regenerujące i ochronne

Wydzielinę lądowych ślimaków muszlowych od lat wykorzystuje się m.in. w kosmetykach. Osoby prowadzące hodowle ślimaków zaobserwowały, że po kontakcie z tą wydzieliną skóra rąk była gładka i miękka, a drobne rany szybko goiły się, nie pozostawiając blizn. Jednak nie każdy gatunek produkuje śluz, który można wykorzystać w tworzeniu produktów pielęgnacyjnych. Najczęściej używana jest wydzielina ślimaków gatunku *C. aspersum* [54, 55]. Pozyskany śluz podlega wstępnie wieloetapowej obróbce technologicznej, w tym oczyszczaniu i standaryzacji. W postaci filtratu trafia do firm produkujących kosmetyki, a w wykazie składników INCI (ang. *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) występuje pod nazwą *snail secretion filtrate* [56].

Stężenie oczyszczonego śluzu w kosmetyku jest zmienne, przy czym najniższe jest w kremach (od 3% do 10%), a najwyższe (do 98%) w koncentratkach (serum). Często wyroby kosmetyczne zawierają dodatkowo inne składniki pielęgnacyjne (np. olejki roślinne, kwas mlekowy), które wzmacniają działanie bioaktywnych składników śluzu. Zwiększenie stężenia śluzu w produkcie pielęgnacyjnym przyczynia się m.in. do poprawy nawilżenia skóry [57]. Uczestniczki badania przeprowadzonego przez Fabi i wsp., o średniej wieku 55 lat, przez 12 tygodni aplikowały rano na skórę twarzy emulsję (zawierającą 8% śluzu *C. aspersum*) a wieczorem – serum (40%). Naukowcy zaobserwowali poprawę stanu skóry w okolicy oczu i ust, tzn. zmniejszenie głębokości zmarszczek

⁶ Wartości odnoszą się do 100 g śluzu.

i wygładzenie skóry utrzymujące się 2 tygodnie po zakończeniu aplikacji [58]. W innym badaniu kobiety (średnia wieku 51 lat) z II i III fototypem skóry aplikowały przez 3 miesiące emulsję zawierającą 8% śluzu *C. aspersum* i 40% serum. Badanie histopatologiczne wykazało, że regularne stosowanie obu preparatów spowodowało zmniejszenie grubości naskórka, stymulowanie angiogenezy, zwiększenie indeksu proliferacyjnego keratynocytów oraz zmniejszenie elastozy w warstwie brodawkowatej skóry [59].

W leczeniu stanów zapalnych skóry spowodowanych promieniowaniem UVB największe zastosowanie może mieć także śluz *Haliothis asinina*, a wydzieliny *Rapana venosa*, *C. aspersum* i *Mytilus galloprovincialis*, zawierające witaminę E, sterole i nienasycone kwasy tłuszczowe, są także wykorzystywane w leczeniu oparzeń [60]. Filtrat śluzu *C. aspersa* wykazywał *in vitro* nie tylko działanie regeneracyjne, ale także ochronne wobec toksycznego działania ozonu. W obrębie linii komórkowej keratynocytów ludzkich HaCaT oraz modeli 2D i 3D ludzkiego naskórka (EpiDerm™ Tissue Model) eksponowanych na działanie ozonu (0,5 µg/ml przez 2 godziny) w obecności wymienionego filtratu (400 µg/ml) nie stwierdzono uszkodzeń oksydacyjnych i wynikającej z nich odpowiedzi prozapalnej. Według badaczy zaobserwowane właściwości regeneracyjne i bioadhezyjne tego filtratu śluzu wynikają z charakterystycznego składu mukopolisacharydów [61].

Ze względu na swoje silne właściwości regenerujące i naprawcze śluz ślimaka może być również stosowany w okresach rekonwalescencji skóry po zabiegach inwazyjnych kosmetycznej estetycznej oraz chirurgii plastycznej [60]. Filtrat śluzu *C. aspersa* (od 4 µg/ml do 400 µg/ml) zawierający niewielkie ilości kwasu glikolowego i alantoiny wykazywał *in vitro* działanie antyapoptotyczne wobec ludzkich i mysich fibroblastów. Ponadto zaobserwowano indukcję proliferacji i migracji komórek na drodze bezpośredniej (poprzez związki obecne w oczyszczonym ekstrakcie), jak i pośredniej (poprzez indukcję uwalniania cytokiny IL-8) [62]. Według Trapella i wsp. zastosowanie śluzu może korzystnie wpływać na proces gojenia się ran [63].

Poniżej scharakteryzowano składniki śluzu ślimaka, które wykazują działanie pielęgnacyjne i ochronne.

Kwas glikolowy (α -hydroksykwas) jest związkiem o małej masie cząsteczkowej i dobrze rozpuszczalnym w wodzie, wskutek czego łatwo przedostaje się do warstwy podstawnej naskórka. Wykazuje działanie złuszczące, dzięki czemu dochodzi do usunięcia zrogowaciałego, martwego naskórka i do proliferacji keratynocytów. W przypadku stosowania preparatów z kwasem glikolowym ma miejsce m.in. odbudowa włókien sprężystych, redukcja przebarwień i zwężenie porów skóry [64, 65].

Alantoina jest heterocykliczną pochodną mocznika. Stymuluje proliferację fibroblastów i wytwarzanie macierzy zewnątrzkomórkowej, co sprawia, że stosuje się ją w preparatach do pielęgnacji skóry z owrzodzeniami i po oparzeniach. Produkty zawierające wysokie stężenie tego związku są uzupełnieniem terapii dermatologicznej u pacjentów z nieprawidłowym/nadmiernym rogowaceniem, np. z łuszczycą. Nie stwierdzono negatywnego wpływu alantoiny na skórę ludzi, tzn. nie powoduje podrażnień ani alergii [66, 67].

Elastyna i kolagen to białka strukturalne. Kolagen jest głównym składnikiem macierzy międzykomórkowej i odpowiada za dużą elastyczność i wytrzymałość skóry. Ze względu na swoje właściwości, nietoksyczność i biogodność preparaty z kolagenem stosowane są m.in. w medycynie estetycznej (jako wypełniacze mające na celu wyrównanie powierzchni skóry w miejscu blizn lub zmarszczek oraz modelowanie owalu twarzy),

kosmetyce (kremy) oraz jako suplementy diety (preparaty na bazie hydrolizatów kolagenu) [68]. Elastyna jest białkiem hydrofobowym, tworzącym sieć rozciągliwych włókien. Wraz z kolagenem odpowiada za elastyczność skóry, ponieważ tworzące ją łańcuchy są odporne na nacisk i rozciąganie. Jej produkcja w organizmie z czasem spowalnia, a po 50. roku życia włókna elastynowe zanikają. Z tego powodu jest przedmiotem zainteresowania przemysłu kosmetycznego. Najczęściej jest dostępna w kremach, balsamach, które mają na celu wygładzenie i ujędrnienie skóry oraz zwiększenie jej elastyczności [69].

Kwas hialuronowy jest przedstawicielem glikozoaminoglikanów, który tworzą naprzemienne jednostki kwasu D-glukuronowego i N-acetylo-D-glukozaminy. Ten nierozgałęziony polisacharyd podtrzymuje integralność istoty międzykomórkowej. Dzięki temu zachowuje ona sprężystość i elastyczność. Szczególną właściwością tego związku jest zdolność do wiązania cząsteczek wody (1 cząsteczka może przyłączyć ponad 200 cząsteczek wody). Kwas hialuronowy ma zastosowanie nie tylko w kosmetyce (produkty o działaniu nawilżającym, łagodzącym i kojącym), medycynie estetycznej (do wypełniania bruzd/zmarszczek i poprawy wolumetrii twarzy), ale także w medycynie. Ponieważ jest składnikiem mazi stawowej, preparaty tego związku podawane są pacjentom z chorobami zwyrodnieniowymi stawów w postaci bezpośrednich iniekcji. Na rynku dostępne są także krople do oczu, łagodzące podrażnienia i nawilżające gałkę oczną (np. w leczeniu zespołu suchego oka) i czopki (stosowane w proktologii w leczeniu chorób odbytu) zawierające kwas hialuronowy [70].

3.1.2. Działanie przeciwnowotworowe

Wiele prac wskazuje, że reaktywne formy tlenu (RFT), generujące tzw. stres oksydacyjny, powodują uszkodzenia makrocząsteczek komórkowych, w tym DNA, białek i lipidów, a tym samym wpływają na transformację nowotworową komórek. W poszukiwaniu leków przeznaczonych do terapii przeciwnowotworowej wykorzystuje się także wydzielinę ślimaków lądowych zawierające szereg silnie działających antyoksydantów, które hamują stres oksydacyjny. Witaminy A (retinol), C (kwas askorbowy) i E (α -tokoferol) zawarte w śluzie ślimaków wykazują działanie antyoksydacyjne, co przejawia się w ich reakcjach z reaktywnymi formami tlenu (RFT) i wolnymi rodnikami powstającymi w komórkach w wyniku peroksydacji lipidów. W rezultacie zostaje zachowana prawidłowa struktura fosfolipidów błon biologicznych i nie dochodzi do peroksydacji kwasów nukleinowych i białek [71].

Ekstrakty wyizolowane ze śluzu, tkanek nogi i skorupy ślimaka *C. aspersum* wykorzystywano m.in. w badaniach z ludzkimi komórkami gruczolakoraka jelita grubego (linia Caco-2). Były one inkubowane w obecności liofilizatów z wymienionych tkanek (od 2,5 μ g/ml do 500 μ g/ml) przez 24 i 72 godziny. Wrażliwość komórek oceniano w teście żywotności z użyciem bromku tetrazoliowego. Matusiewicz i wsp. zaobserwowali spadek żywotności linii komórkowej po zastosowaniu ekstraktów z liofilizowanego śluzu i tkanek stopy *C. aspersum*. Omawiane działanie przeciwnowotworowe może być związane z zawartością niektórych białek i peptydów, odpowiednią proporcją aminokwasów egzogennych do endogennych oraz obecnością niektórych pierwiastków (Cu, Ca, Zn i Se) [72]. Ekstrakty ze śluzu ślimaka afrykańskiego *L. fulica* zmniejszyły żywotność komórek raka piersi (linia MCF-7) [73]. El Ouar i wsp. badali działanie cytotoksyczne wodnego ekstraktu z *C. aspersum* (0,1% i 1%) na linię komórkową raka piersi Hs578T, a także na ekspresję czynnika martwicy nowotworu α (TNF α), NF- κ B oraz genów

supresorowych nowotworów P53 i PTEN. Stwierdzili, że wymieniony ekstrakt zmniejszył żywotność komórek nowotworowych i znacząco stymulował ekspresję TNF α . Spowodował także inhibicję NF- κ B i PTEN (po 8 i 24 godzinach inkubacji) i ekspresji P53 (po 4, 8 i 24 godzinach), ale tylko wtedy, gdy użyto wyższego stężenia ekstraktu [74].

W ostatnich latach prowadzone są badania nad zastosowaniem w medycynie wydzielin ślimaków bezmuskulowych. Badania nad wpływem śluzu śliników i pomrowów na keratynocyty prowadzone są na Uniwersytecie Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Śluz pomrowa wielkiego (*Limax maximus*) i ślinika wielkiego (*Arion rufus*) powoduje *in vitro* inhibicję komórek czerniaka złośliwego (linia A-375). Zauważono znaczący statystycznie spadek przeżywalności komórek melanomy, który wyniósł 17% (w przypadku śluzu *L. maximus*) i 22% (śluz *A. rufus*) [75].

3.1.3. Działanie przeciwdrobnoustrojowe

Śluz ślimaków lądowych jest bogatym źródłem peptydów i białek o szerokim spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego. Frakcja śluzu ślimaka brunatnego *C. aspersa* o masie między 30 a 100 kDa ma działanie antybakteryjne na kilka szczepów *Pseudomonas aeruginosa* [76]. Takie własności wobec tych samych bakterii wykazywały białka o masach 37,4 kDa, 18,6 kDa i 17,5 kDa wyizolowane z wydzielin *C. aspersum* [77]. Głównym makrocząsteczkowym składnikiem śluzu są mucyny. Jest to grupa glikozylowanych białek o dużej masie cząsteczkowej, które nadają lepkość wydzielinom zwierząt. Są wytwarzane w komórkach nabłonkowych, a ich konsystencja przypomina żel. Dzięki temu nadają wydzielinom charakterystyczną, śluzowatą konsystencję [7]. W filtracie śluzu stwierdzono także obecność glikoprotein o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych: achacyny [78], achatyny CRP (ang. *C-reactive protein*) [79], mitamycyny AF [80] oraz hemocyjaniny β c-HaH [81].

Achacyna wyizolowana z filtratu śluzu *L. fulica* wykazała aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* oraz opornego na metycylinę *Staphylococcus aureus* (MRSA, ang. *methicillin-resistant S. aureus*) [78]. Mitamycyna AF wyizolowana ze śluzu *L. fulica* jest peptydem bogatym w cysteinę, który posiada silną aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko bakteriom Gram-ujemnym i Gram-dodatnim oraz szczepowi grzybów *Candida albicans* [80]. Achacyna CRP pozyskana z filtratu śluzu *L. fulica* wykazała wysoką aktywność przeciwbakteryjną przeciwko *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus epidermidis* i *Pantoea ananatis*, a także niższą wobec *Bacillus subtilis* i *Salmonella typhimurium* [79]. Nowe peptydy wykazujące działanie przeciwbakteryjne wobec szczepów bakterii Gram-ujemnych (*Pseudomonas aureofaciens* i *E. coli*) i Gram-dodatnich (*Brevibacillus laterosporus*) oraz bakterii beztlenowych *Clostridium perfringens* wykryto również w śluzie *C. aspersa* [82]. Wykazano, że wszystkie frakcje peptydowe miały działanie przeciwbakteryjne wobec *B. laterosporus*, frakcja o masach w przedziale od 10 kDa do 30 kDa wobec *E. coli*, frakcja o masach <20 kDa wobec *P. aureofaciens*, a te o masach >20 kDa – wobec *C. perfringens*.

Wyniki opisane w patencie pt. „Sposób izolowania śluzu ślimaka, kompozycja i zastosowanie śluzu ślimaka *L. maximus*” pokazały, że wydzielin *L. maximus* w stężeniu 2 mg/ml hamuje przyrost bakterii *Salmonella typhimurium* o 59%, a *S. enteritidis* o 35%. W doświadczeniu stosowano śluz (2 mg/ml), który nanoszono na płytki z podłożem agarowym, zawierające *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *E. coli* oraz *S. aureus*, i inkubowano przez 22 godziny w 37°C [83].

4. Podsumowanie

Od starożytności śluz ślimaków lądowych był wykorzystywany przez człowieka do łagodzenia oparzeń i łagodzenia bólu towarzyszącego ranom. Od końca XX wieku wydzielinę tych organizmów z powodzeniem wykorzystuje się w kosmetyce. Nie oznacza to, że poznano już wszystkie możliwe zastosowania zarówno śluzu, jak i substancji izolowanych z wydzielin tych stworzeń.

Ze względu na dużą liczbę i różnorodność substancji bioaktywnych zawartych w wydzielinach ślimaków nadal prowadzone są wielokierunkowe badania dotyczące wykorzystania tego naturalnego produktu. Do chwili obecnej naukowcy wyizolowali i zbadali pod kątem potencjalnego zastosowania w medycynie zaledwie niewielką część tych związków. Jeden z nich – ω -konotoksyna – przeszedł pomyślnie wszystkie etapy badań klinicznych, został zarejestrowany i jest dostępny na rynku jako lek (Prialt®). W przypadku innych badania kliniczne zostały przerwane albo są kontynuowane. Jednak wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wskazują, że wyizolowane ze śluzu nowe peptydy o aktywności przeciwdrobnoustrojowej mogą w przyszłości stanowić podstawę przy opracowywaniu nowych leków przeznaczonych do terapii zakażeń bakteryjnych.

Literatura

1. Strong E., Schrödl M., Parkhaev P., Nützel A., Kano Y., Kaim A., Hausdorf B., Rocroi J., Bouchet P., *Revised classification, nomenclator and typification of gastropod and monoplacophoran families*, *Malacologia*, 61, 2017, s. 1-526.
2. Pyron M., Brown K.M., *Introduction to mollusca and the class gastropoda*, [w:] Thorp J.H., Rogers D.Ch. (red.), *Thorp and Covich's freshwater invertebrates*, t. 1: *Ecology and general biology*, fourth edition, Academic Press/Elsevier, Amsterdam 2015, s. 381-421.
3. Barker G.M., *Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology*, [w:] Barker G.M. (red.), *The biology of terrestrial molluscs*, CAB International, New York 2001, s. 1-146.
4. Wiktor A., Riedel A., *Gastropoda terrestria. Ślimaki lądowe*, [w:] Głowaciński Z. (red.), *Czerwona lista zwierząt ginących i zagrożonych w Polsce*, Instytut Ochrony Przyrody PAN, Kraków 2002, s. 27-33.
5. <https://www.medianauka.pl/slimaki> [data dostępu: 4.08.2023].
6. <https://www.invasivespeciesinfo.gov/terrestrial/invertebrates/giant-african-snail> [data dostępu: 4.08.2023].
7. McDermott M., Cerullo A.R., Parziale J., Achrak E., Sultana S., Ferd J., Samad S., Deng W., Braunschweig A.B., Holford M., *Advancing discovery of snail mucins function and application*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 2021, s.1-9.
8. https://eol.org/pages/2366/articles?locale_code=pl [data dostępu: 4.08.2023].
9. Voultziadou E., *Therapeutic properties and uses of marine invertebrates in the ancient Greek world and early Byzantium*, *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 2010, s. 237-247.
10. Ponte G., Modica M.V., *Salivary glands in predatory mollusks: Evolutionary considerations*, *Frontiers in Physiology*, 8, 2017, s. 1-8.
11. Turner A.H., Craik D.J., Kaas Q., Schroeder C.I., *Bioactive compounds isolated from neglected predatory marine gastropods*, *Marine Drugs*, 16, 2018, s. 1-20.
12. Lopez-Vera E., Heimer de la Cotera E.P., Maillou M., Riesgo-Escovar J.R., Olivera B.M., Aguilar M.B., *A novel structural class of toxins: The methionine-rich peptides from the venoms of Turrid marine snails (Mollusca, Conoidea)*, *Toxicon*, 43, 2004, s. 365-374.
13. Watkins M., Hillyard D.R., Olivera B.M., *Genes expressed in a turrid venom duct: divergence and similarity to conotoxins*, *Journal of Molecular Evolution*, 62, 2006, s. 247-256.

14. Omega C.A., Carpio L.D., Imperial J.S., Daly N.L., Gajewiak J., Flores M.S., Espino S.S., Christensen S., Filchakova O.M., Lopez-Vera E., Raghuraman S., Olivera B.M., Concepcion G.P., *Structure and biological activity of a turriptide from Unedogemmula bisaya venom*, *Biochemistry*, 56, 2017, s. 6051-6060.
15. Holford M., Puillandre N., Terryn Y., Cruaud C., Olivera B., Bouchet P., *Evolution of the toxoglossa venom apparatus as inferred by molecular phylogeny of the Terebridae*, *Molecular Biology and Evolution*, 26, 2009, s. 15-25.
16. Gorson J., Ramrattan G., Verdes A., Wright E.M., Kantor Y., Rajaram Srinivasan R., Musunuri R., Packer D., Albano G., Qiu W.G., Holford M., *Molecular diversity and gene evolution of the venom arsenal of Terebridae predatory marine snails*, *Genome Biology and Evolution*, 7, 2015, s. 1761-1778.
17. Imperial J.S., Watkins M., Chen P., Hillyard D.R., Cruz L.J., Olivera B.M., *The augertoxins: Biochemical characterization of venom components from the toxoglossate gastropod Terebra subulate*, *Toxicon*, 42, 2003, s. 391-398.
18. Moon J., Gorson J., Wright M.E., Yee L., Khawaja S., Shin H.Y., Karma Y., Musunuri R.L., Yun M., Holford M., *Characterization and recombinant expression of terebrid venom peptide from Terebra guttata*, *Toxins (Basel)*, 8, 2016, s. 1-12.
19. Imperial J.S., Kantor Y., Watkins M., Heralde F.M. 3rd, Stevenson B., Chen P., Hansson K., Stenflo J., Ownby J.P., Bouchet P., Olivero B.M., *Venomous auger snail Hastula (Impages) hectica (Linnaeus, 1758): Molecular phylogeny, foregut anatomy and comparative toxinology*, *Journal of Experimental Zoology. Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 308, 2007, s. 744-756.
20. Kendel Y., Melaun C., Kurz A., Nicke A., Peigneur S., Tytgat J., Wunder C., Mebs D., Kaufenstein S., *Venomous secretions from marine snails of the Terebridae family target acetylcholine receptors*, *Toxins (Basel)*, 5, 2016, s. 1043-1050.
21. Gao B., Peng C., Yang J., Yi Y., Zhang J., Shi Q., *Cone snails: a big store of conotoxins for novel drug discovery*, *Toxins*, 9, 2017, s. 1-18.
22. Mansbach R.A., Travers T., McMahon B.H., Fair J.M., Gnanakaran S., *Snails in silico: a review of computational studies on the conopeptides*, *Marine Drugs*, 17(45), 2019, s. 1-34.
23. Becker S., Terlau H., *Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(1), 2008, s. 1-9.
24. Jin A.-H., Muttenthaler M., Dutertre S., Himaya S.W.A., Kaas Q., Craik D.J., Lewis R.J., Alewood P.F., *Conotoxins: chemistry and biology*, *Chemical Reviews*, 119, 2019, s. 11510-11549.
25. Olivera B.M., *Conus venom peptides, receptor and ion channel targets, and drug design: 50 million years of neuropharmacology*, *Molecular Biology of the Cell*, 8, 1997, s. 2101-2109.
26. Safavi-Hemami H., Brogan S.E., Olivera B.M., *Pain therapeutics from cone snail venoms: From ziconotide to novel non-opioid pathways*, *Journal of Proteomics*, 190, 2019, s. 12-20.
27. Bowersox S.S., Luther R., *Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of Conus magus*, *Toxicon*, 36, 1998, s. 1651-1658.
28. Janiec R., Cegięła U., Pytlik M., *Analog ω-konopeptydu – zykonytyd*, [w:] Janiec W. (red.), *Kompendium farmakologii*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2021, s. 164.
29. European public assessment report summary for the public, PRIALT (ziconotide), European Medicines Agency, 2014, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/prialt> [data dostępu: 10.07.2023].
30. www.rcsb.org/3d-sequence/7MIX?assemblyId=1 [data dostępu: 15.02.2023].
31. Kolosov A., Aurini L., Williams E.D., Cooke I., Goddchild C.S., *Intravenous injection of leconotide, an omega conotoxin: synergistic antihyperalgesic effects with morphine in a rat model of bone cancer pain*, *Pain Medicine*, 12, 2011, s. 923-941.

32. Smallwood T.B., Clark R.J., *Advances in venom peptide drug discovery: where are we at and where are we heading?* Expert Opinion on Drug Discovery, 16, 2021, s. 1163-1173.
33. Brust A., Palant E., Croker D.E., Colless B., Drinkwater R., Patterson B., Schroeder C.I., Wilson D., Nielsen C.K., Smith M.T., Alewood D., Alewood P.F., Lewis R.J., *χ -Conopeptide pharmacophore development: toward a novel class of norepinephrine transporter inhibitor (Xen2174) for pain*, Journal of Medicinal Chemistry, 52, 2009, s. 6991-7002.
34. Okkerse P., Hay J.L., Sitsen E., Dahan A., Klaassen E., Houghton W., Groeneweld G.J., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intrathecally administered Xen2174, a synthetic conopeptide with norepinephrine reuptake inhibitor and analgesic properties*, British Journal of Clinical Pharmacology, 83, 2017, s. 751-763.
35. Turner A., Kaas Q., Craik D.J., *Hormone-like conopeptides -new tools for pharmaceutical design*, RSC Medicinal Chemistry Journal, 11, 2020, s. 1235-1251.
36. Schroeder C.I., Craik D.J., *Therapeutic potential of conopeptides*, Future Medicinal Chemistry, 4, 2012, s. 1243-1255.
37. WHO, *World malaria report 2019*, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria-2019> [data dostępu: 15.04.2023].
38. Garrido-Cardenas J.A., González-Cerón L., Manzano-Agugliaro F., Mesa-Valle C., *Plasmodium genomics: an approach for learning about and ending human malaria*, Parasitology Research, 118, 2019, s. 1-27.
39. Padilla A., Dovell S., Chesnokov O., Hoggard M., Oleinikov A.V., Mari F., *Conus venom fractions inhibit the adhesion of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains to the host vascular receptors*, Journal of Proteomics, 234, 2021, s. 1-11.
40. Robinson S.D., Safavi-Hemami H., *Insulin as a weapon*, Toxicicon, 2016, 123, s. 56-61.
41. Final Raport Summary – CONBIOS, *Cone snail toxins as therapeutic agents: decoding biological mechanisms of conotoxin folding*, 2017, <https://cordis.europa.eu/project/id/330486/reporting> [data dostępu: 15.02.2023].
42. Wang C., Geng Z., Li P., Li Q., Luo J., Li Y., Sui C., *Prokaryotic expression and hypoglycemic activity determination of insulin G1 from Conus geographus*, Chinese Journal of Biotechnology, 35, 2019, s. 505-512.
43. Finol-Urdaneta R.K., Remedi M.S., Raasch W., Becker S., *Block of Kv1.7 potassium currents increases glucose-stimulated insulin secretion*, EMBO Molecular Medicine, 4, 2012, s. 424-434.
44. Carruthers V., Boothroyd J.C., *Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion*, Current Opinion in Microbiology, 10, 2007, s. 83-89.
45. Montoya J.G., Liesenfeld O., *Toxoplasmosis*, Lancet, 363, 2004, s. 1965-1976.
46. Villena I., Aubert D., Leroux B., Dupouy D., Talmud M., Chemla C., Trenque T., Schmit G., Quereux C., Guenounou M., Pluot M., Bonhomme A., Pinon J.M., (Reims Toxoplasmosis Group), *Pyrimethamine-sulfadoxine treatment of congenital toxoplasmosis: follow-up of 78 cases between 1980 and 1997. Reims Toxoplasmosis Group*, Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 30, 1998, s. 295-300.
47. De Leon-Nava M.A., Romero-Nunez E., Luna-Nophal A., Bernaldez-Sarabia J., Sacnhez-Campos L.N., Licea-Navarro A.F., Morales-Montor J., Muniz-Hernandez S., *In vitro effect of the synthetic cal14.1a conotoxin, derived from Conus californicus, on the human parasite Toxoplasma gondii*, Marine Drugs, 14, 2016, s. 1-12.
48. Ju S., Zhang Y., Guo X., Yan Q., Liu S., Ma B., Zhang M., Bao J., Luo S., Fu Y., *Anti-ovarian cancer conotoxins identified from Conus venom*, Molecules, 2022, 19, s. 1-15.
49. Cilia G., Fratini F., *Antimicrobial properties of terrestrial snail and slug Mucus*, Journal of Complementary and Integrative Medicine, 15, 2018, s. 1-10.
50. Gugliandolo E., Cordaro M., Fusco R., Peritore A.F., Siracusa R., Genovese T., D'Amico R., Impellizzeri D., Di Paola R., Cuzzocrea S., Crupi R., *Protective effect of snail secretion filtrate against ethanol-induced gastric ulcer in mice*, Scientific Reports, 11, 2021, s. 1-12.

51. Davies M.S., Hawkins S.J., *Mucus from marine molluscs*, [w:] Blaxter J.H.S., Southward A.J., Tyler P.A. (red.), *Advances in marine biology*, t. 34, Academic Press, 1998, s. 1-71.
52. Peck L.S., Prothero-Thomas E., Hough N., *Pedal mucus production by the antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908)*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 174, 1993, s. 177-192.
53. Werneke S.W., Swann C., Farquharson L.A., Hamilton K.S., Smith A.M., *The role of metals in molluscan adhesive gels*, *The Journal of Experimental Biology*, 210, 2007, s. 2137-2145.
54. Kusy J., Masłowska A., Januś E., *Ślimak w kuchni i w salonie urody*, [w:] Babicz M., Kropiwić-Domańska K. (red.), *Wybrane zagadnienia z zakresu produkcji surowców, żywności i kosmetyków*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, Lublin 2021, s. 88-95.
55. <https://www.transparencymarketresearch.com/snail-beauty-products-market.html> [data dostępu: 10.07.2023].
56. Wargala E., Zalewska A., Sławska M., Kot I., *Snail mucus as an innovative ingredient used in the cosmetology and medical industry*, *Aesthetic Cosmetology and Medicine*, 12, 2023, s. 45-49.
57. Laneri S., Di Lorenzo R., Sacchi A., Dini I., *Dosage of bioactive molecules in the nutricosmeceutical *Helix aspersa* Muller mucus and formulation of new cosmetic cream with moisturizing effect*, *Natural Product Communications*, 14, 2019, s. 1-7.
58. Fabi S.G., Cohen J.L., Peterson J.D., Kiripolsky M.G., Goldman M.P., *The effects of filtrate of the secretion of the *Cryptomphalus Aspersa* on photoaged skin*, *Journal of Drugs in Dermatology*, 12, 2013, s. 453-457.
59. Tribo-Boixareu M.J., Parrado-Romero C., Rais B., Reyes E., Vitale-Villarejo M.A., Gonzalez S., *Clinical and histological efficacy of a secretion of the mollusk *Cryptomphalus aspersa* in the treatment of cutaneous photoaging*, *Cosmetic Dermatology*, 22, 2009, s. 247-252.
60. Dhiman V., Pant D., *Human health and snails*, *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 42, 2021, s. 211-235.
61. Gentili V., Bortolotti D., Benedusi M., Alogna A., Fantinati A., Guiotto A., Turrin G., Cervellati C., Trapella C., Rizzo R., Valacchi G., *HelixComplex snail mucus as a potential technology against O₃ induced skin damage*, *PLoS One*, 15, 2020, s. 1-13.
62. Deng T., Gao D., Song X., Zhou Z., Zhou L., Tao M., Jiang Z., Yang L., Luo L., Zhou A., Hu L., Qiu H., Wu M., *A natural biological adhesive from snail mucus for wound repair*, *Nature Communications*, 14, 2023, s. 1-18.
63. Trapella C., Rizzo R., Gallo S., Alogna A., Bortolotti D., Casciano F., Zauli G., Secchiero P., Voltan R., *HelixComplex snail mucus exhibits pro-survival, proliferative and promigration effects on mammalian fibroblasts*, *Nature (Scientific Report)*, 8, 2018, s. 1-10.
64. Sharad J., *Glycolic acid peel therapy – a current review*, *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6, 2013, s. 281-288.
65. Kapuścińska A., Nowak I., *Use of organic acids in acne and skin discolorations therapy*, *Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online), 69, 2015, s. 374-383.
66. Nishinami S., Yoshizawa S., Arakawa T., Shiraki K., *Allantoin and hydantoin as new protein aggregation suppressors*, *International Journal Of Biological Macromolecules*, 114, 2018, s. 497-503.
67. Becker L.C., Bergfeld W.F., Belsito D.V., Klaassen C.D., Marks Jr J.G., Shank R.C., Slaga T.J., Snyder P.W., Alan Andersen F., *Final report of the safety assessment of allantoin and its related complexes*, *International Journal of Toxicology*, 29, 2010, s. 84-97.
68. Żelazczyk D., Waszkielewicz A., Marona H., *Kolagen – struktura oraz zastosowanie w kosmologii i medycynie*, *Estetologia Medyczna I Kosmologia*, 2, 2012, s. 14-20.

69. Trębacz H., Barzycka A., *Mechanical properties and functions of elastin: An overview*, *Biomolecules*, 13, 2023, s. 1-13.
70. Salbach J., Rachner T.D., Rauner M., Hempel U., Anderegg U., Franz S., Simon J.C., Hofbauer L.C., *Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone*, *Journal of Molecular Medicine*, 90, 2012, s. 625-635.
71. Didier A.J., Stiene J., Fang L., Watkins D., Dworkin L.D., Creeden J.F., *Antioxidant and anti-tumor effects of dietary vitamins A, C, and E*, *Antioxidants (Basel)*, 12, 2023, s. 1-26.
72. Matusiewicz M., Kosieradzka I., Niemiec T., Grodzik M., Antushevich H., Strojny B., Gołębiewska M., *In vitro influence of extracts from snail Helix aspersa müller on the colon cancer cell line Caco-2*, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2018, s. 1-23.
73. Ekobon T., Thongararm P., Roytrakul S., Meesuk L., Chumnanpuen P., *Prediction of anticancer peptides against MCF-7 breast cancer cells from the peptidomes of Achatina fulica mucus fractions*, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 2016, s. 49-57.
74. El Ouar I., Braicu C., Naimi D., Irimie A., Berindan-Neagoe I., *Effect of Helix aspersa extract on TNF α , NF- κ B and some tumor suppressor genes in breast cancer cell line Hs578T*, *Pharmacognosy Magazine*, 13, 2017, s. 281-285.
75. Leśków A., Tarnowska M., Szczuka I., Diakowska D., *The effect of biologically active compounds in the mucus of slugs Limax maximus and Arion rufus on human skin cells*, *Nature (Scientific Report)*, 11, 2021, s. 1-9.
76. Pitt S., Graham M.A., Dedi C.G., Taylor-Harris P.M., Gunn A., *Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail Helix aspersa*, *British Journal of Biomedical Science*, 72, 2015, s.174–181.
77. Pitt S., Hawthorne J.A., Garcia-Maya M., Alexandrovich A., Symonds R.C., Gunn A., *Identification and characterisation of anti-Pseudomonas aeruginosa proteins in mucus of the brown garden snail, Cornu aspersum*, *British Journal of Biomedical Science*, 76, 2019, s. 129-136.
78. Ehara T., Kitajima S., Kanzawa N., Tamiya T., Tsuchiya T., *Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity*, *FEBS Letters*, 531, 2002, s. 509-512.
79. Mukherjee S., Barman S., Mandal N.C., Bhattacharya S., *Anti-bacterial activity of Achatina CRP and its mechanism of action*, *Indian Journal of Experimental Biology*, 52, 2014, s. 692-704.
80. Zhong J., Wang W., Yang X., Yan X., Liu R., *A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of Achatina fulica*, *Peptides*, 39, 2013, s. 1-5.
81. Dolashka P., Dolashki A., Van Beeumen J., Floetenmeyer M., Velkova L., Stevanovic S., Voelter W., *Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from Helix and Rapana Snails*, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17, 2016, s. 263-270.
82. Dolashki A., Velkova L., Daskalova E., Zheleva N., Topalova Y., Atanasov V., Voelter W., Dolashka P., *Antimicrobial activities of different fractions from mucus of the garden snail Cornu aspersum*, *Biomedicines*, 8, 2020, s. 1-17.
83. Całkoosiński I., Gamian A., Małolepsza-Jarmołowska K., Leśków A., Gostomska-Pampuch K., Rypuła K., Kumala A., opis patentowy: *Sposób izolowania śluzu ślimaka, kompozycja i zastosowanie śluzu ślimaka Limax maximus*, PL 234592 B1, nr zgłoszenia: 413884, data zgłoszenia: 9.09.2015.

Obecne i potencjalne zastosowanie wydzielin ślimaków oraz izolowanych z nich substancji bioaktywnych w medycynie i kosmetyce

Streszczenie

Ze względu na swoje bogate właściwości odżywcze i naprawcze śluz ślimaków od setek lat był stosowany przez człowieka w pielęgnacji i leczeniu uszkodzeń skóry. W ostatnich dziesięcioleciach przedmiotem szczególnego zainteresowania naukowców są zwłaszcza peptydy zawarte w wydzielinach ślimaków, zarówno lądowych, jak i morskich. Ze względu na fakt, że często są naturalnymi ligandami wielu receptorów i enzymów u ludzi – są one traktowane jako wiodące cząsteczki przy poszukiwaniu nowych leków. Liczne prace doświadczalne wskazują, że substancje izolowane ze śluzu wykazują aktywność biologiczną, co oznacza, że faktycznie mogą mieć zastosowanie w projektowaniu nowych leków.

W pracy przedstawiono informacje na temat aktywności biologicznej składników śluzu i wydzielin ślimaków zawarte w dostępnej literaturze polskiej i anglojęzycznej. Dokładnie omówiono potencjalne działanie przeciwalaryczne, przeciwcukrzycowe, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwnowotworowe tych substancji. Szczególną uwagę zwrócono na konotoksyny izolowane z jadu ślimaków morskich i przedstawiono postępy prac przy projektowaniu nowych leków opartych na tej grupie związków.

Słowa kluczowe: konotoksyny, wydzielin, ślimaki, substancje bioaktywne

Current and potential use of snail secretions and bioactive substances isolated from them in medicine and cosmetics

Abstract

From hundreds of years, snails mucus, due to its rich nutritional and repairing properties, was used by humans in cosmetics and treatment of damaged skin. In the latest decades scientist are especially interested in peptides contained in snail secretions, both terrestrial and marine. Because they are often natural ligands for a wide spectrum of human receptors and enzymes, they are treated like leading molecules in searching for new drugs. Many clinical trials indicate that compounds isolated from mucus might have biological activity. This indicates that there is a possibility that these mucus may contain useful compounds for the design of new drugs. This article presents information about the biological activity of snail mucus ingredients that are mentioned in both the Polish and English literature. Particular attention was paid to conotoxins isolated from marine snails and to progress in the design of drugs based on this group of compounds. The potential antimalarial, antidiabetes, antimicrobial and even anticancer activity of this substances has been thoroughly discussed.

Keywords: conotoxins, snails, mucus, potential

Stan badań interdyscyplinarnych zmienności składu pierwiastkowego i izotopowego drzewostanów sosny zwyczajnej w województwie śląskim i opolskim

1. Wprowadzenie

Systematyczne badania zapisu zmian środowiska w archiwach izotopowych, jakimi są listowie oraz roczne przyrosty drzew rosnących w województwach śląskim i opolskim, prowadzone od 2011 roku w Instytucie Fizyki – CND Politechniki Śląskiej we współpracy z Wydziałem Leśnym Uniwersytetu Rolniczego, z Wydziałem Nauk o Ziemi Uniwersytetu Śląskiego oraz z Wydziałem Geologii Université de Liège w Belgii, pozwalają na wszechstronną analizę wpływu zmian klimatu oraz przemysłowej działalności człowieka na środowisko od pierwszych dekad XX wieku do współczesności [1-32]. Badania dotyczą zarówno okresu postindustrialnego, jak i okresu rozwoju przemysłu, a także wdrażania prawa UE w zakresie jakości powietrza do prawa polskiego. Drzewa wykorzystywane są w biomonitoringu, zarówno w skali krótkookresowej (sezonowe, śródroczne analizy), jak i wieloletnich (z okresu ostatniego stulecia). Od ponad dziesięciu lat badania izotopowe w Instytucie Fizyki – CND Politechniki Śląskiej kompleksowo oceniają wpływ zanieczyszczeń biosfery na zmiany szerokości rocznych przyrostów drzew oraz ich skład izotopowy i pierwiastkowy na obszarze dwóch województw: śląskiego i opolskiego. Badania prowadzone są m.in. w pobliżu Gliwic, Katowic, Dąbrowy Górniczej, Kędzierzyna-Koźła, Olesna, Rud Raciborskich, Tychów, Mikołowa, Wyrów, Łazisk Górnych, Blachowni, Rudna, Kobióra, Pszczyny, Chorzowa, Zadolą, Ochojca, Podlesia, Ledzin. Obok tworzenia chronologii (dendrochronologii i chronologii izotopowych) niewątpliwie ciekawym aspektem badań jest prowadzona od kilku lat analiza WUE (ang. *water use efficiency*), czyli zmian w wykorzystaniu wody przez roślinę oraz zmian składu izotopowego tlenu i węgla z wykorzystaniem różnych modeli pozwalających na określanie frakcjonowania izotopów. Stosowanie modelu *dual isotopes* umożliwia m.in. śledzenie z roczną rozdzielczością reakcji rośliny na zmiany środowiska – zmienności przewodności aparatów szparkowych i zmiany tempa fotosyntezy z roczną rozdzielczością. Mimo że ta metoda posiada wiele ograniczeń, pozwala na wskazanie podobieństw i różnic w fizjologii drzewostanów sosnowych rosnących w pobliżu różnych źródeł emisji zanieczyszczeń. Drzewa stanowią doskonałe archiwum zmian klimatycznych oraz efektu antropogenicznego (wzrost emisji oraz immisji zanieczyszczeń). Warunki środowiska, w którym wzrasta drzewo, zapisywane są zarówno w szerokości słoików drzew, ich składzie izotopowym i pierwiastkowym, jak i w składzie geochemicznym listowia.

¹ barbara.sensula@polsl.pl, Zakład Geochronologii i Badań Izotopowych Środowiska, Instytut Fizyki – Centrum Naukowo-Dydaktyczne, Politechnika Śląska, ul. Konarskiego 22B, 44-100 Gliwice, <https://fizyka.polsl.pl/pl/o-instytucie/zaklady/zaklad-geochronologii-i-badan-izotopowych-srodowiska>.

2. Zmiany składu izotopowego węgla i tlenu w rocznych przyrostach drzew w świetle zmian czynników klimatycznych i działalności człowieka

Śląsk jest jednym z najbardziej uprzemysłowionych regionów Polski. Jego potencjał gospodarczy był i jest kształtowany przede wszystkim poprzez przemysł i działalność usługową, a także, w znikomym stopniu, przez produkcję rolną. Funkcjonujące na Śląsku przedsiębiorstwa mają strategiczne znaczenie dla regionu i kraju. W ostatnich dekadach w wielu zakładach przemysłowych przeprowadzono działania mające na celu poprawę sprawności urządzeń wytwórczych oraz przeciwdziałanie zanieczyszczeniu środowiska na Śląsku. Tereny leśne stanowią zabezpieczenie dla mieszkańców na wypadek awarii w którymś z zakładów produkcyjnych. Wówczas chmura szkodliwych substancji zostaje zatrzymana w obszarach leśnych.

Wzrost ilości zanieczyszczeń emitowanych do atmosfery poważnie pogorszył stan zdrowia drzewostanów w wielu regionach Polski. Południowa i południowo-zachodnia część Polski należy do regionów o najwyższym poziomie zanieczyszczenia powietrza w Europie Środkowej. Szybki rozwój przemysłu oraz miejskich aglomeracji w ciągu ostatniego półwiecza spowodował znaczne zmiany w środowisku naturalnym, a w szczególności kompleksach leśnych. Emisje przemysłowe gazów oraz zanieczyszczenie powietrza stały się poważnym problemem o szerokim zasięgu oddziaływania.

W świetle norm dotyczących emisji gazów cieplarnianych i ograniczeń narzucanych na poszczególne kraje, zarówno Unii Europejskiej, jak i całego świata, badania izotopowe rocznych przyrostów drzew można wykorzystać do monitoringu składowej emisyjnej w atmosferze. Działalność naukowa dla lepszego zrozumienia przyczyn zmian klimatu oraz próba znalezienia odpowiedzi na pytania dotyczące ich konsekwencji w świetle emisji zanieczyszczeń oraz zmian stężenia CO₂ w atmosferze staje się tematem wielu dyskusji – nie tylko uczonych, ale również debat politycznych. Wymagania Unii Europejskiej dotyczące oceny i zarządzania jakością powietrza atmosferycznego określone zostały w dyrektywie ramowej 96/62/EC i dyrektywach pochodnych, tworząc ramy do ustanawiania kryteriów jakości powietrza oraz monitorowania i prowadzenia oceny jakości powietrza w krajach członkowskich, jak również nakładając obowiązek tworzenia planów i programów naprawczych dla obszarów, na których jakość powietrza nie odpowiada przyjętym kryteriom. Ochrona powietrza, zgodnie z art. 85 ustawy Prawo Ochrony Środowiska, polega na zapewnieniu jak najlepszej jego jakości, w szczególności poprzez utrzymanie poziomów substancji w powietrzu poniżej dopuszczalnych dla nich poziomów lub co najmniej na tych poziomach, a także poprzez zmniejszanie poziomów substancji w powietrzu co najmniej do dopuszczalnych, gdy nie są one utrzymane.

Czynniki stresogenne środowiska (abiotyczne i biotyczne) wpływają na rozwój roślin. Rozmieszczenie geograficzne roślin, skład gatunkowy, zróżnicowanie i rozwój flory mogą odzwierciedlać i wyznaczać zarówno strefy, w których zmieniają się warunki klimatyczne, jak i strefy o zróżnicowanym stopniu zanieczyszczenia środowiska. Bioindykatory, czyli rośliny wskaźnikowe, reagują na zmiany warunków środowiska poprzez osłabianie wzrostu oraz zanik lub poprzez zwiększanie intensywności wzrostu i wzmoczenie reprodukcji. Do najważniejszych czynników mających wpływ na przebieg fotosyntezy należą: temperatura, opad, wilgotność, usłonecznienie oraz emisja do atmosfery CO₂ i zanieczyszczeń spowodowanych między innymi przemysłową działalnością człowieka.

Analiza i wpływ zewnętrznych czynników środowiskowych na procesy fizjologiczne i kształtowanie rocznych przyrostów drzew zostały przedstawione przez wielu uczonych,

m.in. [33-35]. Słoje drzew stanowią archiwa zmian różnych czynników środowiskowych, w których wzrastało drzewo.

Czynnikami zewnętrznymi, które wywierają największy wpływ na aktywność fotosyntetyczną roślin, są: światło, temperatura, dostępność do wody i stężenie CO₂ w atmosferze. Wszystkie te czynniki mają charakter kompleksowy i mogą wywoływać różne reakcje roślin na różne czynniki w zależności od gatunku i fizjologii roślin. Ważną rolę w wymianie gazowej pełnią aparaty szparkowe, które są również regulatorami pobierania i ruchu wody w roślinie [36]. Korzystne warunki środowiskowe pozytywnie wpływają na przebieg fotosyntezy i rozwój rośliny, natomiast w przypadku stresu wodnego, radiacyjnego, temperaturowego czy toksyn roślina zaczyna wykorzystywać mechanizmy obronne, a wydajność fotosyntezy jest ograniczona i w skrajnych przypadkach sytuacja taka może doprowadzić do obumarcia tkanek, a nawet rośliny.

Roczne przyrosty drzew stanowią archiwum zmian klimatycznych i antropopresji. Sekwencja wąskich i szerokich rocznych pierścieni drzew jest podstawą tworzenia chronologii, na podstawie których dendrochronolodzy odtwarzają zmiany klimatu i warunków środowiskowych [37-40]. Można przyjąć, że w chronologii rocznych przyrostów drzew jest zapisany zmienny w czasie przebieg warunków meteorologicznych dla danego obszaru, sygnał ten może być jednak maskowany przez różne czynniki środowiska pochodzenia antropogenicznego. Znajomość redukcji przyrostów rocznych drzew rosnących w obszarach przemysłowych pozwala powiązać wpływ szkodliwej emisji na degradację drzewostanów. Dzięki procesowi normalizacji i standaryzacji możliwe jest uzyskanie wartości indeksu szerokości przyrostu (RWI) reprezentującego odchylenie wzrostu radialnego dla konkretnego roku w porównaniu do jego średniej wartości. Prowadzone w tym zakresie obserwacje wykazały znaczną redukcję przyrostów drzew na obszarach przemysłowych w Polsce, kojarzoną z intensyfikacją emisji zanieczyszczeń atmosferycznych [41-45].

Pomiary szerokości rocznych przyrostów prowadzone w różnych laboratoriach potwierdzają, że metoda dendrochronologiczna nie jest wystarczająca do rekonstrukcji zmian zachodzących w środowisku [46], gdy mamy do czynienia ze złożonym kompleksem czynników wpływających na wzrost drzew. W takich sytuacjach wykorzystywane są inne mierzalne wielkości, jakimi są względne koncentracje lekkich izotopów stabilnych, radiowęglu czy pierwiastków śladowych w poszczególnych słojach [47].

Wciąż jednak niewiele jest badań kompleksowo oceniających wpływ emisji CO₂ oraz zanieczyszczeń powietrza pochodzących z niskiej i wysokiej emisji na zmiany szerokości rocznych przyrostów drzew oraz zmiany ich składu izotopowego czy pierwiastkowego w okresie rozwoju przemysłu i wprowadzania polityki pro-ekologicznej na Śląsku. Przemysł na Śląsku, a więc i wzrost ilości zanieczyszczeń emitowanych w tym regionie, spowodował postępującą degradację drzewostanów na dużych obszarach [41-45].

Zastosowanie metod spektrometrycznych w badaniach rocznych przyrostów drzew i ich składu izotopowego stanowi uzupełnienie badań dendroklimatologicznych szczególnie dla obszarów, gdzie analizy związków między szerokościami rocznych przyrostów słoików i zmianami klimatycznymi wskazują na ich mało znaczące korelacje lub też trudno jest wyróżnić sygnał pochodzący od danego czynnika klimatycznego.

Różnice szybkości przebiegu reakcji dla molekuł o różnym składzie izotopowym wynikają z różnicy ich mas. W przypadku pierwiastków lekkich występują duże względne różnice mas ich izotopów, w związku z tym rozdzielanie izotopowe jest najbardziej

widoczne dla tej grupy pierwiastków. Frakcjonowanie izotopowe jest efektem zróżnicowania szybkości reakcji chemicznych, np. enzymatycznych, rozpuszczania czy wytrącania z roztworu, procesów transportu, np. dyfuzji, jak również zmian stanu skupienia [48, 49]. Ważną rolę we frakcjonowaniu izotopowym odgrywa pochodzenie wybranego pierwiastka oraz lokalne warunki środowiskowe.

Analizy wpływu zmian klimatu na zmiany składu izotopowego drzew prowadzone są z wykorzystaniem różnych modeli, zakładających m.in. szukanie korelacji pomiędzy średnią temperaturą powietrza, maksymalną temperaturą powietrza, ilością opadów, liczbą godzin słonecznych czy wilgotnością a składem izotopowym sosny, analizując wpływ każdego z czynników osobno, jak również budując modele w oparciu o analizy wieloskładnikowe. W analizach wykorzystywane są również wskaźniki (wartości indeksowane), jak np. SPEI (ang. *standardised precipitation-evapotranspiration index*). W ostatnim czasie coraz częściej wykorzystywane są w analizach zmian klimatu właśnie wartości indeksowane, które uwzględniają wpływ czynników w sposób kompleksowy. Zmiany klimatu mogą mieć charakter naturalny, jak i mogą być skutkiem antropopresji. Bardzo ważne jest właściwe wnioskowanie w kwestii ewentualnych zmian klimatu, a w ramach badania składu izotopów stabilnych węgla i tlenu istotna jest próba odnajdywania zintegrowanej odpowiedzi na zmiany warunków środowiskowych. Analiza danych meteorologicznych dotyczących zmian temperatury powietrza, sumy opadów, jak również okresów bezdeszczowych w ostatnim stuleciu wskazuje na znaczący wzrost temperatury i zmniejszenie liczby opadów oraz skrócenie okresów wilgotnych, w konsekwencji czego można zaobserwować współcześnie coraz częściej występujące i wydłużające się okresy bezdeszczowe oraz coraz częściej występujące ekstremalne lokalne zjawiska takie jak powodzie, huragany czy susze.

Zmiany klimatu bardzo często naukowcy wiążą z wpływem działalności człowieka na środowisko, a przede wszystkim ze wzrostem emisji zanieczyszczeń i gazów cieplarnianych do atmosfery. Jak pokazuje raport organizacji IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) [50], uhonorowanej Pokojową Nagrodą Nobla w 2007 roku, obserwowane zmiany klimatu wywołane m.in. działalnością człowieka, głównie emisją do atmosfery CO₂ pochodzącego ze spalania paliw kopalnych oraz innych zanieczyszczeń emitowanych do atmosfery przez zakłady przemysłowe, mogą stanowić poważne zagrożenie dla życia na Ziemi i rozwoju cywilizacyjnego ludzkości. Raport ten wykorzystuje m.in. dane dendrochronologiczne. Drzewa, traktowane jako archiwum zmian wzbogacone o dane izotopowe, mogą być i są wykorzystywane w monitoringu środowiska jako czułe bioindykatory zmian środowiska w skali lokalnej, regionalnej i globalnej. Łączenie różnych metod badawczych pozwoliło uzyskać szczegółowe informacje o biosferze, o relacjach środowisko – drzewostany.

Roczne przyrosty drzew oraz liście stanowią archiwum zmian środowiska, w szczególności zanieczyszczeń, oraz są czułymi bioindykatorami wrażliwymi na zmiany klimatu. Na czynniki stresogenne (zarówno wysoka, jak i niska temperatura, długotrwała susza, zanieczyszczenie powietrza) roślina może reagować w różny sposób – np. poprzez redukcję przewodności aparatów szparkowych albo poprzez zmianę tempa fotosyntezy, a w konsekwencji nie tylko dochodzi do dodatkowego frakcjonowania izotopów w roślinie, ale również roczne przyrosty są w takich sytuacjach węższe. Jak można zauważyć, sygnał klimatyczny może być maskowany przez różne czynniki środowiska – najczęściej związane z działalnością człowieka. Przykładowo: w sytuacji wzrostu zanieczyszczenia

powietrza, wody lub gleby roślina pobiera mniejszą ilość CO₂ niż miałyby to miejsce w przypadku, gdyby poziom zanieczyszczeń był niższy. Jest to związane z ilością substancji toksycznych przenikających wraz z wodą lub powietrzem do tkanki rośliny. Pobór CO₂ odbywa się poprzez aparaty szparkowe. Redukcja przewodności aparatów szparkowych chroni w takich sytuacjach roślinę przed większą akumulacją substancji toksycznych. Jednak redukcja przewodności aparatów szparkowych może być też odpowiedzią na czynniki naturalne, np. w przypadku wysokiej temperatury czy innych warunków stresogennych (pogodowych) roślina, zamykając aparaty szparkowe, chroni się przed utratą wody z liści.

Analiza dynamicznych zmian składu izotopowego stabilnego węgla i tlenu [51] w słojach drzew, a w szczególności zależności między przewodnictwem aparatów szparkowych (g) i szybkością fotosyntezy (A), a tym samym efektywności wykorzystania wody iWUE (iWUE = A/g) drzew ze zmiennością czynników klimatycznych, pozwoliły na szczegółową analizę, w jaki sposób na Śląsku drzewa reagują i przystosowują się do zmian klimatu, w tym stresu wodnego i zwiększonego wzrostu temperatury powietrza [9, 16, 17]. Sezonowe wahania temperatury i stresu wodnego mogą zmniejszać przewodnictwo aparatów szparkowych, zmieniać tempo fotosyntezy, a w związku z tym można także zaobserwować frakcjonowanie składu izotopowego tkanki roślinnej. Frakcjonowanie izotopowe może wynikać z jego frakcjonowania w środowisku (niezależnie od roślin), a także z fizjologii roślin i reakcji chemicznych zachodzących w roślinach. Podczas fotosyntezy rośliny przekształcają CO₂ i H₂O w sacharydy (C₆H₁₂O₆)_n za pomocą światła i uwalniają tlen do atmosfery. Frakcjonowanie, które zachodzi w wyniku dyfuzji w powietrzu i przewodnictwa szparkowego, oraz frakcjonowanie spowodowane karboksylacją (dyskryminacja przez RuBisCO) opisują różne modele [48, 49, 52]. Wrażliwość drzew na zmiany klimatyczne może być modyfikowana lub maskowana przez działalność człowieka, która ma wpływ na cały ekosystem, w którym rośnie drzewo.

Na skład izotopowy roślin wpływ mają zmiany tempa fotosyntezy i przewodności aparatów szparkowych, warunki klimatyczne, zanieczyszczenie środowiska, jak również inne procesy odpowiedzialne za frakcjonowanie izotopów w całej biosferze (w skali lokalnej, jak i globalnej), a w konsekwencji w powietrzu i wodzie pobieranej do fotosyntezy przez roślinę.

Badania paleośrodowiskowe dla potrzeb klimatologicznych prowadzone z wykorzystaniem spektrometrii masowej pokazały, że zarówno całkowite drewno, jak i celuloza mogą być stosowane do analiz zmian składu izotopowego węgla, a w przypadku izotopów tlenu – α-celuloza. Po licznych badaniach okazało się jednak, że najlepszym materiałem badawczym jest α-celuloza, ponieważ w ligninie w przypadku zajścia powtórnej lignifikacji sygnał klimatyczny może być zniekształcony [47].

W moich pracach, które prowadzę od 2006 roku, wykazałam, że sygnał klimatyczny jest czytelny na poziomie cząsteczkowym, a wahania składu izotopowego glukozy, otrzymanej w wyniku hydrolizy α-celulozy ekstrahowanej z rocznych przyrostów drzew, odzwierciedlać mogą zmiany czynników środowiska, w jakim roślina przeprowadzała proces fotosyntezy.

3. Badania dendrochronologiczne i geochemiczne drzew w ramach projektów badawczych realizowanych w Instytucie Fizyki – CND

Pierwsze prace z wykorzystaniem glukozy jako bioindykatora zmian środowiska zostały przeprowadzone z wykorzystaniem hydrolizy enzymatycznej [31]. Zastosowana metoda jednak nie pozwoliła wyodrębnić cząstek glukozy do badań spektrometrycznych. W zmienionej procedurze wykorzystano hydrolizę kwasową, która umożliwiła przeprowadzenie pionierskich badań dla obszaru Puszczy Niepołomickiej [25-30] w okresie od 1940 do 2000. Również w składniku, który stanowi glukoza, zapis zmian środowiska związanych z emisją zanieczyszczeń przemysłowych był widoczny. Pionierskie badania glukozy pochodzącej z rocznych przyrostów drzew przeprowadzone zostały przez grupę z Instytutu Fizyki przy współpracy z Instytutem CERMAV – CNRS we Francji. Znalazły one również zastosowanie i kontynuację w badaniach prowadzonych w Instytucie Fizyki Politechniki Śląskiej w kolejnych latach.

Głównym celem badań prowadzonych w ramach kolejnych projektów była rekonstrukcja sygnału zmian klimatu i efektu antropogenicznego oraz monitoring wpływu działalności człowieka związanej z rozwojem przemysłu w okresie wprowadzania polityki proekologicznej [1, 4-24]. Badany był sygnał klimatyczny i antropogeniczny zapisany w szerokości rocznych przyrostów sosny, jak i składzie izotopowym drewna, celulozy oraz glukozy.

Analiza dendrochronologiczna pozwoliła na analizę reakcji przyrostowych drzew jako miary ich wrażliwości na presję różnych czynników środowiskowych. Negatywny wpływ zanieczyszczeń na stan drzewostanów na obszarze Śląska był i jest tematem wielu dyskusji i badań. Podobnie wpływ zmian klimatu – zmian temperatury powietrza, zmian liczby godzin słonecznych, zmiany warunków pluwialnych, występowanie okresów suszy, zmiany wilgotności powietrza.

W wyniku badań dendrochronologicznych [4, 5, 11, 12, 14-17, 19, 22-24] zaobserwowano, że:

- sosna zwyczajna jest wrażliwa na warunki pluwialno-termalne. Warunki klimatyczne znajdują odzwierciedlenie m.in. w zmienności szerokości przyrostów drzew jak i zmienności BAI, zmienności indeksów wrażliwości;
- redukcje szerokości przyrostów drzew w latach od 1975 do 1990 związane były przede wszystkim ze wzrostem zanieczyszczeń przemysłowych, a zmniejszenie emisji zanieczyszczeń przemysłowych w latach 90. obserwowane jest jako okres regeneracji drzew i tworzenia szerszych przyrostów;
- w okresie zwiększonych zanieczyszczeń wrażliwość drzew na zmianę czynników klimatycznych (stresowych) jest maskowana przez sygnał pochodzący od zanieczyszczeń powietrza;
- na zapis sygnału antropopresji w drzewach wpływa zarówno kierunek wiatru, jak i topografia terenu, w tym odległość od emitora.

Uzupełnieniem badań dendrochronologicznych były i są analizy określające zmiany składu izotopów węgla, tlenu i azotu oraz zmiany składu pierwiastkowego w liściach, a także drewnie drzew dokonywane za pomocą metod spektrometrycznych. W analizach chemicznych wykorzystano zarówno metody spektrometryczne (np. IRMS, ang. *isotope ratio mass spectrometry*; AMS, ang. *accelerator mass spectrometry* czy LSC, ang. *liquid*

scintillators counter; ICP-MS-), jak i mikroskopowe (SEM – skaningowy mikroskop elektronowy) [4-24].

Przeprowadzone badania pozwoliły na wskazanie podobieństw i różnic w reakcji i adaptacji sosny do zmian środowiska, zwłaszcza poprzez szczegółową wszechstronną analizę dendrochronologiczną wybranych obszarów lasów przemysłowych w województwie śląskim i opolskim, oraz umożliwiły kompleksową analizę składu pierwiastkowego i izotopów stabilnych (węgla, tlenu, azotu), jak również radiowęgla w rocznych przyrostach drzew oraz młodych pędach sosny:

- analizę sygnałów zmian środowiska zapisanych w szerokości rocznych przyrostów drzew oraz chronologii indeksowanej szerokości przyrostów drzew, a także BAI [4, 5, 11, 12, 14-17, 19, 22-24];
- analizę sygnałów zmian środowiska zapisanych w składzie izotopów stabilnych w różnych składnikach rocznych przyrostów drzew – drewnie, α -celulozie oraz glukozie w latach od 1975 do 2012 [4-24];
- analizę wpływu zanieczyszczeń emitowanych do atmosfery na szerokość rocznych przyrostów drzew oraz ich składu chemicznego (czasoprzestrzennego zapisu zmian środowiska w szerokości rocznych przyrostów drzew i ich składzie izotopowym w pobliżu każdego z wybranych zakładów) – porównanie zapisu zmian klimatu i wpływu przemysłowych zanieczyszczeń środowiska w okresie od 1975 roku do współczesności [1-24];
- czasową i przestrzenną analizę wpływu czynników klimatycznych oraz emisji CO₂ i zanieczyszczeń powietrza na drzewa w okresie rozwoju przemysłu i wdrażania polityki proekologicznej na Śląsku (CO₂, SO₂, PM) [18];
- analizę zmian koncentracji radiowęgla, ze szczególnym uwzględnieniem okresu implementacji norm europejskich (z 5-letnią rozdzielczością w okresie od 1975 do 2000 i z roczną rozdzielczością od 2000 roku) [2, 3, 5, 8, 9, 12];
- analizę przestrzennego zapisu zmian środowiska w składzie izotopowym drzew w pobliżu każdego z wybranych zakładów (w różnej odległości od wybranego zakładu) na podstawie analiz składu izotopowego rocznych pędów sosny od 2012 roku (badania są kontynuowane) [2, 3, 8, 23];
- oszacowanie składowej emisyjnej CO₂ pochodzącej z przemysłowych zanieczyszczeń środowiska wokół zakładów [2, 3, 8, 9, 14];
- oszacowanie i analizę efektywności wykorzystania wody przez drzewa, oszacowano wpływ warunków termalnych jak i pluwialnych na skład izotopowy roślin oraz współczynnik wykorzystania wody przez roślinę (iWUE) [2, 4, 20, 23];
- określenie relacji pomiędzy temperaturą powietrza, opadami, usłonecznieniem, wilgotnością względną powietrza a składem izotopowym węgla i tlenu w roślinach [4, 5, 16].

Wyznaczenie zmienności składu izotopów stabilnych węgla i tlenu w α -celulozie i glukozie dla różnych zakładów przemysłowych w okresie wprowadzania strategii proekologicznej w zakładach (hucie, elektrociepłowni, zakładach chemicznych), od 1975 roku do współczesności, pozwoliło w szczególności na:

- stworzenie pierwszych chronologii izotopowych dla drzewostanów sosny rosnącej w dwóch województwach: śląskim i opolskim, zarówno w obszarze silnego wpływu przemysłu, jak i w obszarze porównawczym oddalonym 100 km od aglomeracji [4, 5, 11, 14, 16].

- analizę stabilności i zmienności w czasie sygnału klimatycznego zapisanego w składzie izotopów stabilnych węgla i tlenu [4, 7, 14, 18, 24, 53] dla trzech różnych zakładów przemysłowych (huty, elektrocieplowni, zakładów azotowych) w okresie od 1975 roku do współczesności. Pozytywne korelacje zaobserwowano z temperaturą powietrza w miesiącach letnich i składem izotopowym węgla oraz tlenu, ujemną korelację pomiędzy ilością opadów, szczególnie w miesiącach letnich, i składem izotopowym węgla. Pozytywną korelację można zauważyć pomiędzy usłonecznieniem i składem izotopowym węgla oraz tlenu. Najczęściej negatywną korelację można zauważyć pomiędzy składem izotopowym a wilgotnością miesięcy letnich. Wyraźny wpływ warunków termiczno-pluwialnych w miesiącu lipcu obserwowany jest dla większości badanych drzewostanów. Należy przy tym zauważyć, że odpowiedź na zmiany klimatu zapisana w składzie izotopowym drzew nie jest homogeniczna. Reakcje sosny wskazują wyraźne zróżnicowania w czasie i przestrzeni, stąd konieczne było stosowanie modeli opartych na interwałach czasowych;
- oszacowanie i analizę efektywności wykorzystania wody przez drzewa (na poziomie celulozy i glukozy) oraz analizę zmienności WUE w świetle anomalii temperatury powierzchni Ziemi. W latach 1975-2012 wraz ze wzrostem koncentracji CO₂ w powietrzu również współczynnik wykorzystania wody przez roślinę (WUE) wzrósł o ok. 40%. Wyniki wskazują na istotną zależność WUE od zmian temperatury powierzchni Ziemi oraz wielkości emisji antropogenicznego CO₂ do atmosfery [4, 6, 7, 20];
- analizę zmian iWUE z procesem ewapotranspiracji (z uwzględnieniem zmian SPEI). SPEI jest wieloskalarnym wskaźnikiem suszy opartym na danych klimatycznych. Badania te pozwoliły na zaproponowanie trzech możliwych scenariuszy-modeli z określeniem prawdopodobieństwa każdego z nich [4];
- jakościową analizę zmienności składu izotopów stabilnych węgla i tlenu w α -celulozie i określenie reakcji w postaci zmiany w szybkości fotosyntezy czy zmiany konduktywności aparatów szparkowych [4, 16].

W 2015 roku rozpoczęto prace badawcze dotyczące składu geochemicznego rocznych przyrostów drzew oraz rocznych pędów sosny. Pierwsze badanie wykonano dla odwiertów sosny, a w kolejnych latach dla igieł sosny. Badania geochemiczne odwiertów przeprowadzono w Belgii, przy użyciu LA-ICPMS, natomiast w przypadku igieł sosny przy użyciu ICPMS [1, 2, 8, 17]. Dane dotyczące składu pierwiastkowego drewna porównano z depozycją pierwiastków. Zaobserwowano zarówno podobieństwa, jak i różnice pomiędzy składem chemicznym odwiertów oraz listowia.

Zastosowanie mikroskopii skaningowej SEM pozwoliło na uzyskanie informacji o składzie pierwiastkowym pyłu deponowanego na listowiu oraz na obserwację zmiany struktury powierzchni listowia [3, 11, 13] w różnych porach roku w różnej odległości od emiterów zanieczyszczeń.

Badania geochemiczne zapoczątkowane w ramach projektu BIOPOL oraz współpracy polsko-belgijskiej były kontynuowane w kolejnych projektach.

Wyniki badań prowadzonych w ramach projektów badawczych pozwoliły na geoprze-strzenną analizę składu izotopów stabilnych i radiowęgla w listowiu, określenie składowej fosylnej, analizę stężenia pierwiastków pyłów zaabsorbowanych wewnątrz listowia, analizę stężenia pierwiastków w pyłach zdeponowanych na powierzchni igieł.

Uzyskane wyniki badań wykazały zróżnicowanie przestrzenne składu chemicznego listowia drzewostanów sosny. Również po raz pierwszy możliwe było wskazanie głównych źródeł pochodzenia antropogenicznego CO₂ w biosferze w badanych obszarach (wśród nich można było zauważyć i wyróżnić obszary, w których głównym źródłem emisji CO₂ były: (1) ruch uliczny i spalanie paliw kopalnych pochodzących z paliw samochodowych, jak również (2) gospodarstwa domowe i spalanie węgla) – dzięki analizie składu izotopów stabilnych węgla w igłach sosny [2].

Zarówno badania dendrochronologiczne, jak i chemiczne jednoznacznie wskazują na zróżnicowanie reakcji drzew na czynniki środowiskowe. Zarówno w lasach województwa śląskiego, jak i opolskiego drzewostany były i są narażone na stres antropogeniczny związany z emisją zanieczyszczeń nie tylko lokalnych, ale także zanieczyszczeń pochodzących z odległych źródeł, przenoszonych w wyniku ruchu mas powietrza, jak również były i są narażane na stres związany ze zmianą warunków klimatycznych (pluwialno-termalnych). Badania pokazały, że w zależności od odległości od źródeł emisji wpływ zanieczyszczeń na sosnę jest różny i stopień redukcji szerokości przyrostów drzew jest inny, reakcje drzew nie są homogeniczne. Nie zawsze również w bliskim sąsiedztwie wybranego zakładu przemysłowego można zaobserwować wpływ wybranego emitera. Jest to związane z faktem, że emisja zanieczyszczeń emitowanych do atmosfery następuje z dużej wysokości nad poziomem drzew rosnących w bliskim sąsiedztwie zakładów. W przypadku zakładów przemysłowych największe redukcje szerokości przyrostów drzew, a tym samym największy wpływ zanieczyszczeń, odnotowywano w odległości kilku kilometrów od źródeł emisji. Ze względu na dynamikę atmosfery zjawisko to nie jest zaskakujące. Potwierdziły to również badania izotopowe drzew, które wzbogaciły badania dendrochronologiczne o dane geochemiczne. Dzięki dendrochronologii obserwowane zmiany w składzie chemicznym drewna można było powiązać z konkretnym rokiem, a co za tym idzie, konkretnymi wskaźnikami – parametrami klimatu czy też np. zmianami w gospodarowaniu emisją zanieczyszczeń. W przypadku niskiej emisji zaobserwować można wpływ emisji zanieczyszczeń w bliższym sąsiedztwie emiterów.

4. Podsumowanie

Celem badań, podejmowanych w Instytucie Fizyki – CND Politechniki Śląskiej, była i jest ocena wpływu zanieczyszczeń przemysłowych na wybrane rodzaje reakcji przyrostowych populacji sosny zwyczajnej, wykorzystania przez nie wody oraz zmiany składu izotopowego pierwiastków w ich drewnie i jego składnikach oraz w liściach. W ramach szeroko rozumianej współpracy naukowej pomiędzy badaczami z wielu dziedzin z różnych ośrodków powstało ponad 50 opracowań (publikacji w czasopiśmie międzynarodowych oraz referatów przedstawianych podczas konferencji krajowych, jak i międzynarodowych). Uzyskane w ramach różnych projektów wyniki poddawane są dalszym analizom i dyskusjom, modelowaniu. W analizach chemicznych wykorzystano zarówno metody spektrometryczne, jak i mikroskopowe. Badania prób pobieranych od 2012 roku są kontynuowane, a analizy chemiczne rozszerzane o kolejne pomiary, w zależności od możliwości, w szczególności dostępności do materiału badawczego, aparatury, kosztów analiz, jak również ograniczeń związanych ze stosowaną technologią. W badaniach szczególną uwagę przykładano się do wiarygodności, powtarzalności, jak również szacowania niepewności pomiarowej i precyzji stosowanych metod. W wyniku tych badań uzyskiwane są informacje o zmianach zachodzących w środowisku zarówno w czasie (od 1900 do 2023 roku), jak i w przestrzeni ponad 100 km².

Podziękowania

Serdeczne podziękowania kieruję do wszystkich osób, dzięki którym badania mogły zostać przeprowadzone, w szczególności dziękuję za udostępnienie możliwości przeprowadzenia analiz na aparaturze badawczej i transfer wiedzy. Badania przedstawione w pracy były możliwe dzięki współpracy z badaczami z wielu ośrodków naukowych i realizowane w ramach następujących projektów:

- „Przestrzenna i czasowa ewolucji skażenia środowiska związana z działalnością wydobywczą i hutniczą na Górnym Śląsku” (2020-2021), w ramach programu wymiany bilateralnej między Rzeczpospolitą Polską a Belgią (Walonią-Brukselą), NAWA;
- „Monitorowanie zmian zachodzących w środowisku, w archiwach kontynentalnych w ostatnich wiekach w Europie: zmienność o charakterze naturalnym i ingerencje antropogeniczne” (2017-2019), w ramach umowy o współpracy między Rządem Rzeczypospolitej Polskiej z jednej strony, a Rządem Wspólnoty Francuskiej Belgii i Rządem Walońskim z drugiej strony (projekt nr 17);
- „Rekonstrukcja historii zanieczyszczenia powietrza w Europie w ciągu ostatniego tysiąclecia” (2014-2016), w ramach umowy między Rządem Wspólnoty Francuskiej Belgii, Rządem Regionu Walonii I Komisją Wspólnotową Francuską Regionu Stołecznego Brukseli z jednej strony a Rządem Rzeczypospolitej Polskiej z drugiej strony;
- „Experiment and general understanding on polysaccharide synthesis in plant life cycles” (2007, 2008), bourse de recherche – stypendium Rządu Francji;
- „Drzewa jako bioindykatory przemysłowych zanieczyszczeń powietrza w okresie wdrażania proekologicznej polityki na obszarze Śląska” (2012-2017), NCN (UMO-2011/03/D/ST10/05251);
- „Zastosowanie metod spektrometrii masowej do badania składu izotopów stabilnych węgla i tlenu w α -celulozie i glukozie z rocznych przyrostów drzew jako bioindykatorów środowiska” (2009), MNiSzW (N N305 016636);
- „Applied of physics and ArcGIS technology in the environmental research: Air pollutants deposition on the foliage – a case study of biomonitoring of the industrial area” (2021), Politechnika Śląska;
- „Project-based learning: Applied physics and ArcGIS technology in the environmental research-air pollutants accumulation the foliage – a case study of biomonitoring of the industrial area” (2021), Politechnika Śląska.

Literatura

1. Sensuła B., Fagel N., *Analysis of trace elements in tree rings of pines growing nearby steelwork in Southern Poland during the industrial and post-industrial periods*, *Forests*, 14(5), 2023, s. 1-22, numer artykułu: 964, doi: 10.3390/f14050964.
2. Sensuła B., Piotrowska N., Nowińska K., Koruszowicz M., Lazaj D., Osadnik R., Paluch R., Stasiak A., Strączek B., *Characteristics of pine needles exposed to pollution in Silesia, Poland: carbon isotopes, iWUE, and trace element concentrations in pine needles*, *Radiocarbon*, 65(1), 2023, s. 233-246, doi: 10.1017/rdc.2023.1.
3. Sensuła B., Toroń B., Roczniak J., Sasiela A., Świątkowski J., Tomaszowska A., *Characteristics of pine needles exposed to multi-source pollution in silesia: radiocarbon concentration in pine needles and elemental analysis of the needles' surface deposits*, *Radiocarbon*, 64(6), 2022, s. 1333-1344, doi: 10.1017/rdc.2022.85.

4. Sensuła B., Wilczyński S., *Dynamics changes in basal area increment, carbon isotopes composition and water use efficiency in pine as response to water and heat stress in Silesia, Poland*, *Plants*, 11(24), 2022, s. 1-20, numer artykułu: 3569, doi: 10.3390/plants11243569.
5. Sensuła B., Wilczyński S., *Records of anthropogenic pollution in Silesia captured in Scots pine tree rings: analysis by radiocarbon, stable isotopes, and basal area increment analysis*, *Water Air and Soil Pollution*, 233, 2022, s. 1-8, numer artykułu: 143, doi: 10.1007/s11270-022-05617-6.
6. Sensuła B., *Analiza zmian składu izotopowego węgla oraz fotosyntetycznego współczynnika wykorzystania wody przez sosnę zwyczajną rosnącą w Zagłębiu Dąbrowskim w okresie industrialnym i postindustrialnym*, [w:] Kalbarczyk K., Chodźko E.(red.), *Ochrona środowiska i gospodarka odpadami – współczesne rozwiązania i perspektywy na przyszłość*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2022, s. 73-85.
7. Sensuła B., *Dynamic changes in stable isotopic composition and water use efficiency in pine tree rings as indicators of climate changes and human activities in Silesia*, [w:] Pikoń K., Bogacka M. (red.), *Contemporary problems of power engineering and environmental protection 2021*, Politechnika Śląska, Gliwice 2022, s. 29-34.
8. Sensuła B., Fagel N., Michczyński A., *Radiocarbon, trace elements and Pb isotope composition of pine needles from a highly industrialized region in southern Poland*, *Radiocarbon*, 63(2), 2021, s. 713-726, doi: 10.1017/RDC.2020.132.
9. Piotrowska N., Pazdur A., Pawelczyk S., Rakowski A., Sensuła B., Tudyka K., *Human activity recorded in carbon isotopic composition of atmospheric CO₂ in Gliwice urban area and surroundings (Southern Poland) in the years 2011-2013*, *Radiocarbon*, 62(1), 2020, s. 141-156, doi: 10.1017/RDC.2019.92.
10. Sensuła B., Piotrowska N., *Carbon isotopic research of pinus sylvestris l. growing in the Southern Poland (near Kędzierzyn-Koźle, Dąbrowa Górnicza, Katowice and Olesno)*, *Radiocarbon*, 62(2), 2020, s. 497-502, doi: 10.1017/RDC.2019.130.
11. Sensuła B., Wilczyński S., Toroń B., Piotrowska N., *Biomonitoring obszarów przemysłowych Śląska – zastosowanie metod dendrochronologicznych, spektrometrycznych i mikroskopowych w badaniach drzewostanów sosnowych w pobliżu elektrociepłowni w Łaziskach Górnych*, [w:] Pikoń K., Bogacka M. (red.), *Współczesne problemy ochrony środowiska i energetyki 2019*, Politechnika Śląska, Gliwice 2020, s. 131-135.
12. Sensuła B., Michczyński A., Piotrowska N., Wilczyński S., *Anthropogenic CO₂ emission records in Scots pine growing in the most industrialized region of Poland from 1975 to 2014*, *Radiocarbon*, 60(4), 2018, s. 1041-1053, doi: 10.1017/RDC.2018.59.
13. Sensuła B., Toroń B., *Reakcje drzewostanów sosnowych na obszarze przemysłowym w pobliżu zakładów chemicznych w Kędzierzynie-Koźlu: analiza mikroskopowa powierzchni igieł*, *Studia i Materiały Centrum Edukacji Przyrodniczo-Leśnej*, 20(3), 2018, s. 75-80.
14. Sensuła B., Wilczyński S., *Tree-ring widths and the stable isotope composition of pine tree-rings as climate indicators in the most industrialised part of Poland during CO₂ elevation*, *Geochronometria*, 45(1), 2018, s. 130-145, doi: 10.1515/geochr-2015-0094.
15. Sensuła B., *Trees as bio-indicators of industrial air pollution during implementation of pro-environmental policy in the Silesia region*, *Quat. Perspect.*, 25(2), 2018, s. 20-21.
16. Sensuła B., Wilczyński S., *Climatic signals in tree-ring width and stable isotopes composition of Pinus Sylvestris L. Growing in the industrialized area nearby Kędzierzyn-Koźle*, *Geochronometria*, 44(1), 2017, s. 240-255, doi: 10.1515/geochr-2015-0070.
17. Sensuła B., Wilczyński S., Monin L., Allan M., Pazdur A., Fagel N., *Variations of tree ring width and chemical composition of wood of pine growing in the area nearby chemical factories*, *Geochronometria*, 44(1), 2017, s. 226-239.

18. Sensuła B., *The impact of climate, sulfur dioxide, and industrial dust on $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ in glucose from pine tree rings growing in an industrialized area in the southern part of Poland*, Water Air and Soil Pollution, 227, 2016, s. 1-13, numer artykułu: 106, doi: 10.1007/s11270-016-2808-0.
19. Sensuła B., Wilczyński S., Piotrowska N., *Zastosowanie metod dendrochronologicznych oraz spektrometrycznych w monitorowaniu drzewostanów sosnowych na obszarach przemysłowych*, Sylwan, 9, 2016, s. 730-740, doi: 10.26202/sylwan.2016040.
20. Sensuła B., *$\delta^{13}C$ and water use efficiency in the glucose of annual pine tree rings as ecological indicators of the forests in the most industrialized part of Poland*, Water Air and Soil Pollution, 227(2), 2016, s. 1-13, numer artykułu: 68, doi: 10.1007/s11270-016-2750-1.
21. Pazdur A., Gabryś A., Kuc T., Pawełczyk S., Piotrowska N., Rakowski A., Różański K., Sensuła B., *Imprint of CO_2 emission in atmosphere and biosphere on the basis of ^{14}C and ^{13}C measurements*, Geophysical Research Abstracts, 17, 2015, s. 1.
22. Sensuła B., Opała M., Wilczyński S., Pawełczyk S., *Long- and short-term incremental response of *Pinus sylvestris* L. from industrial area nearby steelworks in Silesian Upland, Poland*, Dendrochronologia, 36, 2015, s. 1-12, doi: 10.1016/j.dendro.2015.08.001.
23. Sensuła B., *Spatial and short-temporal variability of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ and water-use efficiency in pine needles of the three forests along the most industrialized part of Poland*, Water Air and Soil Pollution, 226, 11, 2015, s. 1-13, numer artykułu: 362, doi: 10.1007/s11270-015-2623-z.
24. Sensuła B., Wilczyński S., Opała M., *Tree growth and climate relationship: dynamics of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) growing in the near-source region of the combined heat and power plant during the development of the pro-ecological strategy in Poland*, Water Air and Soil Pollution, 226, 2015, s. 1-17, numer artykułu: 220, doi: 10.1007/s11270-015-2477-4.
25. Pazdur A., Kuc T., Pawełczyk S., Piotrowska N., Sensuła B., Różański K., *Carbon isotope composition of atmospheric carbon dioxide in southern Poland: imprint of anthropogenic CO_2 emissions in regional biosphere*, Radiocarbon, 55(2/3), 2013, s. 848-864, doi: 10.2458/azujsrc.55.16286.
26. Sensuła B., Pazdur A., *Influence of climate change on carbon and oxygen isotope fractionation factors between glucose and α -cellulose of pine wood*, Geochronometria, 40(2), 2013, s. 145-152, doi: 10.2478/s13386-013-0104-y.
27. Sensuła B., Pazdur A., *Stable carbon isotopes of glucose received from pine tree-rings as bioindicators of local industrial emission of CO_2 in Niepołomice Forest (1950-2000)*, Isotopes in Environmental and Health Studies, 49(4), 2013, s. 532-541, doi: 10.1080/10256016.2013.865026.
28. Sensuła B., Pazdur A., *Zapis współczesnych zmian klimatu oraz emisji CO_2 w zmianach składu izotopowego węgla ($\delta^{13}C$) w glukozie i α -celulozie z rocznych przyrostów sosny*, Studia i Materiały Centrum Edukacji Przyrodniczo-Leśnej, 14(1), 2012, s. 218-227.
29. Sensuła B., Pazdur A., Marais M., *First application of mass spectrometry and gas chromatography in investigation of α -cellulose hydrolysates: the influence of climate changes on glucose molecules in pine tree-rings*, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 25(4), 2011, s. 489-494, doi: 0.1002/rcm.4882.
30. Sensuła B., Pazdur A., Pawełczyk S., Marais M., *First application of MS and GC in the investigation of α -cellulose hydrolysates: the influence of climate changes on glucose molecules in pine tree-rings*, [w:] ISOTOPES 2011: International conference, Greoux-les-Bains, France, June 20-24, 2011, s. 95.
31. Sensuła B., Derrick P., Bickerton J., Pazdur A., *Mass spectrometric study of glucose and cellobiose produced during enzymatic hydrolysis of α -cellulose extracted from oak late-*

- wood annual rings, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(13), 2009, s. 2070-2074, doi: 1002/rcm.4089.
32. <https://omega.polsl.pl/info/author/PSL907eb75025e747fcaa280203cbaff7e1/> [data dostępu: 1.06.2023].
 33. Jacoby G., D'Arrigo R., *Tree rings. carbon dioxide. and climatic change*, Proceeding of National Academy of Sciences USA. Colloquium Paper, 94, 1997, s. 8350-8353.
 34. Esper J., Cook E., Schweingruber F., *Low-frequency signals in long tree-ring chronologies for reconstructing past temperature variability*, *Science*, 295, 2002, s. 2250-2253.
 35. Martinelli N., *Climate from dendrochronology: latest developments and results*, *Global and Planetary Change*, 40(1-2), 2003, s. 129-139.
 36. Kopcewicz J., Lewak S., *Fizjologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007.
 37. Schweingruber F., *Tree rings and environment. Dendroecology*, Paul Haupt, WSL/FNP, Berne 1996.
 38. Cedro A., Lamentowicz M., *The last hundred years' dendroecology of Scots pine (Pinus sylvestris L.) on a Baltic bog in Northern Poland: Human impact and hydrological changes*, *Baltic Forestry*, 14(1), 2008, s. 26-33.
 39. Cedro A., *Próba oceny oddziaływania temperatury powietrza i opadów atmosferycznych na przyrost radialny sosny zwyczajnej (Pinus sylvestris) na Pomorzu Zachodnim*, *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio B. Geographia, Geologia, Mineralogia et Petrographia*, 12, 2001, s. 105-112.
 40. Zielski A., Krąpiec M., *Dendrochronologia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.
 41. Oleksyn J., *High growth of different European Scots pine provenances in a heavy polluted and control environment*, *Environmental Pollution*, 55, 1998, s. 289-299.
 42. Malik I., Danek M., Marchwińska-Wyrwał E., Danek T., Wistuba M., Krąpiec M., *Scots pine (Pinus sylvestris L.) growth suppression and adverse effects on human health due to air pollution in the Upper Silesian Industrial District (USID), Southern Poland*, *Water, Air and Soil Pollution*, 223, 2012, s. 3345-3364.
 43. Orzeł S., *Dynamika przyrostu grubości drzewostanów sosnowych położonych w zasięgu emisji zakładów przemysłu metali kolorowych*, *Sylwan*, 140, 1996, s. 59-67.
 44. Krąpiec M., Szychowska-Krąpiec E., *Tree-ring estimation of the effect of industrial pollution on pine (Pinus sylvestris) and fir (Abies alba) in the Ojców National Park (Southern Poland)*, *Nature Conservation*, 58, 2001, s. 33-42.
 45. Malik I., Danek M., Danek T., Krąpiec M., Wistuba M., *Zanieczyszczenie atmosfery przez zakłady przemysłowe położone w północnej części Wyżyny Śląskiej zapisane w przyrostach rocznych sosny zwyczajnej*, *Czasopismo Geograficzne*, 80(4), 2009, s. 257-274.
 46. Roden J., Ehleringer J., *Observations of hydrogen and oxygen isotopes in leaf water confirm the Craig-Gordon model under wide-ranging environmental conditions*, *Plant Physiology*, 120, 1999, s. 1165-1173.
 47. Griffiths H. (red.), *Stable isotopes: integration of biological, ecological and geochemical processes*, BIOS Scientific Publishers, Oxford 1998, s. 303-321.
 48. Loader N., Robertson I., McCarroll D., *Comparison of stable carbon isotope ratios in the whole wood. cellulose and lignin of oak tree-rings*, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 196, 2003, s. 395-407.
 49. Farquhar G., Lloyd J., *Carbon and oxygen effects in the exchange of carbon dioxide between terrestrial plants and the atmosphere*, [w:] Ehleringer J.R., Hall A.E., Farquhar G.D. (red.), *Stable isotopes and plant carbon-water relations*, Academic Press, New York 1993, s. 47-71.
 50. Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M., Averyt K.B., Tignor M., Miller H.L. (red.), *Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge 2007.

51. Scheidegger Y., Saurer M., Bahn M., Siegwolf R., *Linking stable oxygen and carbon isotopes with stomatal conductance and photosynthetic capacity: a conceptual model*, *Oecologia*, 125, 2000, s. 350-357.
52. Siegwolf R.T.W., Brooks J.R., Roden J., Saurer M. (red.), *Stable isotopes in tree rings, tree physiology*, Springer, Cham 2022, <https://doi.org/10.1007/978-3-030-92698-412>.
53. Biondi F., Waikul K., *DENDROCLIM2002: A C++ program for statistical calibration of climate signals in tree-ring chronologies*, *Computers & Geosciences*, 30, 2004, s. 303-311.

Stan badań interdyscyplinarnych zmienności składu pierwiastkowego i izotopowego drzewostanów sosny zwyczajnej w województwie śląskim i opolskim

Streszczenie

Systematyczne badania zapisu zmian środowiska w archiwach izotopowych, jakimi są listowie oraz roczne przyrosty drzew rosnących w województwach śląskim i opolskim, prowadzone od 2011 roku pozwalają na wszechstronną analizę wpływu zmian środowiska na drzewa w XX i XXI wieku. Badani pozwalają na kompleksową ocenę wpływu zanieczyszczeń biosfery na zmiany szerokości rocznych przyrostów drzew oraz ich skład izotopowy i pierwiastkowy na obszarze 100 km². Obok tworzenia chronologii (dendrochronologii i chronologii izotopowych) niewątpliwie ciekawym aspektem badań jest prowadzona od kilku lat analiza zmian w wykorzystaniu wody przez roślinę oraz zmian składu izotopowego tlenu i węgla z wykorzystaniem różnych modeli pozwalających na określanie frakcjonowania izotopów. Drzewa stanowią doskonałe archiwum zmian klimatycznych oraz efektu antropogenicznego.

Słowa kluczowe: sosna zwyczajna, skład pierwiastkowy, izotopy, WUE, środowisko

The interdisciplinary research of the variability of the elemental and isotopic composition of Scots pine growing in the Silesian and Opole voivodships

Abstract

Systematic research of recording environmental changes in isotope archives, such as leaves and annual increments of trees growing in Silesian and Opole Voivodships, conducted since 2011, allows for a comprehensive analysis of the impact of environmental changes on trees in 20 and 21st century. The subjects allow for a comprehensive assessment of the impact of biosphere pollution on changes in the width of the annual growth of trees and their isotopic and elemental composition in the area of 100 km². In addition to the creation of chronology (dendrochronology and isotope chronologies), an undoubtedly interesting aspect of the research is the analysis of changes in water use by the plant and changes in the isotopic composition of oxygen and carbon using various models that allow determining isotope fractionation. Trees are an excellent archive of climate change and the anthropogenic effect.

Keywords: Scots pine, elemental composition, isotopes, WUE, environment

System UNI-BUS firmy Elplant sp. z o.o. jako przykład innowacji, intuicyjności i wydajności w rolnictwie

1. Wstęp i przegląd literatury

Postęp techniczny i technologiczny w rolnictwie doprowadził do poziomu rolnictwa precyzyjnego [1], określanego często jako **Rolnictwo 3.0**, co pozwoliło na odejście od traktowania pola jako jednolitej, niezróżnicowanej przestrzeni wegetacyjnej roślin, w której rolnik prowadzi swoją działalność. Oprzyrządowanie techniczne i informatyczne towarzyszące rolnictwu precyzyjnemu umożliwiło wprowadzenie większej dokładności w wykonywanych pracach polowych, a także zwiększenie wydajności pracy oraz uzyskanie oszczędności obniżających koszty produkcji.

W maszynach obecnie oferowanych rolnikom obok dobrze funkcjonujących elementów roboczych istotne znaczenie mają elementy elektroniczne, które są w stanie bezawaryjnie i precyzyjnie sterować poszczególnymi zespołami roboczymi tych maszyn, a także komunikacja operatora z elementami roboczymi, która pozwala osiągać ilościowe (np. wydajność) i jakościowe (np. obniżenie strat zbieranego plonu czy precyzyjne rozmieszczenie nasion w redlinie) parametry pracy, zgodne z oczekiwaniami rolnika. Takie tendencje w rozwoju techniki rolniczej prowadzą całe rolnictwo na wyższy poziom, dzisiaj określane jako rolnictwo inteligentne (SF) [1]. Osiąga się to często [2, 3] za pomocą rozbudowanych magistral (np. ISOBUS) umożliwiających operatorowi przesyłanie sygnałów do zespołów roboczych maszyny i ciągnika, sterowanych układami elektrycznymi, pneumatycznymi lub hydraulicznymi.

Powyższymi zagadnieniami, czyli produkcją oraz oferowaniem producentom maszyn rolniczych elektronicznych układów sterowania, zajmuje się firma Elplant sp. z o.o., której ponad 20-letnie doświadczenie i dotychczasowe sukcesy w obszarze współpracy z producentami techniki rolniczej pozwoliły na pozyskanie grantu badawczo-rozwojowego z NCBiR. Pozyskane w ramach grantu środki finansowe umożliwiają rozwój innowacji będących wynikiem myśli twórczych powstających w firmie. Udoskonalenia w dotychczas produkowanych maszynach rolniczych, a także rozwiązania innowacyjne rozwijane w firmie Elplant wychodzą naprzeciw tendencjom, które daje się zauważyć w licznych opracowaniach naukowych. Trudno byłoby przytoczyć wszystkie opracowania naukowe, które dotyczą tzw. inteligentnego rolnictwa (SF). Sięgnijmy zatem tylko do tych opracowań, które są w jakimś stopniu związane z rozwiązaniami omawianymi w niniejszym artykule.

Wśród siedmiu omawianych rozwiązań trzy dotyczą siewników, jedno rozwiązanie dotyczy owijarki bel, a pozostałe trzy związane są ze zdalnym (bezprowadowym, za pomocą smartfona lub tabletu) sterowaniem elementami roboczymi tychże maszyn rolniczych.

¹ Firma Elplant sp. z o.o.

W bardzo obszernym opracowaniu przeglądowym [10] poświęconym urządzeniom mechatronicznym w siewnikach autorzy wymieniają aż 50 różnorodnych kombinacji rozwiązań mechanicznych i elektronicznego sterowania oraz kontroli wysiewu, które prowadzą do osiągnięcia bardzo różnych parametrów jakościowych wysiewu. Problemom związanym z jakością wysiewu precyzyjnego w przypadku siewu kukurydzy poświęcone jest inne opracowanie [12], które skupia się na ważności kontrolowania wysiewu pojedynczych nasion i unikania zarówno pominięć, jak i podwójnych nasion, umieszczanych w redlinie. Te dwa wymienione opracowania naukowe wskazują na ogromne znaczenie konfiguracji precyzyjnych mechanizmów wysiewających, wspomaganych urządzeniami elektronicznymi, dla ostatecznych parametrów jakościowych wysiewu nasion oraz końcowych warunków wzrostu i rozwoju roślin oraz plonowania. Ten aspekt przyświecał także naszym rozwiązaniom dotyczącym siewników, a więc sprzęgła elektromagnetycznemu do włączania ścieżek technologicznych, zaworowi do włączania ścieżek technologicznych oraz rotacyjnemu elektrohydraulicznemu krokowemu zespołowi napędowemu. Wyrażamy nadzieję, że i nasze rozwiązania staną się w przyszłości przedmiotem badań i oceny.

W przypadku owijarek istotnym problemem bywa sposób i czas owijania bel słomy, siana czy masy zielonej, a także zużycia folii do owijania. Na te aspekty procesu zabezpieczania zbieranej masy roślinnej przed wpływami atmosferycznymi oraz niepożądanymi procesami w trakcie zakiszania zwrócono uwagę w opracowaniu [9], w którym podkreślono, że optymalną kombinacją parametrów podczas owijania jest prędkość obrotowa bębna owijającego na poziomie od 31 obr./min do 32 obr./min, stosunek prędkości bębna owijającego do prędkości rolek nośnych na poziomie 2,6, a napięcie folii owijającej na poziomie od 20 N do 22 N. W takich warunkach czas owijania jednej beli wynosiłby od 37,7 s do 38,9 s, a jednostkowe zużycie folii od 3,21 kg/t do 3,46 kg/t.

Zagadnienia bezprzewodowego sterowania zespołami roboczymi maszyn rolniczych, które są przedmiotem naszych rozwiązań, rozpatrywane są w wielu opracowaniach [3, 7, 11, 13], które zwracają uwagę na siłę, prędkość, a także bezpieczeństwo przekazywanego sygnału sterującego. Nasze rozwiązania poprzez zmniejszenie liczby połączeń hydraulicznych oraz elektrycznych w znacznym stopniu ułatwiają operatorowi obsługę maszyny oraz zmniejszają częstotliwość opuszczania kabiny ciągnika przez operatora w celu kontroli lub korygowania parametrów roboczych maszyny. Ten aspekt rozwiązań poprawia także bezpieczeństwo pracy operatora, bowiem, jak wynika ze statystyki wypadków z ciągnikami [14], do ok. 45% wszystkich wypadków dochodzi podczas wychodzenia i wchodzenia do kabiny ciągnika.

Celem niniejszego artykułu jest zaprezentowanie zarówno dotychczasowego dorobku firmy, jak i najnowszych rozwiązań, realizowanych w ramach pozyskanego grantu, a przede wszystkim innowacyjnego, intuicyjnego i zwiększającego wydajność produkcyjną systemu UNI-BUS, który umożliwiłby producentom maszyn rolniczych ocenę możliwości wykorzystania tego systemu dla ulepszenia oferowanych przez nich maszyn.

2. Misja i dotychczasowe osiągnięcia firmy

Decyzja o założeniu firmy produkującej technologię elektroniczną dla branży rolniczej wynika z osobistego doświadczenia autora jako rolnika. Wszelkie wyzwania i napotykanne problemy w pracy na roli stawały się pretekstem do opracowania systemów, które – wykorzystując wciąż postępującą myśl techniczną – usprawniały sposób uprawy,

obniżały jej nakłady oraz zwiększały plony. Od momentu powstania w 1997 roku firma Elplant (od 2015 Elplant sp. z o.o.), projektując i produkując urządzenia elektroniczne służące do kontroli pracy maszyn rolniczych i do intuicyjnego sterowania nimi, a także zwiększające ich wydajność, cechowała się innowacyjnością w stosunku do bieżącej oferty polskich producentów maszyn rolniczych.

Począwszy od 1999 roku firma Elplant zrealizowała co najmniej 12 projektów B+R z zakresu udoskonalania maszyn rolniczych, wśród których wymienić należy:

- MSR-1 mikroprocesorowy sterownik rozsiewacza dla firmy Agromet Brzeg (1999);
- licznik do owijarek dla firmy SIPMA S.A. (2000);
- sterowniki do wszystkich maszyn firmy SIPMA S.A. – prasy i owijarki (2001);
- sterownik do owijarki Maja OS7531 (2004);
- prasę pasową Z-599 (2007);
- nową generację sterowań – wyświetlacz graficzny punktowy monochromatyczny (2010);
- sterowanie ISOBUS (2012);
- owijarkę OS-7521 na sterowaniu nowej generacji (2013);
- modernizację owijarki OS-7531 do sterowania nowej generacji (2014);
- prasę Pionier PS-1235 z pełną automatyką (2015);
- agregat uprawowo-siewny Fenix dla firmy Unia z pełną automatyką hydrauliki (2016);
- owijarkę szeregową i prasę silosującą z pełną automatyką dla firmy SIPMA S.A. (2017).

Skuteczność rozwiązań wymyślonych i opracowanych przez firmę Elplant na przestrzeni ponad 20 lat zdobyła sobie uznanie i zaufanie czołowych polskich producentów maszyn rolniczych, do których – oprócz ww. firm SIPMA S.A. i Unia – należą także: POM Bodnica (Grupa KRUKOWIAK), Agro-Tom, KOŚCIAN, URSUS, Bomet, JAR-MET i MEPROZET.

3. Projekt: Opracowanie innowacyjnych urządzeń specjalnego przeznaczenia do zastosowania w budowie maszyn rolniczych o wysokim udziale elektroniki i zaawansowanych systemów automatyzacji

To najnowszy projekt B+R firmy Elplant, podjęty w latach 2021-2023 dzięki pozyskaniu dotacji [4] z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (w ramach konkursu „Szybka Ścieżka – Agrotech”). Bezpośrednią motywacją do podjęcia prac w tym zakresie była konieczność zwiększenia efektywności działania siewników oraz maszyn związanych z zabiegami agrotechnicznymi, zarówno w sektorze rolnictwa precyzyjnego (*smart fields*), jak i na terenach o dynamicznie zmieniających się warunkach pogodowych. Istotnym celem prac było ograniczenie kosztów maszyny na etapie produkcji, jak również zmniejszenie kosztów eksploatacji maszyny przez rolnika.

Przeprowadzone prace B+R ukierunkowano na opracowanie innowacyjnych [5, 6] urządzeń specjalnego przeznaczenia do zastosowania w budowie maszyn rolniczych, o wysokim udziale elektroniki i zaawansowanych systemów automatyzacji, które znajdują zastosowanie w takich maszynach jak: owijarka do bel cylindrycznych, agregat uprawowo-siewny, siewnik pneumatyczny czy siewnik rzędowy. Dokonujący się postęp w technologiach produkcji maszyn rolniczych w szczególności dotyczy rolnictwa precyzyjnego, które z jednej strony jest silnie rozwijającym się działem produkcji żywności,

a z drugiej – wiąże się z minimalizacją nakładów energetycznych, pracy ludzkiej i niekorzystnego wpływu na środowisko naturalne. Wychodząc naprzeciw tym wytycznym, realizowany projekt charakteryzuje się siedmioma nowatorskimi elementami składowymi:

1. Owijkarką ze stołem obrotowym do bel cylindrycznych, z rozszerzonym zakresem funkcji technologicznych i z wykorzystaniem zaawansowanego systemu automatyki (innowacja światowa).
2. Rotacyjnym elektrohydraulicznym krokowym zespołem napędowym, m.in. do napędu aparatów wysiewających w siewnikach (innowacja światowa).
3. Uniwersalnym, zintegrowanym systemem sterującym UNI-BUS (innowacja krajowa).
4. Jednostką sterującą maszyną roboczą ECU (*electronic control unit*), przy wykorzystaniu łączności bezprzewodowej [3, 7, 11, 13] do komunikacji ze smartfonem lub tabletem wyposażonym w dedykowaną aplikację z panelem operatorskim maszyny (innowacja światowa).
5. Blokiem zaworowym o praktycznie nieograniczonej ilości segmentów (sekcji) i tym samym znaczącej redukcji ilości węży hydraulicznych pomiędzy zaworami (innowacja krajowa).
6. Zaworem do włączania ścieżek technologicznych w siewniku pneumatycznym i pracującym z wykorzystaniem niskich napięć i mocy (innowacja światowa).
7. Sprzęgłem elektromagnetycznym do włączania ścieżek technologicznych siewnika, o optymalnym doborze materiałów elementów roboczych zapobiegających „sklejaniu się” połówek sprzęgła, przy uwzględnieniu bezpośredniej kontroli stanu włączenia i wyłączenia ścieżek technologicznych siewnika za pomocą oprogramowania sterującego (innowacja krajowa).

Wymienione rozwiązania, stanowiące 4 innowacje światowe i 3 na poziomie kraju, znacząco zwiększają wydajność pracy, wydłużają żywotność maszyn, redukują ilość mechanicznych komponentów, a w konsekwencji oszczędzają kapitał i są przyjazne dla środowiska.

Czystość patentowa proponowanych rozwiązań została zweryfikowana z zachowaniem przewidzianych zasad [8], poprzez analizę baz patentowych (Patentscope, Espacenet, UPRP), informacji branżowych, a także analizę stanu techniki wykonanej przez rzeczownika patentowego.

Zanim firma Elplant przystąpiła do opracowywania powyższych rozwiązań, określono poziom gotowości technologicznej projektu na 3 wg skali TRL (*technology readiness level*), tj. badania w celu potwierdzenia koncepcji. Potwierdzono analitycznie i eksperymentalnie krytyczne koncepcje technologii, a w okresie od kwietnia 2019 roku do lipca 2020 roku przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych wstępne badania mające na celu zweryfikowanie możliwości wykonania badań przemysłowych i prac rozwojowych poszczególnych produktów poprzez potwierdzenie zasadności zaproponowanych przez Elplant rozwiązań technicznych. W wyniku rozpoznania istniejących na rynku rozwiązań technicznych produktów, a także identyfikacji ich wad oraz ich umiejscowienia, potwierdzono słuszność planowanych kierunków prac B+R poprzez wykonanie zastępczych ideowych rozwiązań z dostępnych materiałów.

Realizację projektu podzielono na 5 etapów prowadzonych równolegle dla odrębnych urządzeń i obejmujących m.in.:

- opracowanie konstrukcji;
- wykonanie wirtualnych badań w symulowanym stanie obciążenia roboczego konstrukcji;

- wykonanie przedprototypów;
- badania i testy przedprototypów prowadzone w warunkach stanowiskowych zbliżonych do rzeczywistych, przy użyciu stacji hydraulicznej i stanowiska HMG oraz aparatury do pomiarów prądów i napięć elektrycznych;
- wykonanie prototypów oraz doświadczalna weryfikacja założeń technologicznych ich wykonania;
- badania, testy stanowiskowe i eksploatacyjne prototypów w warunkach rzeczywistych.

Zakończenie etapu 3 było równoznaczne z osiągnięciem 6 poziomu TRL (testy prototypu w warunkach zbliżonych do rzeczywistych), natomiast zakończenie etapu 5 stanowi osiągnięcie ostatniego, 9 poziomu TRL i kwalifikuje projekt gotowy do wdrożenia.

4. Opis elementów składowych projektu z uwzględnieniem ich innowacyjności

4.1. Owijarka ze stołem obrotowym do bel cylindrycznych z rozszerzonym zakresem funkcji technologicznych (innowacja światowa)

Owijarka ze stołem obrotowym do bel cylindrycznych z rozszerzonym zakresem funkcji technologicznych, sterowana smartfonem. Innowacja polega na realizacji wyładunku beli bez wykorzystania urządzenia wyładowniczego, za pomocą odtaczania lub na denko beli, z funkcją owijania bel słomy tylko powierzchni tocznej (walca). Wynik projektu stanowi owijarka umożliwiająca owijanie bel tylko po bokach (na pobocznicę beli), posiadająca funkcję ciągłej kontroli oraz zmianę zakładki folii w trakcie owijania. Wyładunek beli ma się odbywać na jej pobocznicę lub podstawę, bez udziału powszechnie stosowanych elementów wyładowniczych. W urządzeniu zastosowany będzie blok zaworowy (zasilanie hydrauliczne bezpośrednio z ciągnika) oraz jednostka kontrolna (ECU), opracowane w niniejszym projekcie. Wdrożone innowacje skutkują szybkością pracy owijarki wyposażonej w stół obrotowy. Czas ten określa się na ok. 40 s/belę przy maksymalnych parametrach beli: średnicy 1500 mm, szerokości 1200 mm oraz wadze 1500 kg. Mając na względzie kompleksowość pracy, przewidziano możliwość sprzęgnięcia owijarki z prasą i zaczepienia bezpośrednio do ciągnika.

Maszyna przeznaczona będzie do owijania bel sianokiszonki do formy szczelnego mikro silosu oraz bel materiału suchego do przechowywania bez zadaszenia (owijanie jedynie pobocznicę beli z wykorzystaniem minimalnych ilości folii ma bezpośredni wpływ na obniżenie kosztów użytkowania urządzenia, a także pośredni wpływ na środowisko poprzez zmniejszenie zużycia folii).

Innowacyjny autorski system elektrohydrauliczny będzie sterowany bezprzewodowo poprzez konsumenckie urządzenie (smartfon, tablet) z systemem Android wyposażonym w autorskie oprogramowanie firmy Elplant. Urządzenie będzie mogło pracować w dwóch trybach owijania beli:

- klasycznym pionowym układzie podajnika folii – z wykorzystaniem wirowania stołu wraz z równoczesnym toczeniem się beli na walcach stołu;
- oraz innowacyjnym – poziome położenie podajnika folii, z niewirującym stołem, a pracującymi tylko walcami stołu. Zastosowanie ww. rozwiązania (unikalnego na skalę światową) pozwoli na owijanie tylko boków beli. Przełoży się to bezpośrednio

na mniejszy czas owijania beli, mniejsze zużycie folii oraz paliwa, a także brak konieczności przykrywania materiału suchego (np. słomy) plandekami.

Dzięki wprowadzonej możliwości owijania bel tylko po bokach (na poboczniczy beli) otrzymano zmniejszenie czasu owijania beli, zmniejszenie zużycia folii oraz paliwa, a także brak konieczności przykrywania materiału suchego (np. słomy) plandekami. Ponadto owijarka opracowana przez Elplant wyposażona została w funkcję ciągłej kontroli oraz zmiany zakładki folii w trakcie owijania.

Rozwiązanie to zostało objęte dwoma patentami RP: patentem nr P.444561 o nazwie „Sposób owijania bel walcowych i owijarka do realizacji tego sposobu” oraz patentem nr P.444996 o nazwie „Sposób i urządzenie do wyładunku beli walcowej do pionowej pozycji spoczynkowej”.

4.2. Rotacyjny elektrohydrauliczny krokowy zespół napędowy m.in. do napędu aparatów wysiewających w siewnikach (innowacja światowa)

Krokowa (taktowa) realizacja zadań roboczych jest możliwa dzięki użyciu specjalnie zaprojektowanego zaworu sterującego silnikiem hydraulicznym, pracującego z wykorzystaniem niskich napięć i mocy, co pozwala na zastosowanie takiego napędu w agregacie z niewielkim zapotrzebowaniem na moc ciągnika. Zespół napędowy będzie zasilany silnikiem krokowym małej mocy z zachowaniem szczelności na poziomie IP65. Zespół będzie miał niską chłonność oleju (od 2 l/min do 5 l/min), co pozwoli na zastosowanie ciągników o małej mocy (z niższą wydajnością czynnika hydraulicznego), niskie zużycie paliwa oraz wykorzystanie jednostki np. w małym agregacie. Zastosowanie silnika wykonawczego małej mocy (do 2 kW) umożliwi osiągnięcie momentu obrotowego na poziomie ok. 15 Nm przy niskim zapotrzebowaniu na prąd – od ok. 0,5 A do 1,0 A. Zastosowanie zespołu napędowego z tak niską chłonnością oleju umożliwia precyzyjne (tj. z dokładnością ok. 2%) utrzymanie prędkości obrotowej w zakresie od 0 do 500 obr./min oraz dużą dokładność wysiewu, określaną na poziomie od 0,5 dag do 1,0 dag.

Unikatowe rozwiązanie stanowi silnik tworzony przez Elplant, łączący zalety silnika hydraulicznego z zaletami elektrycznego silnika krokowego – przy zachowaniu wysokich parametrów mocy i momentu obrotowego oraz możliwości elastycznej regulacji prędkości obrotowej od ułamka do kilkuset obrotów na minutę.

Na rynku światowym nie ma producenta oferującego takie rozwiązanie. Obecnie stosowane są silniki hydrauliczne wymagające dużej chłonności oleju – na poziomie nawet do 100 l/min. Ze względu na mechanikę zaworów sterujących ich prędkością (PWM) nie są one w stanie utrzymywać precyzyjnie prędkości obrotowej, co wpływa na dokładność wysiewu. Jednostki te do napędu wymagają silników o dużej mocy: od 10 kW do 15 kW, których cena, przy zachowaniu klasy szczelności na poziomie IP65, sięga 10 tys. PLN (koszt produktu firmy Elplant szacuje się na ok. 3 tys. PLN). Abstrahując od wysokich kosztów produktów na dostępnym rynku, ich techniczne wymagania determinują zastosowanie wyłącznie ciągników o dużej mocy i dużym zużyciu paliwa, co generuje kolejne koszty bezpośrednio u rolnika.

4.3. Uniwersalny, zintegrowany system sterujący UNI-BUS (innowacja krajowa)

System UNI-BUS przeznaczony jest do siewników rolniczych, posiada możliwość dopasowania do każdego typu siewników, a także uwzględnia potrzeby i oczekiwania producenta oraz rolnika. W standardowej ofercie system sterujący UNI-BUS firmy Elplant zawiera:

- aplikację Elplant.HMI, która zapewnia nawigację zintegrowanym systemem sterującym UNI-BUS i którą można zainstalować na dowolnym tablecie lub smartfonie z systemem Android;
- sterownik ECU (*electronic control unit*) będący jednostką centralną zintegrowanego systemu sterującego (w standardzie znajduje się 7 czujników i 5 elementów wykonawczych, w tym siłownik, zawór, elektromagnes);
- wiązkę sterująco-oświetleniową EHS (*easy harness system*) firmy Elplant, która jest kompletną instalacją łączącą sterowanie, oświetlenie drogowe oraz oświetlenie robocze. Wiązka dopasowana jest do typu siewnika oferowanego przez producenta, z dokładnością do 1 cm.

4.4. System bezprzewodowego sterowania maszyną ECU (*electronic control unit*) z wykorzystaniem smartfona lub tabletu (innowacja światowa)

Zastosowanie tego unikalnego rozwiązania polega na opracowaniu systemu (tj. oprogramowania) umożliwiającego łączność bezprzewodową pomiędzy maszyną roboczą wyposażoną w jednostkę kontrolną ECU a smartfonem lub tabletem pracującym na systemie Android i wyposażonym w odpowiednie oprogramowanie. Istotną przewagą nowego produktu (co nie jest oferowane przez żadnego polskiego ani światowego producenta tego typu rozwiązań) będzie możliwość zastosowania w tej komunikacji dowolnego (a nie dedykowanego) urządzenia (tablet, smartfon) z odpowiednim oprogramowaniem. W przypadku sterowania maszyną wykorzystany więc będzie tablet lub smartfon komunikujący się bezprzewodowo z ECU, dzięki któremu będzie można sterować jednostką kontrolną zamontowaną na maszynie. Jednostka kontrolna będzie odpowiedzialna za zbieranie informacji z czujników, uruchamianie układów wykonawczych według algorytmu, przechowywanie danych, łączność ze smartfonem lub tabletem. Wynik projektu zakłada stworzenie następujących jednostek: ECU MIKRO, MINI, MIDI i MAXI z odpowiednio 6, 11, 23 oraz 47 wejściami/wyjściami, a także odpowiedniego oprogramowania. Zastosowanie tak uniwersalnego rozwiązania pozwala uniknąć kosztów zakupu dedykowanego urządzenia dzięki wykorzystaniu już posiadanego tabletu czy smartfona, jak również pozwala na komfortowe zarządzanie maszyną z poziomu kabiny ciągnika, gdyż wszelkie parametry będą widoczne na jednym wyświetlaczu. Obecnie na rynku światowym brakuje producenta takiego rozwiązania.

4.5. Blok zaworowy firmy Elplant (innowacja krajowa)

Modułowa budowa, znacząca redukcja nadmiernej ilości przewodów hydraulicznych i prosta obsługa serwisowa czynią blok zaworowy firmy Elplant bezkonkurencyjną innowacją na poziomie krajowym, dostępną w konkurencyjnej cenie. Segmentowa budowa bloku o nieograniczonej ilości sekcji eliminuje konieczność zastosowania węży ciśnieniowych pomiędzy zaworami. Główny element bloku (tzw. „serduszko”) to blok wejściowy, charakteryzujący się wysokim przepływem oleju (ok. 90 l/min), włączający się tylko w razie potrzeby (funkcja *load-sensing*) wraz z 1,5-sekcyjnym wyjściem do sterowania najmniejszymi maszynami. Blok ten charakteryzuje się możliwością przyłączenia nieograniczonej liczby sekcji do dodatkowych obwodów – w liczbie koniecznej do zapewnienia pracy maszyny przy możliwości sterowania trzema obwodami jednocześnie. Sekcje mogą być umiejscowione w dowolnym miejscu i zasilane jedynie dwoma

przewodami hydraulicznymi (zasilanie – powrót). Rozwiązanie to zapewnia użytkownikowi prostotę działania, obniżenie kosztów oraz posiada wymierny wpływ na środowisko.

Zastosowanie wymienionych rozwiązań umożliwia nawet siedmiokrotne zminimalizowanie ilości przewodów hydraulicznych, zużywanego oleju, długości przewodów sterujących (np. z całkowitej długości 200 m do 30 m), jak również zmniejszenie ilości stali do wykonania samego bloku o ok. 1/3 (z 10 kg do 7 kg). Zmiany te wpływają bezpośrednio na zmniejszenie zużycia paliwa i obniżenie kosztów eksploatacyjnych. Obecnie stosowane na rynku rozwiązania oferują przepływ oleju na poziomie ok. 25 l/min, co wpływa na nagrzewanie się oleju oraz większe zużycie paliwa. Bloki zaworowe obecnie dostępne na rynku działają zero-jedynkowo (otwarty – zamknięty), niezależnie od zapotrzebowania na olej.

Zazwyczaj występują w wersjach monoblokowych, co przy dużej ilości sekcji wymusza zastosowanie dużej ilości węży hydraulicznych. Dodatkową wadą obecnych rozwiązań jest sterowanie tylko jednym obwodem w tym samym czasie.

4.6. Zawór do włączania ścieżek technologicznych w siewniku pneumatycznym (innowacja światowa)

Dzięki zastosowaniu gniazda połączeniowego oraz procesora kontrolującego zamknięcie i otwarcie zaworu, liczącego ilość cykli potrzebnych do podłączenia zaworów, wyeliminowano dużą ilość kabli elektrycznych, a także zwiększono trwałość zaworu, a tym samym ilość wysiewanych nasion. Innowacją produktu jest możliwość sterowania zaworami połączonymi równolegle procesorem (otwarcie/zamknięcie), co pozwoli na zastosowanie w agregacie siewnym jednego przewodu do sterowania jednym zaworem. Każdy z zaworów będzie miał swój adres, pod który będzie trafiać komenda otwarcia – zamknięcia, co umożliwi zamykanie lub otwieranie zaworów w dowolnym momencie (rolnictwo precyzyjne). Ze względu na bezpośrednią możliwość sterowania przełoży się to na większą trwałość zaworu. Wynik opracowania takiego rozwiązania pozwala ograniczyć koszty całej maszyny (koszt kompletnego zaworu firmy Elplant wynosi ok. 500 PLN, co stanowi ok. 50% produktów na rynku). Obecne na rynku rozwiązania są nietrwałe i drogie: Firma Kverneland produkuje zawory, przy czym koszt jednej sztuki oscyluje w okolicach 1000 PLN (co przy zastosowaniu od 4 szt. do 6 szt. na siewnik generuje znaczny koszt) i zawiera dużą ilość przewodów przyłączeniowych. Czeska firma Rado-Agro produkuje praktycznie dla wszystkich koncernów zajmujących się produkcją siewników, lecz ich koszt jest również bardzo wysoki.

4.7. Sprzęgło elektromagnetyczne do włączania ścieżek technologicznych siewnika (innowacja krajowa)

Innowacyjny dobór materiałów elementów roboczych zapobiega „sklejaniu się” półówek sprzęgła przy uwzględnieniu bezpośredniej kontroli stanu włączenia i wyłączenia ścieżek technologicznych siewnika za pomocą oprogramowania sterującego. Innowacyjną przewagą sprzęgła firmy Elplant jest możliwość bezpośredniej kontroli stanu włączenia oraz wyłączenia (razem lub osobno) każdej ścieżki przy pomocy oprogramowania sterującego, jak również dostarczanie go do klientów z długością kabli oraz końcówek dostosowanych do ich potrzeb. Istotna jest również łatwość montażu zasilania i sterowania, ograniczona do wpięcia wtyczki do gniazda, co skutkuje usprawnieniem zarówno montażu, jak i serwisu u dealerów i odbiorców końcowych (rolników). Odpowiednie

oprogramowanie umożliwia załączanie i wyłączanie każdej ścieżki technologicznej osobno. W przypadku awarii jednej ze ścieżek nie jest konieczny demontaż większej części maszyny, a tylko jej elementu.

Na rynku krajowym nie ma żadnego producenta oferującego takie rozwiązanie. W Europie liczącym się producentem jest duńska firma Jac Teknik. Na 1000 wyprodukowanych w ciągu roku siewników w Polsce, trzech producentów (produkujących 200 sztuk) stosuje sprzęgła Jac Teknik. Pozostałe firmy ze względu na wysoką cenę oraz problemy techniczne nie stosują tego rozwiązania. Sprzęgła produkowane przez tę firmę wykonane są z aluminium i mosiądzu, co powoduje ich „sklejanie” się oraz konieczność demontażu dużej części siewnika w celu naprawy, co z kolei wiąże się z wysokimi kosztami.

5. Podsumowanie

W artykule przedstawiono przede wszystkim możliwości najnowszego projektu firmy Elplant, jakim jest opracowywany od dwóch lat system UNI-BUS. Wynika on z oczekiwań autora, które, jako czynny rolnik, stawia przed maszynami rolniczymi. Możliwości tego systemu z pewnością znajdują uznanie zarówno w rolnictwie precyzyjnym, jak i wśród rolników preferujących intuicyjne rozwiązania.

Możliwości najnowszego projektu firmy Elplant wynikają z osobistych oczekiwań autora, jakie stawia przed maszynami rolniczymi jako rolnik uprawiający rolę. Pozwala on bowiem na zwiększenie wydajności i ograniczenie kosztów uprawy poprzez dokładny pomiar i kontrolę prędkości jazdy, dokładny pomiar wykonanej powierzchni, czasu pracy oraz uzyskanej wydajności, i to na różnych polach (dzięki niezależnym programom). Niezależnie od możliwości Systemu UNI-BUS przedstawiono rozwiązania innowacyjne dotyczące innego niż dotychczasowe sposobu pracy owijarki, które pozwalają przede wszystkim na zwiększenie wydajności oraz oszczędności w zużyciu folii.

Wśród rozwiązań innowacyjnych znalazły się także dotyczące siewników, pozwalające na zwiększenie wydajności i precyzji wysiewu. Jest to możliwe dzięki rotacyjnemu elektrohydraulicznemu krokowemu zespołowi napędowemu, napędzającemu aparaty wysiewające, a także informowaniu operatora o stanach niepożądanych (np. alarmowanie braku nasion w skrzyni). Poprawę komfortu pracy operatora oraz jakości pracy podczas wysiewu powinno zapewnić rozwiązanie ułatwiające obsługę oraz sygnalizację położenia znaczników bocznych, a także sprzęgło elektromagnetyczne do włączania ścieżek technologicznych.

Proponowane i przedstawione w artykule rozwiązania niejako „przy okazji” umożliwiają ograniczenie liczby przewodów elektrycznych oraz hydraulicznych pomiędzy ciągnikiem a maszyną, co w połączeniu z możliwością bezprzewodowego sterowania elementami roboczymi maszyn poprawia bezpieczeństwo pracy operatora.

Literatura

1. Ekielski A., Wesołowski K., *Systemy agrotechniczne*, Polska Izba Gospodarcza Maszyn i Urządzeń Rolniczych, Toruń 2019, ISBN 978-83-955096-0-5.
2. Dhanaraju M., Chenniappan P., Ramalingam K., Pazhanivelan S., Kaliaperumal R., *Smart farming: Internet of things (IoT)-based sustainable agriculture*, Agriculture, 12, 2022, 1745.
3. <https://www.microtronicscontrols.com/wireless-remote-control-technology-increases-agricultural-efficiency>, [data dostępu: 21.07.2023].
4. Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, *Poradnik kwalifikowania zadań w projektach B+R o charakterze społeczno-ekonomicznym*, Politechnika Warszawska, Warszawa 2018.

5. Jasiński A.H., *Innowacyjność w gospodarce Polski. Modele, bariery, instrumenty wsparcia*, Wydawnictwo Naukowe Wydziału Zarządzania Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa 2018, ISBN 978-83-63962-43-2.
6. Kott J., *Rewolucja przemysłowa 4.0 a sukces przedsiębiorstwa*, [w:] Malara Z., Rutkowska M. (red.), *Innowacje w dobie technologii IT. Obszary – koncepcje – narzędzia*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2020, s. 155-165.
7. Xie D., Chen L., Liu L., Chen L., Wang H., *Actuators and sensors for application in agricultural robots: A review*, *Machines*, 10, 2022, s. 913.
8. Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, *Poradnik wynalazcy. Metodyka badania zdolności patentowej wynalazków i wzorów użytkowych*, Warszawa 2006.
9. Li L.Q., Wang D.F., Yang X., *Study on round rice straw bale wrapping silage technology and facilities*, *Int Journal of Agricultural & Biological Engineering*, 11(4), 2018, s 88-95.
10. Veer Gautam P., Kushwaha H.L., Kumar A., Kumar Kushwaha D., *Mechatronics application in precision sowing: A review*, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(4), 2019, s. 1793-1807.
11. Freyhof M., Grispos G., Pitla S., Stolle C., *Towards a cybersecurity testbed for agricultural vehicles and environments*, *Proceedings of the Seventeenth Midwest Association for Information Systems Conference*, Omaha, Nebraska, May 16-17, 2022.
12. Zhang C., Xie X., Zheng Z., Wu X., Wang W., Chen L., *A plant unit relates to missing seeding detection and reseeding for maize precision seeding*, *Agriculture*, 12, 2022, s. 1634.
13. Heikkilä M., Suomalainen J., Saukko O., Kippola T., Lähetkangas K., Koskela P., Kalliovaara J., Haapala H., Pirttiniemi J., Yastrebova A., *Unmanned agricultural tractors in private mobile networks*, *Network*, 2, 2022, s. 1-20, <https://doi.org/10.3390/network2010001>
14. Cież J., *Charakterystyka wypadków związanych z użytkowaniem ciągników rolniczych w polskim rolnictwie indywidualnym*, *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 50(4), 2005, s. 9-15.

System UNI-BUS firmy Elplant sp. z o.o. jako przykład innowacji, intuicyjności i wydajności w rolnictwie

Streszczenie

W artykule przedstawiono firmę Elplant zajmującą się projektowaniem i produkcją urządzeń elektronicznych do sterowania i kontroli pracy zespołów roboczych w maszynach rolniczych. Zaprezentowano misję firmy oraz jej dotychczasowe osiągnięcia, a przede wszystkim jej najnowsze rozwiązania, które są wynikiem realizacji grantu badawczo-rozwojowego finansowanego przez NCBiR. Omówiono 7 innowacyjnych rozwiązań specjalnego przeznaczenia o wysokim udziale elektroniki i zaawansowanych systemów automatyzacji, przewidzianych do zastosowania w takich maszynach jak: owijkarka do bel cylindrycznych, agregat uprawowo-siewny, siewnik pneumatyczny oraz siewnik rzędowy.

Słowa kluczowe: rolnictwo precyzyjne, maszyny rolnicze, elektronika, sterowanie, owijkarka, siewnik

The UNI-BUS system by Elplant sp. z o.o. as an example of innovation, intuitiveness and efficiency in agriculture

Abstract

The article presents the Elplant company, which deals with the design and production of electronic devices for controlling and controlling the work of working units in agricultural machines. The company's mission and its achievements to date were presented, and above all its latest solutions, which are the result of the implementation of a research and development grant, financed by the National Center for Research and Development. Seven innovative special-purpose solutions with a high proportion of electronics and advanced automation systems were discussed, intended for use in such machines as: cylinder bale wrapper, seed drill combination, pneumatic seed drill and seed drill.

Keywords: precision farming, agricultural machines, electronics, controlling, bale wrapper, seed drill

Dendrymery jako nanocząsteczki pełniące rolę nośników wybranych substancji i ich zastosowanie praktyczne

1. Wprowadzenie

Nanotechnologia jest nową, szybko rozwijającą się interdyscyplinarną dziedziną nauki, która znalazła zastosowanie zarówno w przemyśle, jak i w farmacji oraz medycynie [1]. W farmacji nanotechnologia jest wykorzystywana w badaniach dotyczących m.in. nowych postaci leku, drogi podania leku oraz struktury chemicznej substancji aktywnej prowadzącej do uzyskania leku o obniżonej toksyczności. Wykorzystanie nanocząsteczek w tego typu badaniach stwarza możliwość licznych zastosowań, które mają na celu zwiększenie biodostępności, uzyskanie kontrolowanego uwalniania leków, szybszego działania oraz lepszej skuteczności leku [2]. Nanocząsteczki występujące w postaci dendrymerów, kompleksów metali, liposomów, miceli, lipoprotein czy mikrokapsulek odgrywają znaczącą rolę w diagnostyce i terapii wielu chorób [3-5].

2. Cel pracy

Celem pracy było przedstawienie dendrymerów jako nowej klasy rozgałęzionych polimerów, ze szczególnym uwzględnieniem dendrymerów poli(amidoaminowych) typu PAMAM, stanowiących ważną grupę związków organicznych o specyficznych właściwościach strukturalnych, wykorzystywanych jako nośniki substancji czynnych, w tym leków, a także ich zastosowanie w praktyce.

3. Nanocząsteczkowe nośniki leków

Zaprojektowanie odpowiednich nanocząsteczek daje możliwość wykorzystania nanotechnologii do różnych celów terapeutycznych. Nanocząsteczki mogą występować w różnych formach, zarówno jako koloidy, jak i nanozole rozproszone w fazie gazowej oraz nanohydrozole zawieszone w cieczy. Dodatkowo mogą być one osadzone w matrycy jako nanokompozyty lub w substancjach stałych w postaci nanomaterii. W ostatnich latach znacząco wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem nanostruktur jako nowych sposobów transportowania i dostarczania leków z lepszą kompatybilnością oraz zdolnością docierania do miejsca celowanego (*target site*). Poprawa skuteczności działania leku możliwa jest poprzez opracowanie odpowiednich transporterów leku, które pozwalają na dostarczenie danego leku w odpowiednim stężeniu do miejsca zmienionego chorobowo,

¹ barbara.laskowska917@gmail.com, Wydział Ochrony Zdrowia, Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Jarosławiu.

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

³ anna.lewandowska@pwste.edu.pl, Wydział Ochrony Zdrowia, Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Jarosławiu.

⁴ tomasz.lewandowski@pwste.edu.pl, Wydział Inżynierii Technicznej, Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Jarosławiu.

⁵ jlechow@prz.edu.pl, Katedra Technologii i Materiałoznawstwa Chemicznego, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska.

nie wpływając przy tym na zdrowe komórki organizmu [3, 6]. W tym celu prowadzone są badania dotyczące wykorzystania różnych nanocząsteczek, takich jak dendrymery, liposomy, nanokapsułki, micelle, które mogą wpływać na poprawę właściwości farmakodynamicznych oraz farmakokinetycznych cząsteczek leku. Jest to bardzo istotne, gdyż wykorzystanie nośników leków jako jednej z metod leczenia ma istotne znaczenie szczególnie w zwalczaniu nowotworów, zakażeń bakteryjnych, grzybiczych, wirusowych, cukrzycy, a także w terapii genowej [7]. Dzięki połączeniom substancji aktywnej z nano-nośnikami poprawie ulegają istotne parametry zarówno farmakokinetyczne, jak i farmakodynamiczne leku: wydłuża się czas uwalniania substancji aktywnej oraz czas działania farmakologicznego leku, zwiększa się biodostępność, zmniejszeniu ulega toksyczność leku, natomiast poprawie ulega rozpuszczalność i stabilność substancji aktywnej. Ponadto cząsteczka transportowana jest przez nanonośnik, którego chemicznie kompatybilna i elastyczna powierzchnia jest zdolna do przyłączenia różnego typu ligandów pozwalających na dystrybucję leku w sposób ściśle kontrolowany [6, 8]. Odpowiedni nanonośnik użyty w kontrolowanym dostarczaniu leków powinien być nietoksyczny, dobrze wiązać lek, ale również umożliwić uwolnienie danej substancji w miejscu docelowym w odpowiednim stężeniu zakresu terapeutycznego. Należy także dodać, iż nanocząsteczki wykorzystywane jako nośniki substancji aktywnej mogą zwiększyć wartość terapeutyczną stosowanych leków poprzez modyfikacje ich cech fizykochemicznych: rozpuszczalności, czasu retencji i przechodzenia przez bariery biologiczne.

4. Dendrymery jako nanocząsteczki polimerowe

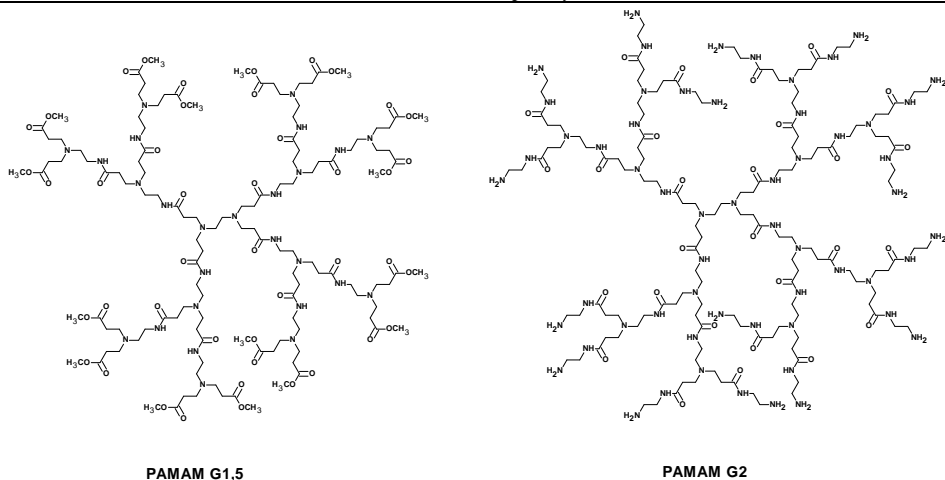
Specyficznym rodzajem nanocząsteczek polimerowych są dendrymery. Po raz pierwszy zostały one otrzymane w latach 80. XX wieku niezależnie przez zespoły badawcze Fritza Vögtle'a, Donalda Tomalii oraz zespół George'a F. Newkome'a [9]. Dendrymery to monodispersyjne makromolekuły o regularnej, wysoko rozgałęzionej, trójwymiarowej i precyzyjnie zdefiniowanej strukturze, kształcie oraz rozmiarach. Cząsteczki dendrymeryczne posiadają liczne specyficzne strukturalne i chemiczne właściwości, dzięki którym są coraz częściej wykorzystywane w badaniach biologicznych, chemicznych oraz biomedycznych [10]. Do najbardziej znanych związków dendrymerycznych należą dendrymery poli(amidoaminowe) typu PAMAM, w których strukturze wyróżnić można wielofunkcyjny rdzeń w postaci amoniaku lub etylenodiaminy, od którego promieniście odchodzą rozgałęzienia zwane dendronami. Zamiast etylenodiaminy jako rdzeń często stosuje się również inne cząsteczki zawierające pierwszo- lub drugorzędowe grupy aminowe, np. 1,4-diaminobutan. W dendrymerach typu PAMAM monomerami rozgałęziającymi są cząsteczki akrylanu metylu i etylenodiaminy. Z każdego dendronu wywodzą się kolejne rozgałęzienia, na które składają się powtarzalne jednostki stanowiące tzw. generacje G_n (gdzie: $n = 0 - 12$). Na powierzchni dendrymeru znajdują się grupy funkcyjne (m.in. $-NH_2$, $-COOH$, $-COONa$), które mogą być wykorzystane do dalszej rozbudowy cząsteczki, a ich właściwości determinują właściwości całego polimeru. Ilość sferycznych grup funkcyjnych dendrymeru zwiększa się wraz ze wzrostem generacji. W zależności od rodzaju grup końcowych wyróżnia się dwa typy generacji dendrymerów. Dendrymery generacji całkowitych to związki, które posiadają na końcu gałęzi grupy aminowe i hydroksylowe. Dendrymery generacji połówkowych posiadają natomiast karboksylowe grupy końcowe. Dendrymery niższej generacji mają asymetryczny kształt oraz otwartą strukturę, natomiast cząsteczki dendrymerów wyższych

generacji przyjmują kształt bliski sferycznemu i mają gęsto upakowaną strukturę. Po między ramionami cząsteczki dendrymeru występują puste przestrzenie, tzw. luki, które mogą być wykorzystane m.in. do transportu różnego typu molekuł charakteryzujących się aktywnością biologiczną.

5. Właściwości dendrymerów

Struktura dendrymerów ma ogromny wpływ zarówno na ich fizyczne, jak i chemiczne właściwości, a także na potencjalne zastosowanie w praktyce. Dendrymery posiadają unikalne właściwości, do których należą m.in. rozpuszczalność w wodzie, kulisty kształt (dla większych cząsteczek dendrymerów) oraz możliwości modyfikacji grup końcowych. Isotną cechą tych struktur jest ściśle określona, a nie średnia, masa cząsteczkowa, a także niska poldispersyjność. Precyzyjnie zdefiniowany rozmiar oraz kształt dendrymerów pozwala na ich przenikanie przez błony oraz sieci naczyń do miejsca docelowego, np. komórki nowotworowej. Obecność licznych grup funkcyjnych na powierzchni dendrymerów powoduje, że są one lepiej rozpuszczalne i wykazują wyższą reaktywność niż ich liniowe analogi. Rozpuszczalność dendrymerów zależy od rodzaju grup funkcyjnych na powierzchni cząsteczki. Dendrymery zakończone grupami hydrofilowymi rozpuszczają się w środowisku wodnym, a te z grupami hydrofobowymi w rozpuszczalnikach niepolarnych. Zdefiniowana liczba zewnętrznych grup funkcyjnych, a także wysoki stopień monodispersyjności daje możliwość przyłączenia określonej liczby cząsteczek leku do powierzchni polimerowego nośnika.

Wszystkie powyższe właściwości sprawiają, że dendrymery są coraz częściej z powodzeniem wykorzystywane jako transportery leków oraz różnych substancji biologicznie czynnych i dlatego powinny spełniać kilka dodatkowych kryteriów. Powinny być nietoksyczne, nieimmunogenne, biodegradowalne, posiadać zdolność wnikania do komórek, pozostawać w układzie krążenia przez czas niezbędny do osiągnięcia pożądanego efektu oraz posiadać zdolność docierania do konkretnych struktur biologicznych [11]. Należy również wspomnieć, iż dendrymery mogą wykazywać wysoką cytotoksyczność, co ogranicza ich wykorzystanie w medycynie. Cytotoksyczność dostępnych handlowo dendrymerów w dużym stopniu uzależniona jest od generacji oraz ładunku funkcyjnych grup powierzchniowych. Dendrymery kationowe zazwyczaj charakteryzują się wysoką toksycznością. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że dendrymery kationowe wyższych generacji nie są preferowane do zastosowań w farmakologii ze względu na ich właściwości hemolityczne, zmiany obserwowane w morfologii erytrocytów oraz akumulację w tkankach [12]. Mniejszą toksycznością odznaczały się natomiast dendrymery posiadające jako terminalne grupy: karboksylowe, hydroksylowe oraz eterowe. Glikol polietylenowy (PEG) jest obojętnym, nieimmunogennym i nieantygenowym polimerem o bardzo dobrej rozpuszczalności w wodzie oraz doskonałej biokompatybilności. Z tego też powodu często stosuje się proces podłączania cząsteczek PEG do dendrymerów posiadających kationowe grupy powierzchniowe w celu obniżenia toksyczności tych związków oraz wydłużenia czasu ich retencji w organizmie [13, 14]. W ostatnich latach otrzymano wiele rodzajów dendrymerów o interesujących właściwościach oraz wykazujących liczne zastosowania dzięki możliwości modyfikacji grup terminalnych oraz wykorzystania różnych związków jako rdzenia cząsteczki.



Rysunek. 1. Przykład dendrymerów PAMAM zawierających jako rdzeń etylenodiaminę, wykazujących zdolność do transportu substancji biologicznie czynnych; opracowanie własne na podstawie [11]

Najczęściej badanymi grupami dendrymerów są dendrymery PAMAM i PPI, prawdopodobnie ze względu na ich szeroką dostępność handlową. Równie szeroko przebadane zostały dendrymery fosforowe, dendrymery karbokrzemowe, dendrymery poli(L-lizynowe), poliestry (PGLSA-OH), dendrymery kwasu poli(2,2- bis(hydroksymetylo)propionowego (bis-MPA) bądź dendrymery peptydowe.

6. Zastosowanie nanocząsteczek dendrymerycznych

Dendrymery – jako związki posiadające wyjątkowe cechy strukturalne – znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach nauki i przemysłu. Są one z powodzeniem wykorzystywane w medycynie, chemii, inżynierii, a także w ochronie środowiska. Szczególnie zainteresowanie skierowane jest na zastosowanie dendrymerów w medycynie, co związane jest z poszukiwaniem coraz to nowszych i skuteczniejszych form terapii w przypadku wielu chorób. W badaniach dotyczących wykorzystania dendrymerów w medycynie wyróżnić można dwa zasadnicze kierunki. W pierwszym z nich nanocząsteczki te są wykorzystywane jako nośniki dla innych substancji. W drugim zaś prowadzone są badania dotyczące właściwości samych dendrymerów jako związków o unikalnych właściwościach.

6.1. Dendrymery jako nośniki leków

W ostatnich latach intensywnie badana jest możliwość potencjalnego biomedycznego zastosowania dendrymerów jako systemu dostarczania leków, nośniki materiału genetycznego, sztuczne białka, syntetyczne szczepionki, środki przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne, środki kontrastowe do obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (MRI), czynniki terapeutyczne w zaburzeniach neurodegeneracyjnych lub fotouczulacze w terapii ukierunkowanej.

Dendrymery są wykorzystywane do kontrolowanego uwalniania leków oraz jako nośniki słabo rozpuszczalnych leków bezpośrednio do miejsca targetowego, gdyż są one zdolne do pokonywania barier w postaci błon komórkowych, a ponadto są one transdermalne, czyli zdolne do pokonywania powłoki skórnej. Transport cząsteczki leku może odbywać się w wyniku połączenia cząsteczki za pomocą oddziaływań elektrostatycznych lub poprzez kowalencyjne związanie proleku lub innych biomolekuł jako biokoniuugat

z wykorzystaniem powierzchniowych grup dendrymerów. Kolejnym możliwym sposobem połączenia leku jest jego enkapsulacja we wnękach dendrymeru – jako kompleks *host – guest*, czyli gospodarz – gość tworzący się na podstawie rozpoznania molekularnego, które jest związane między innymi z komplementarnością odpowiednich rozmiarów molekularnych cząsteczek, a także innymi ich właściwościami [15]. Nie tylko opisane wyżej dendrymery, ale również ich połączenia typu kompleksy gospodarz – gość i biokoniugaty są także transdermalne. Stwarza to możliwość licznych zastosowań dermatologicznych, farmaceutycznych oraz biomedycznych z wykorzystaniem dendrymerów. Należy również zaznaczyć, iż cząsteczki leków poprzez związanie się do powierzchniowych grup funkcyjnych mogą być transportowane w sposób aktywny w układzie. W wyniku enkapsulacji leku, która polega na ulokowaniu aktywnych związków w wolnych przestrzeniach między ramionami dendrymeru, transport leku odbywa się w sposób pasywny [16]. W obu przypadkach uwolnienie cząsteczek leków może nastąpić pod wpływem specyficznych dla danej choroby bodźców chemicznych, do których należy między innymi reakcja utleniania lub zmiana pH środowiska, a także pod wpływem działającego na układ biologiczny pola magnetycznego, światła lub enzymów. Wymienione powyżej sposoby wiązania leku z cząsteczką dendrymeru prowadzą do immobilizacji wielu stosowanych substancji leczniczych. Cechą unikalną dendrymerów jest poliwalencyjność, która jest związana z występowaniem na powierzchni dendrymeru wielu różnych grup funkcyjnych. Polifunkcyjność tych struktur ułatwia immobilizację leków i innych farmakokinetycznych modulatorów (łańcuch PEG [17], FA [18], RGD peptyd [19] itp.) do ich powierzchni, modyfikując ją zgodnie z założonym przeznaczeniem [20, 21]. Wymienione właściwości zdecydowanie zwiększyły stopień wykorzystania dendrymerów jako nośników substancji w terapii celowanej.

Dendrymery poliamidoaminowe typu PAMAM należą do grupy polimerów, które ze względu na swoje właściwości są z powodzeniem wykorzystywane jako efektywne nośniki związków aktywnych biologicznie, w tym leków przeciwnowotworowych oraz fotouczulaczy. Do leków wykazujących aktywność przeciwnowotworową należy między innymi cisplatyna. W wyniku enkapsulacji leku we wnętrzu cząsteczki dendrymeru PAMAM uzyskano koniugaty, które odznaczają się spowolnionym uwalnianiem leku, większą koncentracją w guzie litym oraz mniejszą toksycznością w porównaniu z cisplatyną jako samodzielną cząsteczką [22]. Badania wykazały również, że z dendrymerami PAMAM dobrze wiąże się doksorubicyna (DOX), zwana też adriamycyną (ADR), która należy do leków przeciwnowotworowych zaliczanych do grupy antybiotyków antrycynowych. Pomiędzy cząsteczką leku a cząsteczką dendrymeru powstają koniugaty amidowe (PAMAM-amid-DOX) oraz hydrazonowe (PAMAM-hyd-DOX). Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że dużo korzystniejszy jest koniugat hydrazonowy, który ulega rozpadowi w środowisku kwaśnym i prowadzi do śmierci komórek linii Ca9-22 (ludzka linia raka dziąsła), zaś koniugat amidowy nie ulegał rozpadowi [23]. Badania wykazały również dobre powinowactwo tego typu dendrymerów do innych leków, takich jak metotreksat i ibuprofen [24]. Terapia PUVA to najczęściej stosowana oraz najbardziej korzystna metoda fotochemioterapii, która oparta jest na zastosowaniu fotouczulaczy. Cząsteczka fotouczulacza, aktywowana światłem, powoduje tworzenie tlenu singletowego bądź reaktywnych form tlenu, które są toksyczne dla naświetlonych komórek nowotworowych. Dendrymery poliamidoaminowe typu PAMAM zostały zastosowane jako nośniki dla 8-metoksypsoralenu, czyli fotouczulającego środka używa-

nego w terapii PUVA dla leczenia m.in. łuszczyca i bielactwa. W badaniach dotyczących metody miejscowej terapii PUVA (loca PUVA) wykazano, że dendrymery typu PAMAM wybranych generacji całkowitych i połówkowych wpływają na polepszenie właściwości transdermalnych 8-metoksypsoralenu (8-MOP), a tym samym zwiększają skuteczność terapii [25].

6.2. Dendrymery w terapii genowej

W celu ułatwienia dostarczania różnych małych cząsteczek, białek i kwasów nukleinowych niezbędna jest możliwość projektowania właściwości nanostruktur opartych na polimerach. Terapia genowa jest więc kolejnym zastosowaniem dendrymerów, w tym również dendrymerów typu PAMAM. Terapia genowa jest nową, obiecującą techniką leczenia chorób nowotworowych i zaburzeń genetycznych, która polega na wprowadzaniu obcego materiału genomowego do komórek gospodarza, aby uzyskać odpowiednie korzyści terapeutyczne. Właściwa terapia genowa oparta jest więc na opracowaniu skutecznego wektora dostarczającego. Wykazano, że podobnie jak w przypadku substancji leczniczych, dendrymery mogą oddziaływać elektrostatycznie z cząsteczkami kwasów nukleinowych i w ten sposób łączyć się z nimi [26]. Stwarza to możliwości wykorzystania ich jako niewirusowe wektory nici DNA, RNA, plazmidów czy oligonukleotydów. Dzięki tej właściwości mogą być one wykorzystane w terapii genowej jako nośniki krótkich fragmentów DNA i RNA, a także kompletnych genów. Oznacza to, że istnieje możliwość wyeliminowania uszkodzonych cząsteczek kwasów nukleinowych, a na ich miejsce mogą zostać wprowadzone nowe, prawidłowo funkcjonujące fragmenty [27]. Poliwalentna struktura dendrymerów daje również możliwość ich wykorzystania do stworzenia nowej generacji szczepionek dendrymerycznych. To właśnie dzięki obecności licznych grup sferycznych w strukturze dendrymeru, możliwe jest przyłączenie do nich identycznych bądź odmiennych antygenów, co prowadzi do zwiększenia immunogenicności szczepionki [28]. Ponadto nośniki oparte na polimerach są preferowane jako systemy kontrolowanego dostarczania leku do płuc, co jest spowodowane ich długą retencją w płucach. Dendrymery mogą być modyfikowane dodatkowymi ugrupowaniami funkcjonalnymi, jak peptydy, aby skutecznie pokonać bariery wewnątrzkomórkowe. Przeprowadzone w ostatnich latach badania dowodzą, że dendrymery PAMAM wykazują zdolność do tworzenia kompleksu z syntetycznym peptydem NLS (*nuclear-localization sequence peptide*), który został użyty w terapii genowej do dostarczania genów. W badaniach tych wykazano, że skompleksowany NLS promował translokację jądrową całego połączenia dendrymer – kwas nukleinowy, a następnie destabilizował połączenie pomiędzy dendrymerem a plazmidem w jądrze komórkowym, co w konsekwencji prowadziło do zwiększenia transfekcji genu [29].

6.3. Dendrymery o właściwościach przeciwbakteryjnych i przeciwwirusowych

Bardzo istotny jest również fakt, iż zarówno same dendrymery, jak i ich kompleksy wykazują właściwości przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe. Nanocząsteczki te ograniczają rozwój infekcji w wyniku opłaszczania komórek bakterii bądź komórek atakowanych przez bakterie i wirusy [30, 31]. Prowadzone są badania dotyczące zastosowania dendrymerów jako potencjalnych czynników antyprionowych i zabezpieczających przed formowaniem się blaszek amyloidowych. Przeciwwirusowe działanie dendrymerów badane było między innymi przeciwko wirusowi grypy z wykorzystaniem dendrymerów

opłaszczonych resztami kwasu sialowego [32]. W wyniku związania przez cząsteczki dendrymeru hemaglutyniny obecnej na powierzchni wirusa uniemożliwiona została jego adhezja do komórek ludzkich. Dendrymery PAMAM o specyficznych modyfikacjach wykazywały również działanie przeciwwirusowe wobec wirusa HSV-1 i HSV-2 w hodowlach *in vitro* na linii komórkowej HFF oraz *in vivo* u myszy jako miejscowego środka przeciwwirusowego HSV-2 [33]. Dendrymery z powodzeniem wykorzystywane są jako nośniki cząsteczek srebra w terapii antybakteryjnej, co prowadzi do wzrostu skuteczności terapii. W wyniku enkapsulacji soli srebra w dendrymerach PAMAM zaobserwowano wzrost aktywności bakteriobójczej w stosunku do Gram-ujemnych bakterii *Escherichia coli* w porównaniu do roztworów soli srebra [34, 35, 36]. Podobne wyniki badań uzyskano po zastosowaniu połączeń dendrymer – srebro podczas zwalczania drobnoustrojów, takich jak *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Staphylococcus aureus*. Dendrymery typu PAMAM zostały również przebadane pod kątem ich wykorzystania jako nośników dla indometacyny należącej do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Badania wykazały, iż niezwiązany z cząsteczką leku dendrymer PAMAM wykazywał działanie przeciwzapalne, które było porównywalne z działaniem utworzonego kompleksu dendrymer – indometacyna [37].

6.4. Mikro- i nanożele dendrymerowe

Mikro- oraz nanożele dendrymerowe to układy, które łączą w sobie cechy dendrymeru, żydrożelu oraz mikro-/nanocząsteczki. Oferują one nową platformę ze złożoną funkcjonalnością do dostarczania leków i genów. Różne techniki przygotowywania preparatów można łączyć z chemią żelowania dendrymerów. Na przykład technologia mikroprzepływowa lub procesy chemii przepływu mogą pomóc w produkcji mikrożele dendrymerowych o jednolitym rozmiarze, a także zwiększyć wydajność produkcji. Otrzymywanie dendrymerowych mikro-/nanożeli z zastosowaniem oparametryzowanej metody daje lepszą kontrolę struktury i umożliwia produkcję materiałów hybrydowych [38].

6.5. Kompleksy dendrymerów z metalami

Bardzo interesującą cechą dendrymerów jest ich zdolność do tworzenia połączeń z metalami. Tworzenie połączeń z jonami metali przez ligandy, które są obecne w strukturze dendrymeru, prowadzi do powstania kompleksów zwanych metalodendrymerami. Oddziaływanie dendrymerów z metalami stwarza możliwość rozwoju nowoczesnych technik analitycznych oraz diagnostycznych. Cząsteczki dendrymerów stanowią ważne substraty wykorzystywane do syntezy zasad Schiffa z wybranymi aldehydami. Dochodzi wówczas do utworzenia dendrymerów zawierających w swej strukturze dwu- lub wielodonorowe ligandy o zdolności wiązania jonów metali. Tak zbudowane zasady Schiffa tworzą bardzo trwałe chemicznie związki kompleksowe z metalami przejściowymi oraz metalami grup głównych [39]. 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 procesach katalizy homogenicznej i heterogenicznej, w asymetrycznej syntezie aminokwasów i peptydów, a także w wielu ważnych procesach biologicznych. Tak duże zainteresowanie iminami i ich kompleksami można tłumaczyć szerokim rozpowszechnieniem oraz zastosowaniem tych związków w syntezie organicznej, katalizie chemicznej, medycynie, farmacji, analityce, jak i w nowoczesnych technologiach [40, 41]. Dendrymery znalazły także

zastosowanie przy produkcji czynników kontrastujących. Dendrymery PAMAM generacji całkowitych z przyłączonymi kompleksami gadolinu są stosowane jako kontrasty o przedłużonym działaniu w obrazowaniu metodą magnetycznego rezonansu jądrowego oraz tomografii komputerowej [42].

7. Podsumowanie

Dendrymery to polimery charakteryzujące się niezwykłą strukturą, z której wynikają ich unikatowe właściwości. Warto również podkreślić, iż w porównaniu z wiedzą o odkrytych w zbliżonym czasie co dendrymery innych nanozwiązków – nanochemia dendrymerów jest zdecydowanie bardziej zaawansowana i bliższa licznym zastosowaniom praktycznym. Dzięki chemicznej różnorodności oraz możliwości tworzenia specyficznym rozgałęzionych nanostruktur w jednej cząsteczce dendrymery jako nanocząsteczki są strukturami atrakcyjnymi aplikacyjnie i dzięki temu z powodzeniem stosowanymi w różnych dziedzinach nauki. Wiedza na temat biologicznych właściwości dendrymerów ma duże znaczenie w kontekście poszukiwania nietoksycznych nanocząsteczek o potencjalnym zastosowaniu jako systemy dostarczania leków, środki kontrastowe do obrazowania m.in. metodą rezonansu magnetycznego, nośniki materiału genetycznego, sztuczne białka, syntetyczne szczepionki, środki przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne. W przeciwieństwie do nieorganicznych nośników leków, większość nośników polimerowych posiada możliwość biodegradacji, co zapobiega ich akumulacji w organizmie i ułatwia ich usuwanie. Należy jednak pamiętać, iż pomimo liczych zastosowań nanocząsteczek, jakimi są dendrymery, nie określono do tej pory pełnego ryzyka związanego ze stosowaniem tych nanostruktur. Dzięki regulacjom prawnym w zakresie farmacji i medycyny, głównie dotyczących badań klinicznych i wprowadzania leków do obrotu, wszystkie substancje lecznicze i technologie związane z szeroko pojętą medycyną muszą być przebadane i bezpieczne w stosowaniu. Nadal niezbędne są zatem badania dotyczące wpływu nanotechnologii na środowisko i zdrowie człowieka.

Literatura

1. Surendiran A., Sandhiya S., Pradhan S.C., Adithan C., *Novel applications of nanotechnology in medicine*, Indian Journal of Medical Research, 130, 2009, s. 689-701.
2. Koo O.M., Rubinstein I., Onyuksel H. *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 1, 2005, s. 193-212.
3. Misra R., Acharya S., Shoo S.K., *Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy*, Drug Discovery Today, 19(20), 2010, s. 842-850.
4. Ramana L.N., Sharma S., Sethuraman S., Ranga U., Krishnan UM. *Investigation on the stability of saquinavir loaded liposomes: Implication on stealth, release characteristics and cytotoxicity*. International Journal of Pharmaceutics, 431, 2012, s. 120-129.
5. Nag O.K., Awasthi V., *Surface engineering of liposomes for stealth behavior*, Pharmaceutics, 5(4), 2013, s. 542-69.
6. Szymański P., Kapka K., Mikiciuk-Olasik E., *Nanotechnologia w medycynie i farmacji*, Farmaceutyczny Przegląd Naukowy, 64, 2010, s. 23-44.
7. Szymański P., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E., *Zastosowanie nanotechnologii w medycynie i farmacji*, Lab Laboratoria, Aparatura, Badania, 1, 2012, s. 51-56.
8. Torchilin V., *Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 71, 2009, s. 431-444.

9. Tomalia D.A., Baker H., Dewald J.R., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P., *A new class of polymers: Starburst-dendritic macromolecules*, Polymer Journal, 17, 1985, s. 117-132.
10. Milhem O.M., Myles C., McKeown N.B., Attwood D., D'Emanuele A., *Polyamidoamine Starburst dendrimers as solubility enhancers*, International Journal of Pharmaceutics, 197, 2000, s. 239-241.
11. Wołowiec S., Laskowski M., Laskowska B., Magoń A., Myśliwiec B., Pyda M., *Dermatological application of PAMAM – vitamin bioconjugates and host-guest complexes. Vitamin C case study*, [w:] Innocenti A., *Stoichiometry and research. The importance of quantity in biomedicine*, IntechOpen, 2012.
12. Malik N., Wiwattanapatapee R., Klopsch R., Lorenz K., Frey H., Weener J.W., Meijer E.W., Paulus W., Duncan R., *Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo*, Journal of Controlled Release, 65, 2000, s. 133-148.
13. Luong D., Kesharwani P., Deshmukh R., Amin M.C.I.M., Gupta U., Greish K., Iyer A.K., *PEGylated PAMAM dendrimers: enhancing efficacy and mitigating toxicity for effective anticancer drug and gene delivery*, Acta Biomaterialia, 43, 2016, s. 14-29.
14. Ho M.N., Bach L.G., Nguyen D.H., Nguyen C.H., Nguyen C.K., Tran N.Q., Nguyen N.V., Thi T.T.H., *PEGylated PAMAM dendrimers loading oxaliplatin with prolonged release and high payload without burst effect*, Biopolymers, 110(7), 2019, e23272.
15. D'Emanuele A., Attwood D., *Dendrimer–drug interactions*, Advanced Drug Delivery Reviews, 57, 2005, s. 2147-2162.
16. Caminade A.M., Laurent R., Majoral J.P., *Characterization of dendrimers*, Advanced Drug Delivery Reviews, 57, 2005, s. 2130-2146.
17. Guillaudeau S.J., Fox M.E., Haidar Y.M., Dy E.E., Szoka F.C., Fréchet J.M., *PEGylated dendrimers with core functionality for biological applications*, Bioconjugate Chemistry, 2, 2008, s. 461-469.
18. Kang C., Yuan X., Li F., Pu P., Yu S., Shen C., Zhang Z., Zhang Y., *Evaluation of folate-PAMAM for the delivery of antisense oligonucleotides to rat C6 glioma cells in vitro and in vivo*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 93, 2010, s. 585-594.
19. Zhu S., Qian L., Hong M., Zhang L., Pei Y., Jiang Y., *RGD-modified PEG-PAMAM-DOX conjugate: in vitro and in vivo targeting to both tumor neovascular endothelial cells and tumor cells*, Advanced Materials, 23, 2011, s. 84-89.
20. Svenson S., Tomalia D.A., *Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field*, Advanced Drug Delivery Reviews, 57, 2005, s. 2106-2129.
21. Sękowski S., Miłowska K., Gabryelak T., *Dendrimers in biomedical sciences and nanotechnology*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 62, 2008, s. 725-733.
22. Malik N., Evagorou E.G., Duncan R., *Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy*, Anticancer Drugs, 10, 1999, s. 767-776.
23. Lai P.S., Lou P.J., Peng C.L., Pai C.L., Yen W.N., Huang M.Y., Young T.H., Shieh M.J., *Doxorubicin delivery by polyamidoamine dendrimer conjugation and photochemical internalization for cancer therapy*, Journal of Controlled Release, 122, 2007, s. 39-46.
24. Kolhe P., Misra E., Kannan R.M., Kannan S., Lieh-Lai M., *Drug complexation in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers*, International Journal of Pharmaceutics, 259, 2003, s. 143-160.
25. Borowska K., Laskowska B., Magoń A., Myśliwiec B., Pyda M., Wołowiec S., *PAMAM dendrimers as solubilizers and hosts for 8-methoxypsoralene enabling transdermal diffusion of the guest*, International Journal of Pharmaceutics, 248(1-2), 2010, s. 185-189.

26. Bielinska A.U., Chen C., Johnson J., Baker J.R. Jr., *DNA complexing with polyamidoamine dendrimers: implications for transfection*, *Bioconjugate Chemistry*, 10, 1999, s. 843-850.
27. Bielinska A., Kukowska-Latallo J.F., Johnson J., Tomalia D.A., Baker J.R. Jr., *Regulation of in vitro gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers*, *Nucleic Acids Research*, 24, 1996, s. 2176-2182.
28. Urbańczyk-Lipkowska Z., *Dendrimery w naukach biomedycznych*, *Gazeta Farmaceutyczna*, 11, 2008, s. 34-36.
29. Cooper R.C., Yang H., *Duplex of polyamidoamine dendrimer/customdesigned nuclear-localization sequence peptide for enhanced gene delivery*, *Bioelectricity*, 2, 2020, s. 150-157.
30. Klajnert B., Bryszewska M., *Dendrimers in medicine*, Nova Science Publishers, 2007, s. 50-53.
31. Bourne N., Stanberry L.R., Kern E.R., Holan G., Matthews B., Bernstein D.I., *Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2000, s. 2471-2474.
32. Roy R., Zanini D., Meunier S.J., Romanowska A., *Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus haemagglutinin*, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 24, 1993, s. 1869-1872.
33. Bourne N., Stanberry L.R., Kern E.R., *Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2000, s. 2471-2474.
34. Balogh L., Swanson D.R., Tomalia D.A., Hagnauer G.L., McManus A.T., *Dendrimer-silver complexes and nanocomposites as antimicrobial agents*, *Nano Letters*, 1, 2001, s. 18-21.
35. Balogh L., Bielinska A., Eichman J.D., Valluzzi R., Lee I., Baker J.R., Lawrence T.E., Khan M.K., *Dendrimer nanocomposites in medicine*, *Chimica Oggi – Chemistry Today*, 20, 2002, s. 35-40.
36. Chen C.Z., Cooper S.L., *Interactions between dendrimer biocides and bacterial membranes*, *Biomaterials*, 23, 2002, s. 3359-3368.
37. Chauhan A.S., Diwan P.V., Jain N.K., Tomalia D.A., *Unexpected in vivo anti-inflammatory activity observed for simple, surface functionalized poly-(amidoamine) dendrimers*, *Biomacromolecules*, 10, 2009, s. 1195-1202.
38. Wang J., Li B., Huang D., Norat P., Grannonico M., Cooper R.C., Gui Q., Chow W.N., Liu X., Yang H., *Nano-in-nano dendrimer gel particles for efficient topical delivery of antiglaucoma drugs into the eye*, *Chemical Engineering Journal*, 425, 2021, s. 130498.
39. 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.
40. Krygowski T.M., Woźniak K., Anulewicz R., Pawlak D., Kołodziejewski 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.
41. 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.
42. Svenson S., Tomalia D.A., *Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 2005, s. 2106-2129.

Dendrymery jako nanocząsteczki pełniące rolę nośników wybranych substancji i ich zastosowanie praktyczne

Streszczenie

Nanotechnologia jest nową, szybko rozwijającą się interdyscyplinarną dziedziną nauki, która znalazła zastosowanie zarówno w przemyśle, jak i w farmacji oraz medycynie. W farmacji nanotechnologia jest wykorzystywana w badaniach dotyczących m.in. nowych postaci leku, drogi podania leku oraz struktury chemicznej substancji aktywnej prowadzącej do uzyskania leku o obniżonej toksyczności. W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie nowoczesnymi metodami dostarczania leków z zastosowaniem nanocząsteczek polimerowych. Specyficznym rodzajem nanocząsteczek polimerowych są dendrymery. Dendrymery są wykorzystywane do kontrolowanego uwalniania leków oraz jako nośniki słabo rozpuszczalnych leków bezpośrednio do miejsca targetowego, gdyż są one zdolne do pokonywania barier w postaci błon komórkowych, a ponadto są transdermalne.

Słowa kluczowe: nanocząsteczki, dendrymery, nośniki substancji

Dendrimers – nanoparticles serving as carriers of selected substances and their practical application

Abstract

Nanotechnology is a new, fast-growing interdisciplinary field of science that has been found applicable in industry as well as in pharmacy and medicine. In pharmacy, nanotechnology is used in research on, among others, new drug forms, the route of drug administration and the chemical structure of the active substance leading to obtainment of drug with reduced toxicity. In recent years, interest in modern methods of drug delivery using polymer nanoparticles has increased. Dendrimers are a specific type of polymer nanoparticles. Dendrimers are used for the controlled release of drugs and as carriers of poorly soluble drugs transporting them directly to the target site, as they are able to overcome barriers of cell membranes and are also transdermal.

Keywords: nanoparticles, dendrimers, carriers of substances

Przykłady zastosowań wybranych metod sensorycznych i analitycznych w ocenie oddziaływania zapachowego

1. Wprowadzenie

Emisja odorów jest powiązana niemal ze wszystkimi gałęziami przemysłu (m.in. z hodowlą zwierząt, gospodarką odpadami, gospodarką wodno-ściekową, przemysłem chemicznym, paszowym, spożywczym, garbarskim, rafineryjnym), z codzienną działalnością człowieka (np. emisja gazów z pojazdów samochodowych) lub ze zjawiskami naturalnymi (np. zakwit glonów). Długotrwałe narażenie na uciążliwe zapachy może powodować depresję, zmęczenie, problemy z oddychaniem, bóle głowy, nudności, podrażnienie oczu i gardła [1]. Dlatego też ograniczenie emisji odorów powinno być priorytetem dla tych gałęzi przemysłu, które są odpowiedzialne za wprowadzanie związków zapachowych do powietrza. Konieczna jest jednak weryfikacja skuteczności podejmowanych działań. Głównymi metodami stosowanymi w analizie oddziaływania zapachowego są metody sensoryczne, do których zaliczyć można olfaktometrię dynamiczną, olfaktometrię terenową, a także badania terenowe intensywności i częstości występowania określonych, charakterystycznych dla danych źródeł emisji rodzajów zapachu. Wykorzystywane są także metody analityczne, do których zaliczyć można m.in. chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS), czujniki specyficzne oraz elektroniczne nosy [2].

W olfaktometrii dynamicznej oznaczanie stężenia zapachowego, wyrażonego w ou/m^3 , uzyskuje się poprzez przedstawienie próbki zespołowi przeszkolonych osób o zweryfikowanej wrażliwości węchowej (czyli tzw. probantom), zgodnie z procedurami określonymi w normie PN-EN 13725 [3]. Pomiaru te dają informację o stężeniu odorów jako mieszaniny, jednak nie pozwalają na określenie składu chemicznego badanej próbki gazu. Metoda GC-MS z kolei pozwala na określenie stężenia poszczególnych odorantów wyrażonego w g/m^3 , ale nie uwzględnia interakcji między odorantami w badanej próbce i nie pozwala na pełne określenie wrażenia węchowego, które dana mieszanina może wywoływać [4]. Interesującym podejściem jest połączenie GC-MS z portem olfaktometrycznym (GC-O-MS) tak, aby każdy składnik chemiczny analizowanego zapachu trafiał do ludzkiego nosa w celu oceny. Jednak metodą tą nie można uzyskać informacji o stężeniu zapachu lub skomplikowanych interakcjach odorantów [5]. Ponadto powyższe techniki nie mogą być stosowane *in situ* i, co jest z tym związane, wymagają dostarczenia próbek do laboratorium w celu analizy. Omówione wyżej metody są zazwyczaj stosowane w celu oceny źródeł emisji zapachu.

¹ justyna.jonca@pwr.edu.pl, Katedra Inżynierii Ochrony Środowiska, Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Wroclawska, <https://wis.pwr.edu.pl/>.

² urszula.miller@pwr.edu.pl, Katedra Inżynierii Ochrony Środowiska, Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Wroclawska, <https://wis.pwr.edu.pl/>.

³ izabela.sowka@pwr.edu.pl, Katedra Inżynierii Ochrony Środowiska, Wydział Inżynierii Środowiska, Politechnika Wroclawska, <https://wis.pwr.edu.pl/>.

Do technik pomiarów *in situ* należą olfaktometria terenowa. Podczas pomiarów oznaczany jest parametr D/T (ang. *Dilution to odor detection Threshold*), czyli stosunek rozcieńczenia próbki zapachowej czystym powietrzem do progu wyczuwalności zapachu, który można przeliczyć na stężenie zapachowe [6] wyrażone w ou/m^3 . Metoda ta nie może być jednak stosowana w sposób ciągły. W takim przypadku stosowane są częściej czujniki gazowe, które służą do pomiarów stężenia wybranych odorantów, np. H_2S czy NH_3 [7]. Jednak próbki zapachowe zwykle składają się z setek różnych związków chemicznych, a ponieważ trudno jest wyprodukować selektywne czujniki dla każdego z nich, metoda ta może nie uwzględniać wszystkich substancji odpowiadających za oddziaływanie zapachowe. Rozwiązaniem mogą tu być elektroniczne nosy, dzięki którym można uzyskać częściowo informację na temat składu chemicznego próbek zapachowych. Co więcej, elektroniczne nosy mogą być zaprojektowane w celu rozróżniania źródeł zapachu czy też w celu identyfikacji dominujących źródeł zapachów. Konstrukcja elektronicznych nosów jest procesem skomplikowanym, na który może mieć wpływ wiele czynników, głównie związanych z doborem czujników, opracowaniem modeli i jakością danych wykorzystywanych do ich uczenia. Omówione wyżej metody są zazwyczaj stosowane w celu dokonania charakterystyki emisji zapachu. Warto zaznaczyć, że pomiary z wykorzystaniem czujników i nosów elektronicznych dają możliwość wykonywania pomiarów w sposób ciągły i, co jest z tym związane, mogą być instalowane na stacjach monitorujących jakość powietrza.

W tabeli 1 podsumowano sensoryczne i analityczne metody pomiarowe. Wybór odpowiedniej metody badań powinien być dokonywany indywidualnie dla każdego rozważanego przypadku. Zaawansowanym sposobem analizy substancji zapachowych jest połączenie metod sensorycznych i analitycznych jako uzupełniających się podejść, a tym samym uzyskanie maksimum informacji o analizowanych próbkach [2].

Tabela 1. Porównanie sensorycznych i analitycznych metod badania zapachowych próbek gazów

Metoda pomiarowa	Informacja o chemicznym składzie próbki	Informacja o oddziaływaniu zapachowym	Możliwość pomiarów <i>in situ</i>	Możliwość ciągłego monitoringu
Olfaktometria dynamiczna	nie	tak	nie	nie
Olfaktometria terenowa	nie	tak	tak	nie
GC-MS	tak	nie	tak	nie
GC-O-MS	tak	częściowo	nie	nie
Czujniki specyficzne	tak	nie	tak	tak
Elektroniczne nosy	częściowo	częściowo	tak	tak

Źródło: opracowanie własne na podstawie [2].

Niniejsza praca opisuje zasady działania, wady i zalety wybranych sensorycznych oraz analitycznych metod wykorzystywanych w badaniach oceny oddziaływania zapachowego (rozdziały 2 i 3) oraz przedstawia przykłady wykorzystania tychże technik na terenie wybranych obiektów i w ich okolicach. Szczególną uwagę zwrócono na te prace, w których wykorzystano interdyscyplinarne podejście do kwestii analizy próbek odorogennych gazów (rozdział 4).

2. Metody sensoryczne

2.1. Olfaktometria dynamiczna

Olfaktometria dynamiczna to metoda sensoryczna znormalizowana zgodnie z zapisami normy europejskiej EN 13725:2022 [3]. Jej zastosowanie pozwala na określenie w próbce gazu stężenia zapachowego odnoszącego się do wrażenia węchowego, jakie wywołuje on na zespół odpowiednio dobranych osób bezpośrednio narażonych na przedstawiany zapach. Stężenie zapachowe, wyrażone w europejskich jednostkach zapachowych na metr sześcienny (ou_E/m^3), reprezentuje liczbę rozcieńczeń neutralnym powietrzem, które są niezbędne do doprowadzenia stężenia próbki do progu wykrywalności zapachu, tj. progu, przy którym zapach badanej próbki odczuwa 50% panelistów. Analizę przeprowadza się, przedstawiając próbkę probantom w rosnących stężeniach za pomocą urządzenia rozcieńczającego, zwanego olfaktometrem (rys. 1). Próbki rozcieńczane są bezwonnym powietrzem zgodnie z zadanymi proporcjami. W celu zapewnienia rzetelnych i powtarzalnych wyników norma EN 13725:2022 ustala precyzyjne kryteria doboru probantów na podstawie indywidualnego progu wyczuwalności węchowej n-butanolu w azocie (między 20 a 80 ppb) oraz odchylenia standardowego indywidualnych odpowiedzi, które należy weryfikować cyklicznie.



Rysunek 1. Olfaktometr dynamiczny T08 (Ecoma) [opracowanie własne]

Olfaktometria dynamiczna służy do charakteryzowania źródeł emisji zapachów. Dostarczając informacji o stężeniu zapachowym, można dokonać m.in. oceny skuteczności systemów ograniczania emisji odorów lub – w połączeniu z modelami dyspersji zanieczyszczeń w powietrzu – oceny zasięgu oddziaływania zapachowego danego obiektu. Połączenie informacji nt. stężenia zapachowego z informacjami dotyczącymi natężenia przepływu gazów, geometrii i charakterystyki źródła emisji pozwala na ocenę wskaźnika emisji odorów (OER). Wskaźnik ten jest zasadniczo strumieniem zapachów emitowanych do atmosfery i wyrażany jest w ou_E/s . Przyjęta metoda szacowania OER zależy od rodzaju źródła i jest różna dla źródeł punktowych, objętościowych czy powierzchniowych [9]. Wartości emisji odorów można wykorzystać jako dane wejściowe do określonych modeli matematycznych, które łączą te informacje z danymi meteorologicznymi i topograficz-

nymi w celu określenia dyspersji zanieczyszczeń w powietrzu i zasięgu oddziaływania danych źródeł emisji.

Obiektywne określenie stężenia odorów za pomocą olfaktometrii dynamicznej sprawia, że ta metoda analizy próbek zapachowych jest użytecznym narzędziem do ogólnej oceny wydajności i skuteczności systemów dezodoryzacji. Technika ta może być stosowana np. do testowania wydajności biofiltrów poprzez analizę próbek pobranych na wlocie i wylocie z układu oczyszczającego odorogenne gazy [10]. Ponadto technika ta pozwala na weryfikację zgodności wielkości emisji i stężeń imisyjnych z wartościami dopuszczalnymi ustalonymi przez właściwe organy.

Najczęstsze zastosowanie olfaktometrii dynamicznej wiąże się z jej połączeniem z modelowaniem dyspersji, gdyż samo określenie stężenia odorów u źródła może nie być wystarczające do oceny wpływu emisji odorów na otoczenie. Na przykład badania olfaktometryczne przeprowadzone w różnych porach roku przez Sironi i wsp. [11] pozwoliły na oszacowanie łącznej emisji odorów emitowanych przez cztery zakłady utylizacji odpadów oraz na identyfikację głównego czynnika odpowiedzialnego za występowanie uciążliwości zapachowej. Wyniki tych badań posłużyły jako dane wejściowe do modelu CALPUFF i pozwoliły na ilościowe określenie wpływu odorów na otoczenie monitorowanych zakładów. Z kolei Romanik i wsp. [10] przedstawili analizę porównawczą, opartą na połączeniu olfaktometrii dynamicznej i modelowania dyspersji, dla działalności przemysłowej przed i po zainstalowaniu urządzeń ograniczających emisję odorów do atmosfery. Uzyskane wyniki spełniły dwójaki cel, jakim było: zaproponowanie eksperymentalnej procedury oceny oddziaływania zapachów oraz ocena skuteczności interwencji technicznej w zakresie redukcji emisji odorów.

Należy pamiętać, że mimo wielu zalet olfaktometria dynamiczna to nieciągła metoda pomiarowa, ponieważ próbki są pobierane u źródła w określonym momencie, a następnie transportowane i analizowane w laboratorium. Z tego powodu nie można jej używać do ciągłego monitorowania emisji zapachów, co stanowi główną wadę tej metody.

2.2. Olfaktometria terenowa

Olfaktometria terenowa jest metodą sensoryczną przyjętą do ilościowego oznaczania zapachów w otaczającym powietrzu za pomocą przenośnych urządzeń zwanych olfaktometrami terenowymi (rys. 2). Olfaktometr terenowy pozwala na rozcieńczenie otaczającego powietrza poprzez oczyszczanie jego części na filtry węglowym w różnych proporcjach (D/T). Analiza jest przeprowadzana przez przeszkolonych probantów bezpośrednio na terenie obiektów emitujących odory i dostarcza jako wynik stosunek rozcieńczenia próbki zapachowej do wartości progowej jego wyczuwalności.

Uzyskany parametr D/T można przeliczyć na stężenie zapachowe [6] wyrażone w ou/m^3 . Duża zmienność wyników, spowodowana kilkoma niekontrolowanymi czynnikami (jak kierunek i prędkość wiatru, sugestie wizualne), jest jedną z głównych wad olfaktometrii terenowej. Kolejne istotne ograniczenie wiąże się z faktem, że olfaktometria terenowa nie pozwala na odróżnienie zapachu badanego źródła od zapachu tła, jak ma to miejsce w przypadku olfaktometrii dynamicznej. W konsekwencji olfaktometria terenowa dostarcza informacji, które trudno porównać z jakąkolwiek inną techniką umożliwiającą ocenę zapachów w powietrzu.



Rysunek 2. Olfaktometr terenowy Nasal Ranger firmy St. Croix Sensory, Inc. (góra) oraz tarcze do rozcieńczeń (dół) do uzyskania niższych (zdjęcie po lewej stronie) oraz wyższych rozcieńczeń (zdjęcie po prawej stronie) próbek zapachowych [opracowanie własne]

Olfaktometria terenowa jest głównie wykorzystywana do oceny oddziaływania zapachowego w sąsiedztwie potencjalnych źródeł emisji [6, 12]. W 2018 roku Badach i. [12] zaproponowali zastosowanie olfaktometrii terenowej do oceny oddziaływania zapachowego w pobliżu składowiska odpadów komunalnych. Punkty pomiarowe usytuowano wzdłuż granic składowiska. Podczas pomiarów rejestrowano temperaturę otoczenia, prędkość i kierunek wiatru oraz wilgotność względną powietrza. Wyniki olfaktometrii terenowej wykorzystano jako dane wejściowe do modelu CALPUFF. Wyniki modelowania dostarczyły informacje przydatne w procesie lokalnego planowania przestrzennego. Autorzy zwrócili uwagę, że wykorzystanie danych uzyskanych za pomocą olfaktometrii terenowej jako danych wejściowych do modelowania dyspersji zapachu może być cennym rozwiązaniem. Nie podano jednak szczegółowych informacji o strategiach uwzględniających dużą zmienność wyników oraz nie podano kryteriów przyjętych do szacowania strumieni emisji odorów na podstawie zmierzonych stężeń.

Ostatnio Pawnuik i wsp. [6] wykorzystali olfaktometrię terenową do identyfikacji źródeł emisji zapachów na terenie zakładu gospodarowania odpadami, gdzie zlokalizowanych było 36 punktów pomiarowych w bezpośrednim sąsiedztwie potencjalnych źródeł emisji odorów. Wyniki badań posłużyły ocenie zmienności zapachów w ujęciu czasowym i przestrzennym. Jednak rozkłady przestrzenne otrzymane wybraną metodą interpolacji (IDW, ang. *inverse-distance weighting*) charakteryzowały się dużymi błędami i zaobserwowano, iż wartości uzyskanych stężeń zapachowych były zawyżone. Autorzy podkreślają w swojej pracy, że potrzebne są dalsze badania nad metodami obliczeniowymi, w tym zaawansowanymi metodami interpolacyjnymi czy modelowaniem dyspersji z wykorzystaniem danych uzyskanych metodą olfaktometrii terenowej.

2.3. Badania terenowe

Badania terenowe zapewniają ocenę narażenia na zapachy w określonych odległościach od źródła emisji odorów. Polegają one na bezpośredniej analizie zapachów występujących na danym obszarze przez wykwalifikowanych członków zespołu. Można zastosować dwa różne podejścia do badań terenowych:

- metoda siatki (EN 16841-1:2017) [13];
- metoda smugi (EN 16841-2:2017) [14].

Metoda siatki to metoda badania statystycznego, która jest stosowana na ocenianym obszarze przez wystarczająco długi okres czasu, aby zapewnić reprezentatywną mapę narażenia na zapach w sąsiedztwie jego źródła. Jednostką miary metody jest rodzaj, intensywność i częstotliwość występowania zapachu w danym kwadracie oceny, reprezentowanym przez cztery punkty pomiarowe. Dla każdego punktu siatki należy przeprowadzić pomiary w ramach czasowych obejmujących różne warunki meteorologiczne, pory roku i dnia, tak aby ocena mogła być reprezentatywna dla różnych faz aktywności charakteryzowanego źródła. Podczas analizy w każdym z punktów siatki probanci wdychają otaczające powietrze przez 10 minut i co 10 sekund rejestrują rodzaj oraz intensywność wyczuwanego zapachu. Analizując całkowitą liczbę pojedynczych pomiarów przeprowadzonych w tych czterech punktach pomiarowych, a także liczbę pomiarów, w których zidentyfikowano obecność danego zapachu, można obliczyć częstotliwość jego występowania na danym kwadracie pomiarowym.

Pomiary terenowe w smudze uzależnione są od warunków meteorologicznych panujących w momencie pomiaru. Punkty pomiarowe wyznaczane są zgodnie z kierunkiem smugi z danego obiektu, dla którego przeprowadza się ocenę oddziaływania zapachowego. Na rozmieszczenie punktów pomiarowych bezpośredni wpływ mają parametry takie jak kierunek i prędkość wiatru oraz stan równowagi atmosfery. Oceniający oddalają się od zakładu zgodnie z kierunkiem smugi, aż do momentu, gdy zapach przestaje być wyczuwalny. Nachodząc w kierunku zakładu różnymi drogami określa się najdalszą odległość, w której badany obiekt jest źródłem oddziaływania zapachowego, a następnie wyznacza punkty pomiarowe w liniach położonych pod odpowiednim kątem do osi smugi. W każdym punkcie pomiar wykonywany jest przez 10 minut. Podobnie jak w przypadku pomiarów w siatce, parametrem oceny oddziaływania zapachowego jest intensywność i częstość występowania danego zapachu podczas pojedynczego cyklu pomiarowego [15].

Inspekcje terenowe można zastosować do bezpośredniej oceny obecności/nieobecności odoru, stopnia jego uciążliwości oraz zasięgu oddziaływania w określonych warunkach meteorologicznych. Badania terenowe są stosunkowo czasochłonne i kosztowne, a ograniczeniem tej techniki jest to, że nie można jej stosować do oceny stężenia zapachów, a jedynie do określenia charakterystyki otaczającego powietrza pod względem charakteru i intensywności zapachów oraz zasięgu i częstości ich występowania.

Badania terenowe metodą siatki przeprowadzili np. Mannebeck i wsp.. [16] w dwóch niemieckich miastach charakteryzujących się obecnością kilku obszarów przemysłowych w bliskiej odległości od obszarów mieszkalnych. W sumie zaangażowanych było 21 inspektorów terenowych, a badania trwały około sześciu miesięcy i dostarczyły łącznie 157 pomiarów. Wyniki badań wykazały, że częstotliwość występowania odorów przekroczyła 10% dla większości punktów receptorowych, a w najbliższym sąsiedztwie terenów przemysłowych wartość ta wynosiła nawet 40%. Z kolei Yacoof i wsp. [17]

w celu oceny oddziaływania zapachowego z olejarni palmowej zaproponowali porównanie wyników uzyskanych dwiema technikami badań: przy pomocy pomiarów terenowych metodą smugi i modelowania dyspersji przy użyciu modelu CALPUFF. Inspekcje terenowe przeprowadzone zostały przez pięciu panelistów wyposażonych w olfaktometrię terenową SCENTROID SM100, a do modelu CALPUFF wprowadzone zostały dane uzyskane z pomiarów z wykorzystaniem olfaktometrii dynamicznej. Wyniki obu metod różniły się co do uzyskanych wartości stężenia zapachowego, ale wykazywały te same tendencje zmienności w założonym czasie badań.

2.4. Dzienniki obserwacji zapachu

Prowadzenie dzienników obserwacji zapachu to praktyka wymagająca współpracy społeczeństwa i naukowców. Obywatele proszeni są o wypełnienie specjalnie przygotowanych zeszytów zawierających ankiety uwzględniające szczegółowe pytania dotyczące m.in. czasu trwania, częstotliwości, intensywności oraz rodzaju lub źródła odorów, które wpływają na komfort życia w określonym przedziale czasowym. Prowadzenie dzienników obserwacji zapachów umożliwia tworzenie dużych zbiorów danych i – co za tym idzie – angażuje społeczeństwo w mapowanie i zarządzanie problemami zapachowymi. Wyniki tych badań spotykają się z zainteresowaniem szerokiej gamy interesariuszy ze wszystkich obszarów, takich jak opinia publiczna, decydenci, urzędnicy, naukowcy, partnerzy przemysłowi i organizacje pozarządowe. Włączenie obywateli do badań może być jednak trudne, ponieważ metoda prowadzenia dziennika obserwacji zapachów wymaga przeszkolenia, dużego zaangażowania oraz systematyczności. Dlatego ostateczna interpretacja danych powinna uwzględniać te elementy zmienności w gromadzeniu i analizie danych.

W 2018 roku Sówka i wsp. [18] przedstawili wyniki badań terenowych i socjologicznych, których celem było rozpoznanie źródeł odorów i uciążliwości zapachowych na wybranym obszarze miejskim położonym w południowej części Polski. Pomiarów terenowych przeprowadzono zgodnie z niemiecką normą VDI 3940. Dzienniki zapachowe zawierały pytania dotyczące rodzaju i źródła zapachu oraz subiektywnej oceny stopnia uciążliwości zapachowej. Przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację dominujących źródeł emisji oraz stopnia ich oddziaływania na obszar badanego miasta i gminy, a także na weryfikację skarg i identyfikację obszaru, na którym występuje największa uciążliwość zapachowa.

3. Metody analityczne

3.1. GC-MS

Analiza chemiczna próbek zapachowych polega na pełnej identyfikacji i oznaczeniu ilościowym związków chemicznych w próbce zapachowej za pomocą różnego rodzaju technik instrumentalnych. Najpowszechniejszą techniką proponowaną w literaturze naukowej jest chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS). GC-MS łączy zdolność rozdzielania chromatografii gazowej (GC), opartej na chemiczno-fizycznych właściwościach składników mieszaniny, ze spektrometrią mas (MS), która rozbijając każdą cząsteczkę na zjonizowane fragmenty, zapewnia unikalny „odcisk palca” (widmo masowe) wykrytych związków, umożliwiając w ten sposób identyfikację składu mieszaniny.

Identyfikacja i oznaczenie ilościowe związków chemicznych mają fundamentalne znaczenie dla oceny wpływu emitowanych związków, w tym zapachowych, na środowisko i zdrowie ludzi. Charakterystyka chemiczna umożliwi chociażby ocenę zgodności emisji z wymaganymi stężeniami, które są ustalane przez właściwe organy w celu ochrony pracowników i obywateli przed narażeniem na niebezpieczne lub toksyczne związki.

W literaturze w celu powiązania składu chemicznego mieszaniny zapachowej z jej stężeniem zapachowym stosuje się tzw. wskaźnik aktywności zapachowej (OAV) [19], który definiuje się jako sumę stosunków między stężeniem każdego związku w mieszaninie a jego stężeniem progowym (czyli takim stężeniem tego związku, przy którym 50% populacji odczuwa wrażenie węchowe):

$$OAV = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{OT_i}$$

gdzie: OAV to wskaźnik aktywności zapachowej (ou/m³), C_i to analityczne stężenie związku *i* (mg/m³), a OT_i to próg wykrywalności zapachowej związku *i* (mg/ou).

Z prowadzonych badań wynika, że obliczone wartości OAV mogą odbiegać od rzeczywistych stężeń zapachowych [20]. Jednym ze źródeł błędnych wyników jest szeroki zakres wartości progów wyczuwalności węchowej poszczególnych odorantów (OT) podawany w literaturze [21]. Ponadto mogą wystąpić interakcje pomiędzy poszczególnymi związkami o charakterze zapachowym (efekty synergiczne lub maskujące), w wyniku których powstaje mieszanina o odmiennej charakterystyce zapachowej.

Chociaż analiza chemiczna nie dostarcza informacji bezpośrednio związanych z odbiorem zapachów, w kilku artykułach naukowych zaproponowano wskaźnik OAV do analizy źródeł emisji zapachu. Liu i wsp. [22] badali stężenia lotnych związków organicznych (LZO) emitowanych ze świeżo zebranych odpadów komunalnych. Na podstawie uzyskanych wartości obliczona została wartość wskaźnika OAV. Jako dominujący związek w pobranych próbkach gazów obok siarczku metylu, disiarczku dimetylu i octanu etylu został zidentyfikowany etanol. Odpady łatwo biodegradowalne były dominującym źródłem LZO. Gdy ich ilość została zmniejszona z 60% do 15%, wartość wskaźnika OAV zmniejszyła się z 244,51 do 61,46. Nie przeprowadzono jednak walidacji uzyskanych wyników z olfaktometrią dynamiczną.

3.2. GC-O-MS

GC-O-MS to metoda instrumentalna obejmująca system spektrometrii mas z chromatografią gazową (GC-MS) wyposażony w port olfaktometryczny. Na końcu kolumny GC eluowany strumień gazów jest dzielony na równe części między detektor MS i port olfaktometryczny. Przeszkolony panelista wącha gaz w porcie olfaktometrycznym w celu uzyskania informacji sensorycznej w kwestii obecności zapachu, jego stężenia czy intensywności [5]. GC-O-MS dostarcza zatem informacji o charakterze zapachowym poszczególnych składników mieszaniny zapachowej, co pozwala oszacować ich względny wpływ na całkowity zapach próbki [23, 24]. Jednak GC-O-MS jest metodą kosztowną i czasochłonną, która nie pozwala na oszacowanie całościowego stężenia zapachowego w próbkach (jak to ma miejsce w przypadku olfaktometrii dynamicznej). Ponadto, ponieważ GC-O-MS rozdziela próbkę zapachową na pojedyncze składniki, określane są cechy olfaktometryczne poszczególnych związków, a nie całej mieszaniny

zapachowej. Z tego powodu dane z analizy GC-O-MS nie mogą dostarczyć informacji o zapachu mieszaniny odorantów i nie mogą być bezpośrednio wykorzystane jako dane wejściowe do modelowania dyspersji odorów. W niektórych przypadkach możliwa jest jednak korelacja między stężeniem zapachowym uzyskanym za pomocą olfaktometrii dynamicznej a stężeniem poszczególnych odorantów zmierzonych za pomocą GC-O-MS w celu wyodrębnienia dominującej molekuly zapachowej [25].

Typowe zastosowania GC-O-MS obejmują charakterystykę źródeł emisji zapachu, mającą na celu jakościową i ilościową analizę kluczowych związków odpowiedzialnych za właściwości odorogenne. Na przykład w 2015 roku Zhang i wsp. [26] skupili się na opracowaniu metody oceny zapachów w celu analizy ilościowej kluczowych odorantów odpowiedzialnych za zapach pochodzący z hodowli zwierząt. Autorzy nie tylko wyizolowali LZO odpowiedzialne za zapach, ale oszacowali też korelację między intensywnością zapachu a stężeniem substancji chemicznych. W 2018 roku Fisher i wsp. [27] zaproponowali użycie techniki GC-O-MS do charakteryzowania emisji odorów z oczyszczalni ścieków, udowadniając przydatność tej metody do identyfikacji związków odpowiedzialnych za emisję zapachów podczas przetwarzania biodegradowalnej frakcji stałej (tj. osadów ściekowych), a opis ich właściwości zapachowych dostarczył tzw. koła zapachowe.

3.3. Czujniki gazu

Czujniki specyficzne. W rzadkich przypadkach problem zanieczyszczenia zapachami wynika głównie z obecności pojedynczego związku. Wówczas bardzo przydatne są specyficzne czujniki gazów. W monitorowaniu zapachu bardzo często oznacza się stężenie amoniaku i siarkowodoru. W zależności od oczekiwanych zakresów stężeń, do ilościowego oznaczania docelowego związku zapachowego można zastosować różne narzędzia. Gdy stężenia są dość wysokie (od 1 ppm do 10 ppm), można zastosować czujniki elektrochemiczne, które są łatwe w użyciu i stosunkowo tanie. Czujniki elektrochemiczne łączą chemicznie selektywną warstwę z przetwornikiem elektrochemicznym. W ten sposób energia chemiczna selektywnej interakcji między warstwą czułą a związkiem docelowym jest przetwarzana na sygnał analityczny, który można skorelować ze stężeniem związku docelowego [28].

Gdy stężenia mieszczą się w zakresie ppb, potrzebne są bardziej złożone i droższe narzędzia do ilościowego oznaczania docelowych związków, takie jak analizator chemiluminescencyjny dla NH_3 lub analizatory H_2S na bazie cienkich warstw złota. Analizator chemiluminescencji NH_3 przekształca NH_3 w NO . Ten ostatni ulega charakterystycznej reakcji, która wytwarza luminescencję o intensywności proporcjonalnej do ilości NO . Analizatory H_2S mierzą z kolei zmiany rezystancji spowodowanej adsorpcją cząsteczek tego gazu na cienkiej folii ze złota [29]. Narzędzia te charakteryzują się wysoką niezawodnością i długoletnią stabilnością.

Analiza chemiczna z wykorzystaniem czujników specyficznych może być stosowana zarówno do badań emisyjnych, jak i imisyjnych. W przypadkach, w których emitowany zapach jest bezpośrednio skorelowany z jednym dominującym odorantem, zmierzone stężenie można wykorzystać do oszacowania emitowanego stężenia zapachowego. W takich sytuacjach dane te można wykorzystać jako dane wejściowe do modelowania dyspersji odorów w powietrzu celem oceny oddziaływania zapachowego. W tym celu konieczna jest jednak wstępna ocena korelacji między stężeniem dominującego związku

a stężeniem zapachowym [30, 31]. Pomiar pojedynczych odorantów jest natomiast bezużyteczny w przypadkach złożonych mieszanin zapachowych (zdecydowana większość przypadków), gdzie stężenie zapachowe nie jest związane ze stężeniem jednego odorantu, ale jest mieszaniną setek różnych związków. W takich przypadkach można ją łączyć z innymi technikami, aby uzyskać bardziej wszechstronną charakterystykę zapachu [32].

Czujniki niespecyficzne. Czujniki niespecyficzne, takie jak detektory PID oraz FID, mogą służyć jako narzędzie przesiewowe w tych przypadkach, w których problem związany z zapachem jest związany z obecnością LZO. Oba detektory umożliwiają jonizację związków organicznych obecnych w analizowanym gazie i dostarczają informacji o stężeniu wszystkich ulegających jonizacji związków chemicznych obecnych w próbce. Główną różnicą między ww. rozwiązaniami jest mechanizm jonizacji.

Detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) to w zasadzie palnik podtrzymywany przez regulowany przepływ paliwa gazowego (mieszaniny wodoru i rozcieńczalnika) oraz powietrza. Wewnątrz płomienia składniki badanej próbki ulegają jonizacji, w wyniku której powstają elektrony i jony dodatnie. W celu wykrycia tych jonów stosuje się dwie elektrody zapewniające różnicę potencjałów [33]. Detektor fotojonizacyjny (PID) wykorzystuje światło ultrafioletowe do naświetlania próbki, powodując jej jonizację. Komora analityczna składa się z dwóch płytek, pomiędzy którymi przykładana jest różnica potencjałów. Podczas produkcji zjonizowanych cząsteczek powstaje i jest rejestrowany prąd. Jego natężenie jest bezpośrednią miarą liczby zjonizowanych cząsteczek [34]. Ze względu na inny mechanizm jonizacji zastosowanie FID daje możliwość wykrycia metanu, który jest bezwonny, podczas gdy PID, który ma słabsze źródło energii, jest przydatny do wykrywania węglowodorów niemetanowych i ich pochodnych. Dane wyjściowe tego typu przyrządów to całkowite stężenie LZO wyrażone jako stężenie równoważne stężeniu gazu kalibracyjnego (zazwyczaj izobutyleny).

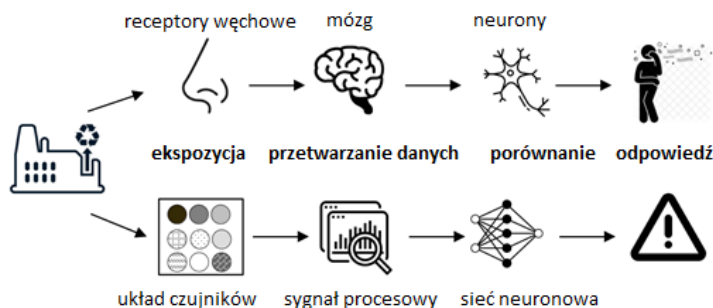
Główną wadą tej metody jest brak informacji o właściwościach zapachowych analizowanego gazu. Całkowite zmierzone stężenie węglowodorów jest trudne do powiązania ze stężeniem zapachowym, tj. korelacja między całkowitym stężeniem LZO a stężeniem zapachowym w próbkach gazów jest na ogół trudna do oszacowania lub nie istnieje [35].

Przykład zastosowania czujników specyficznych i niespecyficznych. Ciekawy przykład zastosowania czujników gazów opisali Wiśniewska i wsp. [7]. Autorzy wykorzystali przenośny analizator wielogazowy MultiRae Pro, wyposażony w jeden detektor PID i trzy czujniki elektrochemiczne do pomiaru H_2S , NH_3 oraz metanotolu do monitorowania odorantów emitowanych z biogazowni. Najwyższe stężenia odorantów były związane ze stabilizacją tlenową pofermentu (LZO, NH_3) oraz ze ściekami technologicznymi powstającymi w biogazowniach (głównie NH_3). Autorzy zasugerowali, że detektor może być wykorzystany do sterowania procesami technologicznymi w celu minimalizacji oddziaływania zapachowego poprzez pomiar stężeń odorantów i obliczanie wartości współczynnika aktywności zapachowej (OAV). Nie przeprowadzono jednak walidacji proponowanej metody z olfaktometrią dynamiczną.

3.4. Elektroniczne nosy

Termin „elektroniczny nos” wywodzi się z pewnych podobieństw między analizą związków lotnych w powietrzu za pomocą zestawu czujników gazowych a układem węchowym człowieka. Po wciągnięciu przez nos wdychane powietrze dociera do nabłonka węchowego znajdującego się w górnej części jamy nosowej. Interakcje cząsteczek zapa-

chowych z receptorami węchowymi wytwarzają bodźce elektryczne, które są przekazywane do mózgu. Tam odbywa się wspomagany pamięcią proces rozpoznawania wzorców w celu zidentyfikowania, sklasyfikowania i przeprowadzenia hedonicznej analizy konkretnego zapachu. Pojedynczy receptor węchowy zwykle reaguje na kilka substancji zapachowych, a każda cząsteczka zapachowa może wchodzić w interakcje z wieloma receptorami węchowymi [36]. Podobnie zasada działania elektronicznego nosa opiera się na reaktywności krzyżowej i półselektywności czujników gazu użytych do zaprojektowania układu czujników. Interakcje lotnych związków z tymi czujnikami dają sygnały analityczne, które są następnie przetwarzane przez komputer za pomocą programu do rozpoznawania wzorców. Podobnie jak ludzie, e-nos może uczyć się nowych wzorców i kojarzyć je z nowymi zapachami poprzez szkolenie i przechowywanie danych. Zasada działania nosa człowieka i e-nosa została przedstawiona na rysunku 3.



Rysunek 3. Zasada działania elektronicznego nosa; opracowano na podstawie [2]

Pod względem operacyjnym elektroniczny nos składa się z trzech części: systemu pobierania próbek, matrycy czujników gazu wytwarzających sygnały w zetknięciu ze związkami lotnymi oraz odpowiedniego systemu klasyfikacji wzorców [37]. Obecnie większość elektronicznych nosów bazuje na półprzewodnikowych czujnikach gazów z tlenków metali lub przewodzących polimerów. Jednak stosowane są również inne typy czujników, w tym czujniki elektrochemiczne, piezoelektryczne i optyczne [38]. System próbkowania obejmuje komorę, w której znajduje się układ czujników zamontowany na karcie PCB, oraz jednostkę kontroli przepływu próbki (miniaturowa pompa membranowa, przepływomierze i zawory). Sygnały analityczne odbierane z matryc czujników są przetwarzane w trzech krokach: wstępne przetwarzanie danych, ekstrakcja cech i redukcja wymiarów oraz algorytm rozpoznawania wzorców.

Elektroniczne nosy mogą być stosowane zarówno w pomiarach emisyjnych, jak i imisyjnych [2]. W przypadku emisji e-nos może służyć do monitorowania skuteczności systemów ograniczania odorów. Dlatego też specjalnie przeszkolone e-nosy mogą być instalowane na wylocie systemów dezodoryzacji gazów (np. biofiltrach), aby w czasie rzeczywistym dostarczać informacji na temat skuteczności oczyszczania gazów, umożliwiając szybką interwencję w przypadku awarii [39]. Ponadto dane zebrane u źródeł emisji przez e-nosy mogą być wykorzystane jako dane wejściowe do modelowania dyspersji odorów [19].

W przypadku pomiarów na poziomie imisji zastosowanie e-nosa umożliwia w sposób ciągły dokonywanie charakterystyki otaczającego powietrza pod względem oceny zasięgu oddziaływania zapachowego [40]. Odpowiednio przeszkolone e-nosy w przypadku wielu źródeł pozwalają również na identyfikację dominujących źródeł zapachów [41].

3.5. Obszary zastosowań i ograniczenia wybranych technik badań i pomiarów

W tabeli 2 podsumowano informacje dotyczące każdej z wyżej wymienionych technik wraz z możliwościami ich zastosowania i ograniczeniami. Metody te nie powinny być jednak traktowane jako konkurencyjne techniki. Metody sensoryczne i analityczne powinny być stosowane jednocześnie, jako uzupełniające się wzajemnie podejścia, w celu uzyskania maksimum informacji o analizowanych próbkach o charakterze zapachowym [2]. Przykłady takiego holistycznego procesu badania próbek zapachowych omówione zostaną w kolejnym rozdziale.

Tabela 2. Podsumowanie charakterystyki metod sensorycznych i analitycznych

Metoda	Rodzaj pomiarów	Zastosowanie	Wady
Olfaktometria dynamiczna	Emisyjne	– pomiar stężenia zapachowego u źródła, – dane mogą być użyte do modelowania dyspersji zapachu, – weryfikacja zgodności z przepisami	– metoda nieciągła, – wymaga transportu próbek do laboratorium, – brak bezpośredniej informacji o imisji zapachów
Olfaktometria terenowa	Imisyjne i emisyjne (przy źródłach niezorganizowanych)	– pomiar stężenia zapachowego w pewnej odległości od źródła, – pomiary prowadzone są <i>in situ</i>	– metoda nieciągła, – chwilowy charakter pomiarów
Badania terenowe	Imisyjne	– dostarcza informacji o charakterystyce zapachu (intensywność, rodzaj zapachu, jakość hedoniczna) jako mieszaniny na problematycznym obszarze, – dostarcza informacji o zasięgu oddziaływania zapachowego z rozważanego źródła	– nie dostarcza informacji nt. stężenia zapachowego, – czasochłonna
Dzienniki zapachu	Imisyjne	– angażuje społeczeństwo w mapowanie zapachów oraz zarządzanie problemem uciążliwości zapachowej, – pozwala na ocenę stopnia uciążliwości zapachowej	– duża rozbieżność wyników (ich subiektywny charakter)
GC-MS	Emisyjne oraz imisyjne	– pozwala na identyfikację i ilościowe oznaczenie poszczególnych odorantów	– ze względu na efekty synergiczne lub maskujące obliczony wskaźnik zapachowy może różnić się znacząco od rzeczywistej wartości stężenia zapachowego (uzyskanego za pomocą olfaktometrii dynamicznej), – mniej czuła niż ludzki nos
GC-O-MS	Emisyjne	– pomiar stężenia poszczególnych odorantów oraz ocena olfaktometryczna ich udziału w całość badanej próbki zapachowej	– nie dostarcza informacji o stężeniu zapachowym, – nie dostarcza informacji o próbce zapachowej jako całości
Czujniki niespecyficzne	Emisyjne i imisyjne	– pomiar stężenia lotnych związków organicznych w odniesieniu do zastosowanego gazu kalibracyjnego	– brak informacji o poszczególnych odorantach, – korelacja między stężeniem lotnych związków organicznych a stężeniem zapachowym trudna lub niemożliwa do osiągnięcia

Czujniki specyficzne	Emisyjne i imisyjne	– pomiar stężenia pojedynczych, wybranych odorantów w tych rzadkich przypadkach, w których dominuje w badanej próbce zapachowej tylko jedna substancja odorogenna	– brak całościowej informacji w przypadku skomplikowanych mieszanin zapachowych
Nosy elektroniczne	Emisyjne i imisyjne	– oceny skuteczności redukcji emisji zapachów do powietrza, – ocena zasięgu oddziaływania zapachowego (pomiar na poziomie imisji)	– brak informacji o intensywności oraz jakości hedonicznej zapachu, – nie może całkowicie zastąpić olfaktometrii dynamicznej

Źródło: opracowanie własne.

4. Przykłady jednoczesnego zastosowania wybranych technik pomiarowych w ocenie oddziaływania zapachowego – znaczenie podejścia interdyscyplinarnego

Podejście interdyscyplinarne pozwala na całkowitą charakterystykę oddziaływania zapachowego na danym obszarze, gdyż techniki sensoryczne i instrumentalne uzupełniają się wzajemnie, dostarczając informacji odpowiednio na temat oddziaływania zapachowego oraz składu chemicznego badanych próbek. Warto tutaj podkreślić rosnącą rolę czujników gazów, a zwłaszcza opartych na nich elektronicznych nosów, w badaniach próbek zapachowych. Mimo swoich ograniczeń mogą one w sposób ciągły dostarczać informacji o stężeniu poszczególnych odorantów (czujniki) czy też oceny zasięgu oddziaływania zapachowego (e-nosy).

Gutierrez i wsp. [42] wykorzystali trzy uzupełniające się podejścia do monitorowania emisji odorantów i odorów (olfaktometria dynamiczna, GC-MS i elektroniczne nosy). Źródłem zapachu był kompost z odpadów zielonych w różnych stadiach dojrzałości. Najwyższe stężenie zapachowe określone przy zastosowaniu olfaktometrii dynamicznej odnotowano w pierwszych dniach procesu kompostowania. Dzięki pomiarom GC-MS wykryto, że substancje zapachowe odpowiedzialne za odczuwany wówczas zapach należały do następujących grup chemicznych: terpenów, kwasów organicznych, ketonów, aldehydów i alkoholi, takich jak: D-limonen, kwas butanowy, tujon, heksanal i 2-butanol. Elektroniczny nos, wyszkolony w celu identyfikacji grup związków chemicznych, został użyty do ciągłego monitorowania *in situ* procesu kompostowania. Wyniki uzyskane za pomocą tej metody pozwoliły na wychwycenie działań związanych z obróbką odpadów (takich jak np. napowietrzanie), podczas których wzrastało stężenie odorantów. Ze względu na nieciągły charakter metody GC-MS czy olfaktometrii dynamicznej obserwacja tego typu zdarzeń nie jest możliwa.

W pracy Rincón i wsp. [43] również zastosowano metodę sensoryczną (olfaktometria dynamiczna) oraz instrumentalną (GC-MS) do badania procesu kompostowania osadów ściekowych uprzednio przefermentowanych w warunkach beztlenowych. W tym celu przeanalizowano próbki zapachowe pobrane podczas przechowywania, wymuszonego napowietrzania (faza aktywna) i obracania. Na każdym etapie monitorowano zapachy, określając wskaźniki emisji zapachów (OER w $\text{ou}_E \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$), stosując metodę olfaktometrii dynamicznej i obliczając wartości aktywności zapachowej (OAV) związków oznaczonych ilościowo metodami analitycznymi (tj. GC-MS). Amoniak i lotne związki siarki były najbardziej rozpowszechnionymi odorantami w badanych próbkach, stanowiąc odpowiednio

55,5% i 20,6% masowych emitowanych zanieczyszczeń. Pierwsze osiem dni obróbki tlenowej oraz procesu obracania kompostowanych osadów były etapami krytycznymi dla emisji zapachu, z wartościami OER w zakresie od $30 \text{ ou}_E \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ do $317 \text{ ou}_E \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$. Szczególnie pierwszy etap obracania był odpowiedzialny za epizody występowania zapachu ($295 \text{ ou}_E \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$). Stosując OAV, stwierdzono, że disiarczek dimetylu, siarczek dimetylu i metanotiol były dominującymi substancjami zapachowymi na tych wczesnych etapach operacyjnych. Strumień zapachowy i skład mieszaniny zapachowej zmieniły się dla środkowej i późniejszej fazy aktywnej. Podczas drugiego obracania oraz etapu stabilizacji wartość OER wahała się od $0,18 \text{ ou}_E \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ do $12,6 \text{ ou}_E \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$, a siarkowodór wykazywał największy udział zapachowy.

W pracy Romain i wsp. [44] zastosowano olfaktometrię dynamiczną oraz badania terenowe (metody sensoryczne), a także GC-MS i nos elektroniczny (metody instrumentalne) do badania próbek zapachowych z dziewięciu składowisk odpadów. Metoda olfaktometrii dynamicznej oraz GC-MS służyły do uzyskania charakterystyki próbek zapachowych u źródła emisji, a elektroniczny nos oraz badania terenowe do oceny oddziaływania zapachowego w pewnej odległości od źródła emisji zapachu (pomiar imisyjne). Metoda olfaktometrii dynamicznej pozwoliła na określenie strumienia emitowanego zapachu, który wynosił $1500 \text{ ou}_E/\text{s}$. Wyniki badań terenowych, które stanowiły dane wejściowe do modelu TROPOS, dały jednak dużo większe strumienie (od $30\,000 \text{ ou}/\text{s}$ do $150\,000 \text{ ou}/\text{s}$), co spowodowane było pracami na składowisku w czasie prowadzenia badań (przemieszczanie odpadów za pomocą spycharek i koparek). Analizy GC-MS wykazały, że w skład analizowanych próbek zapachowych wchodziły setki różnych związków chemicznych, ale spośród nich największym stężeniem charakteryzował się limonen. Badania z wykorzystaniem elektronicznego nosa umieszczonego poza terenem zakładu wykazały, że może on dostarczać w sposób ciągły informacji na temat stężenia zapachu w pewnej odległości od składowiska odpadów, ale jedynie w sytuacjach, gdy wartość ta jest znacząca. Ze względu na stosunkowo wysokie limity detekcji zastosowanych czujników e-nos okazał się nieskuteczny w przypadkach, gdy stężenie związków zapachowych było niskie. Z podobnym problemem zmagali się Gębicki i wsp. [45], którzy podkreślili, że konstrukcja czujników z niskim limitem detekcji powinna być priorytetem w rozwoju elektronicznych nosów.

Nosy elektroniczne mogą być również uczone do rozróżniania źródeł zapachów. W pracy Sironi i wsp. [41] zastosowano takie właśnie podejście. W badaniach imisyjnych oprócz dwóch elektronicznych nosów wykorzystano także dzienniki obserwacji zapachu. Jeden z nosów został zainstalowany na terenie kompostowni, a drugi w budynku mieszkalnym oddalonym o 300 m od badanego obiektu. Podczas czterodniowych pomiarów e-nos umieszczony w budynku mieszkalnym wykrywał obecność zapachów pochodzących z kompostowni przez około 7,8% całego czasu badań. Wyniki porównano z dziennikiem obserwacji zapachu prowadzonym przez mieszkańców, uzyskując zgodność na poziomie 72%. Ponadto 86% wykrytych zdarzeń odorowych dotyczyło odbywających się na świeżym powietrzu procesów przesiewania odpadów. Proces ten stanowił zatem główne źródło zapachów w badanym obiekcie.

W pracy Barczak i Kulig [46] zastosowano olfaktometrię dynamiczną oraz terenową, a także GC-MS (w celu identyfikacji związków siarki) oraz metody kolorymetryczne (w celu analizy stężeń siarkowodoru i amoniaku). W badaniach wykazano, że precyzyjne określenie zależności między wynikami uzyskanymi za pomocą różnych metod badaw-

czych jest bardzo trudne. Silną korelację (współczynnik korelacji Pearsona: 0,79) uzyskano tylko między stężeniem zapachowym zmierzonym za pomocą olfaktometrii dynamicznej a stężeniem metanotolu, ale tylko w jednym punkcie pomiarowym na terenie badanego Zakładu Oczyszczania Ścieków. Wyniki zaprezentowanych w ww. publikacji badań podkreślają potrzebę podejścia międzydiscyplinarnego w pomiarach i analizach w zakresie oceny oddziaływania zapachowego.

Przykłady zastosowania interdyscyplinarnego podejścia w kwestii oceny oddziaływania zapachowego przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Przykłady interdyscyplinarnych badań oceny oddziaływania zapachowego

Opis źródła	Opis wykorzystanych technik pomiarowych	Najważniejsze wnioski z badań	Ref.
Emisja zapachów z kompostowania odpadów zielonych	Olfaktometria dynamiczna, GC-MS, elektroniczny nos	Najwyższe stężenie zapachowe odnotowano w czasie pierwszych dni kompostowania odpadów, a emitowanymi wówczas odorantami były terpeny, kwasy organiczne, ketony, aldehydy i alkohole	[42]
Emisja zapachów z kompostowania osadów ściekowych uprzednio przefermentowanych beztlenowo	Olfaktometria dynamiczna, GC-MS	Najwyższe stężenie zapachowe odnotowano w czasie pierwszych dni kompostowania, a także w czasie obracania osadu. Emitowanymi związkami w początkowej fazie procesu były amoniak i lotne związki siarki, a w późniejszych fazach siarkowodor	[43]
Emisja i imisja zapachów ze składowisk odpadów	Badania terenowe, olfaktometria dynamiczna, GC-MS oraz elektroniczny nos	Oszacowane za pomocą olfaktometrii dynamicznej strumienie zapachu były niższe niż te obliczone z wykorzystaniem danych z pomiarów terenowych. Za odczuwane zapachy odpowiadały setki różnych związków chemicznych, z czego największe stężenie wykazywał limonen. Elektroniczne nosy w sposób ciągły dostarczały informacji o stężeniu imisyjnym zapachu, ale okazały się nieskuteczne, gdy stężenia te były na niskim poziomie	[44]
Imisja zapachu ze składowisk odpadów	Elektroniczne nosy oraz olfaktometria terenowa	Utworzono sieć monitorującą zbudowaną z nosów elektronicznych oraz wykonano pomiary za pomocą olfaktometrii terenowej, wykazując wysoką korelację między wynikami uzyskanymi za pomocą tych dwóch technik. Elektroniczne nosy okazały się mniej skuteczne, gdy stężenie zapachowe było na niższym poziomie	[45]
Imisja zapachów z kompostowni	Elektroniczne nosy, badania terenowe oraz dzienniki obserwacji zapachu	Badania terenowe i dzienniki zapachu pozwoliły na identyfikację głównego źródła emisji zapachu. Ponadto zainstalowano elektroniczne nosy na terenie zakładu oraz 300 m od niego (na terenie zamieszkanym przez miejscową ludność). Zastosowanie elektronicznych nosów pozwoliło na identyfikację 72% wydarzeń zapachowych odnotowanych przez mieszkańców	[41]
Emisja i imisja zapachów z Zakładu Oczyszczania Ścieków	Olfaktometria dynamiczna, olfaktometria terenowa, GC-MS, metody kolorymetryczne	Silna korelacja została uzyskana między stężeniem zapachowym zmierzonym za pomocą olfaktometrii dynamicznej a stężeniem metanotolu w jednym z punktów pomiarowych	[46]

Źródło: opracowanie własne na podstawie [41-46].

5. Podsumowanie

W niniejszej pracy opisano sposób działania, zalety i wady wybranych metod sensorycznych (olfaktometria dynamiczna, olfaktometria terenowa, badania terenowe, dzienniki zapachu) oraz instrumentalnych (GC-MS, czujniki gazowe, elektroniczne nosy) w badaniach próbek zapachowych, a także przedstawiono przykłady ich wykorzystania w ocenie oddziaływania zapachowego. Techniki sensoryczne pozwalają na określenie stężenia, intensywności oraz jakości hedonicznej badanego zapachu, a także częstotliwości jego występowania na badanym obszarze. Techniki te nie pozwalają jednak na uzyskanie informacji na temat składu chemicznego badanego gazu. Metody analityczne z kolei pozwalają na pomiar stężenia poszczególnych odorantów, ale nie dają informacji o odczuwanym zapachu. Ciekawym rozwiązaniem są elektroniczne nosy, gdyż po procesie ich uczenia urządzenia mogą w sposób ciągły dostarczać informacji na temat składu chemicznego próbek zapachowych. Możliwy jest także ich trening z pomiarami sensorycznymi, co pozwala na określenie stężenia zapachowego. E-nosy nie powinny być jednak traktowane jako metoda konkurencyjna w stosunku do dobrze ugruntowanych technik sensorycznych i analitycznych. Wręcz przeciwnie, nowoczesne podejście do monitorowania próbek zapachowych wymaga jednoczesnego zastosowania metod sensorycznych i instrumentalnych. Przykłady zastosowania takiego podejścia nie są liczne w literaturze, gdyż jednoczesne analizy za pomocą kilku technik jednocześnie są nie tylko kosztowne i czasochłonne, ale wymagają także zaangażowania i współpracy specjalistów z różnych dziedzin.

Podziękowania

Niniejsza praca powstała dzięki wsparciu finansowemu unijnego programu badań i innowacji Horyzont 2020 w ramach umowy o grant Marie Skłodowska-Curie nr 101033564.

Literatura

1. Palmiotto M., Fattore E., Paiano V., Celeste G., Colombo A., Davoli E., *Influence of a municipal solid waste landfill in the surrounding environment: Toxicological risk and odor nuisance effects*, Environment International, 68, 2014, s. 16-24.
2. Jońca J., Pawnuł M., Arsen A., Sówka I., *Electronic noses and their applications for sensory and analytical measurements in the waste management plants – a review*, Sensors, 22, 2022, 1510.
3. Standard EN 13725:2022, Air quality-determination of odour concentration by dynamic olfactometry, CEN: Brussels, Belgium, 2022.
4. Dincer F., Odabasi M., Muezzinoglu A., *Chemical characterization of odorous gases at a landfill site by gas chromatography–mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1122, 2006, s. 222-229.
5. Brattoli M., Cisternino E., Dambruoso P.R., De Gennaro G., Giungato P., Mazzone A., Palmisani J., Tutino M., *Gas chromatography analysis with olfactometric detection (gc-o) as a useful methodology for chemical characterization of odorous compounds*, Sensors, 13, 2013, s. 16759-16800.
6. Pawnuł M., Sówka I., Naddeo V., *The use of field olfactometry in the odor assessment of a selected mechanical-biological municipal waste treatment plant within the boundaries of the selected facility – A case study*, Sustainability, 15, 2023, s. 7163.
7. Wiśniewska M., Kulig A., Lelićńska-Serafin K., *The use of chemical sensors to monitor odour emissions at municipal waste biogas plants*, Applied Sciences, 11, 2021, 3916.

8. Jońca J., Pawnuik M., Bezyk Y., Arsen A., Sówka I., *Drone-assisted monitoring of atmospheric pollution – a comprehensive review*, Sustainability, 14, 2022, s.1-31.
9. Gutiérrez M.C., Martín M.A., Pagans E., Vera L., García-Olmo J., Chica A.F., *Dynamic olfactometry and GC-TOF/MS to monitor the efficiency of an industrial biofilter*, Sciences of the Total Environment, 512-513, 2015, s. 572-581.
10. Romanik E., Bezyk Y., Pawnuik M., Miller U., Grzelka A., *Influence of the variability of the odor emission rate on its impact range: A case study of the selected industrial source*, E3S Web Conf., 100, 2019.
11. Sironi S., Capelli L., Céntola P., Del Rosso R., Pierucci S., *Odour impact assessment by means of dynamic olfactometry, dispersion modelling and social participation*, Atmospheric Environment, 44, 2010, s. 354-360.
12. Badach J., Kolasinska P., Paciorek M., Wojnowski W., Dymerski T., Gebicki J., Dymnicka M., Namiesnik J., *A case study of odour nuisance evaluation in the context of integrated urban planning*, Journal of Environmental Management, 213, 2018, s. 417-424.
13. Standard EN 16481-1:2016, Ambient air-determination of odour in ambient air by using field inspection-Part 1: Grid Method, CEN: Brussels, Belgium, 2016.
14. Standard EN 16481-2:2016, Ambient air-determination of odour in ambient air by using field inspection-Part 2: Plume Method, CEN: Brussels, Belgium, 2016.
15. Sówka I., *Metody identyfikacji odorotwórczych gazów emitowanych z obiektów przemysłowych*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2011.
16. Mannebeck B., Mannebeck C., Mannebeck D., Hauschildt H., Van Den Burg A., *Field inspections according to prEN16841-1:2015 in a naturally evolved neighborhood of industry and living areas. State-of-the-art-technology of a comprehensive data collection, interaction of different sources and effects on the perceiving citizens*, Chemical Engineering Transactions, 54, 2016, s. 181-186.
17. Yaacof N., Qamaruzzaman N., Yusup Y., *Comparison method of odour impact evaluation using calpuff dispersion modelling and on-site monitoring*, Engineering Heritage Journal, 1, 2017, s. 1-5.
18. Sówka I., Miller U., Grzelka A., *The application of dynamic olfactometry in evaluating the efficiency of purifying odorous gases by biofiltration*, Environment Protection Engineering, 43, 2017, s. 233-242.
19. Bax C., Sironi S., Capelli L., *How can odors be measured? An overview of methods and their applications*, Atmosphere, 11, 2020, s. 92.
20. Audouin V., Bonnet, F., Vickers Z.M., Reineccius G.A., *Limitations in the use of odor activity values to determine important odorants in foods*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 782, 2001, s. 156-171.
21. Dravnieks A., Jarke F., *Odor threshold measurement by dynamic olfactometry: Significant operational variables*, Journal of the Air Pollution Control, 30, 1980, s.1284-1289.
22. Liu Y., Yang H., Lu W., *VOCs released from municipal solid waste at the initial decomposition stage: Emission characteristics and an odor impact assessment*, Journal of Environmental Sciences, 98, 2020, s. 143-150.
23. Hayes J.E., Barczak R.J., Suffet I.M., Stuetz R.M., *The use of gas chromatography combined with chemical and sensory analysis to evaluate nuisance odours in the air and water environment*, Environment International, 180, 2023, 108214.
24. Barczak R.J., *Zastosowanie metody chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem chemicznym i sensorycznym w analizach odorantów z obiektów gospodarki komunalnej – możliwości i perspektywy zastosowania*, [w:] Janiszewska M. (red.) *Ochrona środowiska – nowe rozwiązania i perspektywy na przyszłość*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, <https://bc.wydawnictwo-tygiel.pl/publikacja/15B1B65B-184A-E7A0-2F64-C2E288DC1EA6>.

25. Barczak R.J., Możaryn J., Fisher R.M., Stuetz R.M., *Odour concentrations prediction based on odorants concentrations from biosolid emissions*, Environmental Research, 214, 2022, 113871.
26. Zhang S., Koziel J.A., Cai L., Hoff S.J., Heathcote K.Y., Chen L., Jacobson L.D., Akdeniz N., Hetchler B.P., Parker D.B., *Odor and odorous chemical emissions from animal buildings: Part 5. Simultaneous chemical and sensory analysis with gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry*, Transactions of the ASABE, 58, 2015, s. 1349-1359.
27. Fisher R.M., Barczak R.J., Suffet I.H.M., Hayes J.E., Stuetz R.M., *Framework for the use of odour wheels to manage odours throughout wastewater biosolids processing*, Sciences of the Total Environment, 634, 2018, s. 214-223.
28. Baranwal J., Barse B., Gatto G., Broncova G., Kumar A., *Electrochemical sensors and their applications: A review*, Chemosensors 10, 2022, 363.
29. Nabais R., *Odours in the food industry*, Springer, New York, USA, 2006.
30. Roetzer H., Muehldorf V., Riesing J., *Measurement of the odor impact of a waste deposit using the SF6-tracer method (OEFZS-4733)*, [w:] Proceedings of the 2nd International Symposium on environmental contamination in Central and Eastern Europe, Budapest, Hungary, 20-23 September 1994.
31. Heaney C.D., Wing S., Campbell R.L., Caldwell D., Hopkins B., Richardson D., Yeatts K., *Relation between malodor, ambient hydrogen sulfide, and health in a community bordering a landfill*, Environmental Research, 111, 2011, s. 847-852.
32. Cangialosi F., Intini G., Colucci D., *On line monitoring of odour nuisance at a sanitary landfill for non-hazardous waste*, Chemical Engineering Transactions, 68, 2018, s. 127-132.
33. Chaulya S.K., Prasad G.M., *Gas sensors for underground mines and hazardous areas*, [w:] *Sensing and Monitoring Technologies for Mines and Hazardous Areas*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2016, s. 161-212.
34. Szulczyński B., Gębicki J., *Currently Commercially available chemical sensors employed for detection of volatile organic compounds in outdoor and indoor air*, Environments, 4, 2017, 21.
35. Capelli L., Sironi S., Del Rosso R., Guillot J.M., *Measuring odours in the environment vs. dispersion modelling: A review*, Atmospheric Environment, 79, 2013, s. 731-743.
36. Korsching S.I., *Olfactory receptors*, [w:] Lennarz W.J., Lane M.D. (red.), *Encyclopedia of biological chemistry*, 2nd ed., Academic Press, Waltham, MA, USA, 2013, s. 345-349.
37. Cheng L., Meng Q.H., Lilienthal A.J., Qi P.F., *Development of compact electronic noses: A review*, Measurement Science Technology, 32, 2021, 062002.
38. Zohora S.E., Khan A.M., Hundewale N., *Chemical sensors employed in electronic noses: A review*, [w:] Meghanathan N., Nagamalai D., Chaki N. (red.), *Advances in computing and information technology*, Springer, Berlin–Heidelberg, Germany, 2013, s. 177-184.
39. Adam G., Lemaigre S., Goux X., Delfosse P., Romain A.C., *Electronic nose technology for reactor state and biogas quality assessment in aerobic digestion*, [w:] Proceedings of the 2nd Conference on Monitoring & process control of anaerobic digestion plants, Leipzig, Germany, 17-18 March 2015.
40. Dentoni L., Capelli L., Sironi S., Rosso R.D., Zanetti S., Torre M.D., *Development of an electronic nose for environmental odour monitoring*, Sensors, 12, 2012, s. 14363-14381.
41. Sironi S., Capelli L., Céntola P., Del Rosso R., Grande M.I., *Continuous monitoring of odours from a composting plant using electronic noses*, Waste Management, 27, 2007, s. 389-397.
42. Gutiérrez M.C., Chica A.F., Martín M.A., Romain A.C., *Compost pile monitoring using different approaches: GC-MS, E-nose and dynamic olfactometry*, Waste Biomass Valorization, 5, 2014, s. 469-479.

43. Rincón C.A., De Guardia A., Couvert A., Soutrel I., Guezel S., Le Serrec C., *Odor generation patterns during different operational composting stages of anaerobically digested sewage sludge*, Waste Management, 95, 2019, s. 661-673.
44. Romain A.C., Delva J., Nicolas J., *Complementary approaches to measure environmental odours emitted by landfill areas*, Sensors & Actuators B, 131, 2008, s. 18-23.
45. Gebicki J., Dymerski T., Namiesnik J., *Monitoring of odour nuisance from landfill using electronic nose*, Chemical Engineering Transactions, 40, 2014, s. 85-90.
46. Barczak R.J., Kulig A., *Comparison of different measurement methods of odour and odorants used in the odour impact assessment of wastewater treatment plants in Poland*, Water Science and Technology, 75, 2017, s. 944-951.

Przykłady zastosowań wybranych metod sensorycznych i analitycznych w ocenie oddziaływania zapachowego

Streszczenie

Redukcja emisji odorów jest priorytetem dla przedstawicieli wielu gałęzi przemysłu. Niezbędna jest również weryfikacja skuteczności tych wysiłków, w czym pomóc mogą różnorodne metody sensoryczne (np. olfaktometria dynamiczna) oraz analityczne (np. GC-MS, czujniki). Techniki sensoryczne pozwalają na określenie stężenia, intensywności oraz jakości hedonicznej badanego zapachu. Metody analityczne z kolei pozwalają na pomiar stężenia poszczególnych odorantów, ale nie dają informacji o odczuwanym zapachu. Ciekawym rozwiązaniem są elektroniczne nosy, czyli urządzenia złożone z wielu niespecyficznych czujników. Ich konstrukcja jest dużym wyzwaniem i zależy od charakterystyki czujników, wyboru modelu uczenia maszynowego oraz jego treningu na odpowiednio dużej ilości próbek. Po procesie uczenia e-nosy mogą w sposób ciągły dostarczać informacji na temat składu chemicznego próbek zapachowych. Możliwy jest także ich trening z pomiarami sensorycznymi, co pozwala na określenie stężenia zapachowego. E-nosy nie powinny być jednak traktowane jako metoda konkurencyjna w stosunku do dobrze ugruntowanych technik sensorycznych i analitycznych. Wręcz przeciwnie, maksymalne informacje na temat badanego zapachu uzyskuje się, gdy olfaktometria, GC-MS, czujniki specyficzne i e-nosy są stosowane jednocześnie, jako wzajemnie uzupełniające się podejścia do danego problemu.

Słowa kluczowe: uciążliwość zapachowa, olfaktometria, GC-MS, GC-O-MS, czujniki, nosy elektroniczne

Examples of the application of selected sensory and analytical methods in the assessment of odor impact

Abstract

Reducing odor emissions is a priority for representatives of many industrial sectors. It is also necessary to verify the effectiveness of these efforts, which can be assured by various sensory (e.g. dynamic olfactometry) and analytical methods (e.g. GC-MS, sensors). Sensory techniques allow to determine the concentration, intensity and hedonic quality of the tested odor. Analytical methods, in turn, allow to measure the concentration of individual odorants, but this does not tell us much about the odor impact. An interesting solution are e-noses, i.e. devices composed of many non-specific sensors. Their construction is a big challenge and depends on the characteristics of the sensors, the choice of the machine learning model and its training on a sufficiently large number of samples. Once trained, however, e-noses can continuously provide information on the chemical composition of odor samples. It is also possible to train them with sensory measurements, which allows to determine the odor concentration. However, e-noses should not be treated as a competitive method to well-established sensory and analytical techniques. On the contrary, maximum information on the odor samples is obtained when olfactometry, GC-MS, specific gas sensors, and e-noses are used simultaneously as complementary approaches to a given problem.

Keywords: odor nuisance, olfactometry, GC-MS, GC-O-MS, sensors, electronic noses

Potencjał leczniczy nutraceutyków wobec kancerogennego działania smogu

1. Wprowadzenie

W ostatnich latach problem smogu, mimo rosnącej świadomości Polaków, ich zaangażowania w codzienne stosowanie bardziej ekologicznych i zdrowych rozwiązań zmniejszających emisję pyłów i gazów do atmosfery, licznych kontroli placówek przemysłowych i nakładania coraz to bardziej restrykcyjnych norm przez takie organizacje jak Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), nadal jest alarmująco rosnący. Według danych na 2022 rok Polska zajmuje 11 miejsce jako kraj z jednym z najwyższych stężeń PM_{2.5} w całej Europie, pyłu, który jest uznawany za najbardziej szkodliwy [1]. W okresie grzewczym polskie miasta nieraz bywają w ścisłej czołówce takiego rankingu.

W obliczu nieuchronnej, wieloletniej walki ze skutkami działania smogu już teraz warto zwrócić uwagę na to, jak się chronić, aby smog miał jak najmniejszy wpływ na nasze zdrowie. Obecnie trwające badania *in vitro* oraz badania kliniczne obrazują skutki obecnego od dekad smogu, a nie tego, z którym mamy aktualnie i będziemy mieć do czynienia w najbliższej przyszłości. Tak jak zmienia się technologia, tak zmienia się skład i stężenie pyłów, gazów cieplarnianych i benzo(a)pirenu w atmosferze [2]. Wpływ ma również ciągle ocieplający się klimat, urbanizacja i zmiany w gospodarce [3]. Bez względu na to, jaką przygotowujemy dla siebie przyszłość i ile będzie nas ona zdrowia kosztować, warto już dzisiaj pomyśleć o działaniu protekcyjnym. Czymś, co z niewielkim nakładem pracy możemy zmienić w swoim życiu, a co w ogólnym rozrachunku przyniesie dobroczynne skutki.

W niniejszej monografii przedstawiono naturalne możliwości ochrony naszych organizmów przed negatywnymi skutkami działania smogu, szczególnie chorobami nowotworowymi. Wprowadzenie naturalnych metod w zakresie diety i odpowiedniej suplementacji jest wartym do przemyślenia tematem, gdyż obok działań proekologicznych wydaje się być najprostszym, ale i skutecznym działaniem w walce z zanieczyszczonym powietrzem. Autorzy przybliżają problem smogu i jego poszczególnych składników oraz prezentują, czym są nutraceutyki, szerzej opisując trzy interesujące ich substancje bioaktywne, nad którymi obecnie prowadzą badania *in vitro*.

¹ zofia.lapinska@student.umw.edu.pl, Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

² Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

³ Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

⁴ Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

⁵ Katedra i Zakład Biologii Molekularnej i Komórkowej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

* Autorzy ci w równym stopniu przyczynili się do powstania tej pracy

2. Smog i jego wpływ na rozwój nowotworów

2.1. Ogólna charakterystyka smogu

Zanieczyszczenia powietrza – jako często występujący środowiskowy problem współczesnego świata – mają znaczny wpływ na jakość i długość życia populacji ludzkiej [4, 5]. Według danych WHO odsetek światowej populacji oddychającej powietrzem, którego zanieczyszczenie przekracza wyznaczone limity, wynosi 99%, a największy w nim udział mają kraje o niskim i średnim dochodzie [6]. W Europie w 2020 roku oszacowano, że około 238 000 przedwczesnych zgonów było wynikiem przewlekłego narażenia na cząstki stałe o maksymalnej średnicy 2,5 μm (PM_{2,5}, ang. *particulate matter 2,5*), które tworzą pył zawieszony w powietrzu [7]. Polska przoduje wśród krajów w Unii Europejskiej z miastami o najbardziej zanieczyszczonym powietrzu – według World Bank Group 36 z 50 takich ośrodków miejskich leży na terenie Polski [8]. W Polsce w ciągu ostatniej dekady poziom PM zawieszonych w powietrzu sukcesywnie spadał, obecnie jednak wciąż przekracza on normy ustalone przez WHO, a polskie miasta należą do tych z najwyższą szacowaną śmiertelnością spowodowaną przez PM [9-11].

Wytworzone w wyniku działalności człowieka pyły, dymy, gazy i produkty ich przemian fotochemicznych w wilgotnym powietrzu tworzą zjawisko określane smogiem [12, 13]. Wyróżniono 6 rodzajów substancji tworzących smog i będących szczególnie niebezpiecznymi dla zdrowia i środowiska: cząstki stałe (PM₁₀ i PM_{2,5}), ozon warstwy przyziemnej, dwutlenek siarki, dwutlenek azotu, tlenek węgla i ołów [14]. PM₁₀ i PM_{2,5} są wytwarzane głównie przez gospodarstwa domowe, transport i przemysł w wyniku spalania paliw stałych [15, 16]. W związku z ograniczeniem spalania paliw stałych w dużych europejskich miastach przeważającymi źródłami pyłu stał się tam spalinowy ruch uliczny, na obszarach wiejskich natomiast główną przyczyną zanieczyszczeń powietrza są wciąż gospodarstwa domowe [17-19]. PM₁₀ może zawierać węglowodory (np. benzo(a)piren) czy metale ciężkie (np. kadm, ołów, arsen, nikiel), które uważane są za związki o wysokiej toksyczności [20]. Niektóre choroby układu krążenia czy płuc mogą zostać zaostrzone przez wdychanie PM₁₀, choć same cząsteczki są zbyt duże, aby przedostać się do dolnych dróg oddechowych [21]. Respirabilna frakcja pyłu, czyli PM o średnicy maksimum 5 μm , jest niekiedy wyróżniana jako grupa cząstek mogąca przedostawać się do pęcherzyków płucnych [22]. Przestrzeń pęcherzykowa jest najłatwiej dostępna dla PM_{2,5}, dlatego cząstki te wydają się być najbardziej niebezpieczne spośród PM [20, 23]. Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska szacuje, że PM_{2,5} wraz z ozonem są powodem 90% całkowitej zachorowalności i śmiertelności związanej z zanieczyszczeniem powietrza [24, 25]. PM_{2,5} obejmują m.in. metale alkaliczne, reszty kwasu chlorowodorowego i azotowego, węgiel elementarny, organiczny czy jony amonowe [21]. Ponadto istnieją również cząstki o średnicy maksimum 1 μm , które mają zdolność przenikania bariery krew-powietrze i oddziaływania przez to na cały organizm [20].

Skład smogu różni się w zależności od topografii danego regionu i warunków atmosferycznych. W Polsce, jak i w całej Europie, występuje głównie londyński typ smogu, inaczej zwany smogiem jesiennie-zimowym czy kwaśnym, który powstaje w warunkach wysokiej wilgotności powietrza i braku wiatru, w regionach o dużym spalaniu paliw stałych. Tworzą go dwutlenek węgla lub dwutlenek siarki, czyli tzw. gazy kwaśne, a także cząstki pyłu różnej wielkości, tlenki metali ciężkich, niemetali czy związków organicznych [26]. Innym typem smogu jest typ Los Angeles lub inaczej smog fotochemiczny

lub utleniający, występujący przy wyższej temperaturze powietrza i dużym nasłonecznieniu. Tlenek azotu(II), węglowodory, szczególnie alkeny i pozostałe składniki spalin samochodowych, w dużym stężeniu ulegają reakcjom fotochemicznym pod wpływem promieni słonecznych. Ich produktami są rodniki, które biorąc udział w kolejnych przemianach chemicznych, powodują powstanie nadtlenków o wysokiej toksyczności, m.in. azotanu, nadtlenku acetylu (PAN). Pozostałymi składnikami smogu typu Los Angeles są ozon, aldehydy czy węglowodory aromatyczne [12, 27].

Powstaje coraz więcej badań pokazujących szkodliwy wpływ smogu nie tylko na układ oddechowy, ale i cały organizm człowieka. Wykazano, że smog podwyższa ryzyko wystąpienia alergii i astmy, zapalenia oskrzeli czy przewlekłej obturacyjnej choroby płuc [28-30]. Arytmie, obniżenie płodności czy większe ryzyko nieprawidłowego rozwoju płodu również mogą być spowodowane wpływem smogu [31-34]. Według najnowszych doniesień zanieczyszczenie powietrza cząstkami stałymi może korelować ze śmiertelnością z powodu ciężkiej niewydolności oddechowej w przebiegu COVID-19 [35, 36]. Smog może odgrywać także coraz bardziej znaczącą rolę w patogenezie nowotworów, szczególnie gruczolakoraka płuca, związanego w mniejszym stopniu z paleniem tytoniu niż rak płaskonabłonkowy [37]. Ryzyko rozwoju raka piersi, wątroby, trzustki czy przełyku, a także śmiertelność w raku pęcherza moczowego potencjalnie zwiększa zanieczyszczone powietrze [38-42].

Ze względu na coraz większą ilość dowodów na szkodliwe działanie smogu na zdrowie i życie ludzkie postanowiono obniżyć normy stężenia pyłów w powietrzu [43]. Wprowadzane są również programy mające na celu walkę ze smogiem, np. plan „W kierunku zerowego zanieczyszczenia powietrza, wody i gleby” Unii Europejskiej, którego cele mają być osiągnięte do 2030 roku [44].

2.2. Kancerogenne działanie metali ciężkich zawartych w smogu

Narażenie na występujące powszechnie w zanieczyszczonym środowisku metale ciężkie stało się poważnym problemem zdrowia publicznego na całym świecie. Liczne badania wskazują na związek między ekspozycją na obecność metali ciężkich a kancerogenezą. Wykazano, że narażenie na występujące w smogu kadm i ołów sprzyja rozwojowi wielu rodzajów nowotworów złośliwych, w tym raka prostaty, raka piersi, raka nerki, raka pęcherza oraz raka płuc [45-48].

Uznaje się, że mechanizm związany z toksycznością metali ciężkich polega między innymi na powstawaniu reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), co skutkuje uszkodzeniem oksydacyjnym i niekorzystnymi skutkami zdrowotnymi takimi jak cukrzyca, nefropatie, zaburzenia neurologiczne, choroby sercowo-naczyniowe oraz – jak wspomniano wcześniej – rozwojem nowotworów [48, 49].

ROS to grupa krótkotrwałych, wysoce reaktywnych cząsteczek zawierających tlen, takich jak O_2^- , H_2O_2 oraz $\bullet OH$, które mogą indukować uszkodzenia DNA, powodując między innymi utlenianie zasad nukleozydowych, pęknięcia nici oraz degradację jądrowego i mitochondrialnego DNA [49].

Cykle komórek nowotworowych są zwykle związane z tak zwanym stresem replikacyjnym, który definiuje się jako nieprawidłową progresję widełek replikacyjnych i spowolnienie syntezy DNA. Skutkuje to niestabilnością genomu i toruje drogę do rozwoju nowotworu poprzez akumulację dodatkowych zmian w obrębie genomu. Szkodliwe działanie ROS w tym zakresie wpływa na aktywność polimerazy oraz zaburza wiązanie

białek uczestniczących w procesie replikacji. Utlenione zasady azotowe powstałe w wyniku aktywności ROS mogą również stanowić fizyczną przeszkodę dla progresji widełek replikacyjnych, co powoduje ich rozpad w wrażliwych miejscach DNA. Skutkiem tych procesów jest ostatecznie niedostateczna lub nadmierna replikacja DNA, prowadząca do niestabilności genomu w guzie nowotworowym [49, 50].

Znane jest również niekorzystne oddziaływanie metali ciężkich, szczególnie kadmu i ołowiu, na układ odpornościowy człowieka. Stwierdzono, że narażenie na ołów może wpływać na produkcję limfocytów T i B oraz komórek NK pełniących kluczową rolę przeciwnowotworową [51]. Badania wykazały, że ekspozycja na metale ciężkie jest szczególnie niebezpieczna dla rozwijającego się układu odpornościowego u dzieci. Stwierdzono, że ekspozycja na metale ciężkie nie tylko zmniejszyła liczbę limfocytów i stłumiła adaptacyjne odpowiedzi immunologiczne u dzieci, ale także zmieniła wrodzoną odpowiedź immunologiczną, osłabiając zdolność organizmu do zwalczania patogenów. Dowody epidemiologiczne sugerują, że ekspozycja na metale ciężkie zmienia poziom cytokin i jest związana z rozwojem reakcji zapalnych [51, 52].

Co ciekawe, niektóre z badań przedstawiają inne niekorzystne mechanizmy działania metali ciężkich w procesie kancerogenezy. Sugeruje się, że kadm może naśladować hormony steroidowe, takie jak androgeny i estrogeny, wpływając przez to na metabolizm komórkowy oraz ekspresję receptorów hormonalnych, co potwierdza jego możliwą rolę w rozwoju nowotworów hormonozależnych, takich jak rak piersi [53, 54].

3. Nutraceutyki

Nutraceutyk (ang. *nutraceutical*), wg. definicji zaproponowanej i wprowadzonej przez przewodniczącego amerykańskiej organizacji „Fundacja dla Innowacji w Medycynie”, dr. Stephena L. DeFelice, to *każda substancja, która może być uważana za żywność lub część żywności i dostarcza korzyści zdrowotne, włączając zapobieganie i/lub leczenie chorób* [55]. Nutraceutyki to pojęcie szersze niż żywność funkcjonalna, która jest rozumiana jako produkty spożywcze o udowodnionym naukowo działaniu szerszym niż zapewniającym codzienne funkcjonowanie, mającą korzystny wpływ na zdrowie fizyczne i psychiczne [56, 57]. Żywność funkcjonalna, inaczej zwana bioaktywną, wzbogacaną czy prozdrowotną, ma formę konwencjonalną, czyli postać artykułu żywnościowego, natomiast nutraceutyki mogą być przyjmowane doustnie również w formie tabletek czy syropów zawierających substancje bioaktywne pozyskiwane z produktów pochodzenia naturalnego. Możemy więc do nich zaliczyć również suplementy diety, preparaty ziołowe, a także witaminy, kwasy omega i błonnik.

Rynek sprzedaży suplementów diety i produktów dostępnych bez recepty, szczególnie po okresie pandemii, notuje stały i wysoki wzrost [58]. Według danych z raportu firmy PMR Polacy w 2022 roku wydali ok. 7,7 mld zł na suplementy diety i podobne im produkty, czyli o miliard więcej niż zanotowano w 2021 roku [59]. Jest to spowodowane głównie cechami produktu takimi jak łatwość spożycia (np. w formie tabletki) czy ogólnodostępność w aptekach i drogeriach. Jednak z prawnego punktu widzenia suplementy diety i nutraceutyki nie mają statusu leku, tylko są żywnością [60]. Co interesujące, świadomość społeczeństwa polskiego na temat tego, czym dokładnie są suplementy diety i w jakich sytuacjach sięgać po takie preparaty, plasuje się na wysokim poziomie. Blisko 95% badanych wskazało poprawną definicję, a wśród osób deklarujących kupowanie suplementów diety aż 90% stanowią osoby zdrowe lub z niedoborami składników odżywczo-

czych [61]. Zaledwie 2% osób zażywających takie produkty to osoby chore, co może oznaczać, że suplementy diety są coraz częściej stosowane zgodnie z przeznaczeniem, celem uzupełniania braków w diecie czy też prewencyjnie, a nie jako substytuty leków. Sięgamy po nie najczęściej, aby niwelować skutki powszechnie występujących tzw. chorób cywilizacyjnych, jak otyłość i cukrzyca typu 2, by wspomóc odchudzanie i obniżanie stężenia glukozy we krwi, nadciśnienie i stres, kiedy korzystamy z substancji o działaniu wyciszającym, oraz choroby układu oddechowego związane nie tylko z infekcjami, ale również z zanieczyszczeniem powietrza i smogiem, kiedy to suplementujemy się witaminami i substancjami wzmacniającymi układ odpornościowy [62]. Największym zaufaniem cieszą się produkty ze składnikami pozyskiwanymi z roślin znanych Polakom od pokoleń lub powszechnie stosowanych w medycynie azjatyckiej. Jak na pierwszą podgrupę i jej popularność ma wpływ przede wszystkim tzw. marketing szeptany, tak druga swoją renomę zawdzięcza głównie popularyzacji produktów wschodnich w sprzedaży internetowej dzięki powszechnej globalizacji. W niniejszej pracy zostaną zaprezentowane trzy wybrane składniki pochodzenia naturalnego, szeroko stosowane w tradycyjnej medycynie chińskiej i o wysokiej lub rosnącej popularności w Polsce: gingerol, berberyna i kwas salwianolowy B.

3.1. Potencjał leczniczy nutraceutyków

W obliczu nieustająco rosnącej liczby diagnozowanych przypadków chorób cywilizacyjnych, w tym dietozależnych, zdrowie publiczne staje się kluczowym elementem istnienia społeczeństw i jakości życia. Konieczne jest skupienie się na profilaktyce zdrowotnej opartej na racjonalnym odżywianiu bogatym w wysokiej jakości produkty spożywcze dostarczające niezbędnych bioskładników. W ostatecznym rozrachunku takie rozwiązanie okazuje się być ok. 20 razy tańsze od leczenia farmakologicznego. Dodatkowo substancje te wykazują znacząco mniej efektów ubocznych w porównaniu do wielu konwencjonalnie stosowanych środków leczniczych. Ma to duże znaczenie, szczególnie biorąc pod uwagę terapie pacjentów onkologicznych. Doskonałe źródło substancji bioaktywnych stanowią nutraceutyki, których rynek rozwija się w ostatnich latach bardzo intensywnie. W szerokim asortymencie polskich nutraceutyków można wyróżnić różnorodne preparaty, takie jak colostryna, ekstrakt z biopeptydów siary, który stosowany jest w profilaktyce choroby Alzheimera, owofosfolipidy, żółtka jajka wzmacniające naturalną odporność organizmu ze względu na wysoką zawartość n-3 kwasów tłuszczowych, a także wyciąg z aronii wykorzystywany w profilaktyce chorób serca [62].

Dostępne bazy literaturowe są coraz bogatsze w badania opisujące potencjał leczniczy związków pochodzenia naturalnego. Badania *in vitro* i na zwierzętach wykazały, że kurkumina hamuje aktywację NF- κ B i redukuje produkcję prozapalnych cytokin [63]. Związek wykazał również zdolność do inhibicji szlaków sygnałowych zależnych od receptora HER2/neu, którego nadekspresję stwierdzono w przypadku raka piersi, stercza, jajników i płuc [64]. Dodatkowo kurkumina zakłóca komunikację między receptorami HER2/neu a receptorami estrogenowymi. Baur i wsp. opisali badanie wskazujące, iż resweratrol, występujący w czerwonych winogronach oraz jagodach, stymuluje aktywację AMPK (kinaza adenylozynomonofosforanowa aktywowana przez AMP), enzymu regulującego metabolizm energetyczny i homeostazę glukozy. Zaburzenia w funkcjonowaniu AMPK mogą wpłynąć na postęp procesów starzenia się oraz rozwój takich chorób jak otyłość,

cukrzyca i choroby serca. Autorzy pracy wykazali, iż aktywacja AMPK przez ekspozycję gryzoni na resweratrol może prowadzić do poprawy wrażliwości na insulinę, zmniejszenia masy ciała oraz wydłużenia życia.

Warto zaznaczyć, iż choć nutraceutyki wykazują obiecujący potencjał leczniczy, ich zastosowanie jako terapii musi być dobrze przebadane i zrozumiane. Badania naukowe są wciąż prowadzone, aby potwierdzić skuteczność i bezpieczeństwo tych związków w kontekście leczenia szerokiego zakresu chorób i dolegliwości zdrowotnych.

3.2. Przeciwnowotworowe działanie nutraceutyków

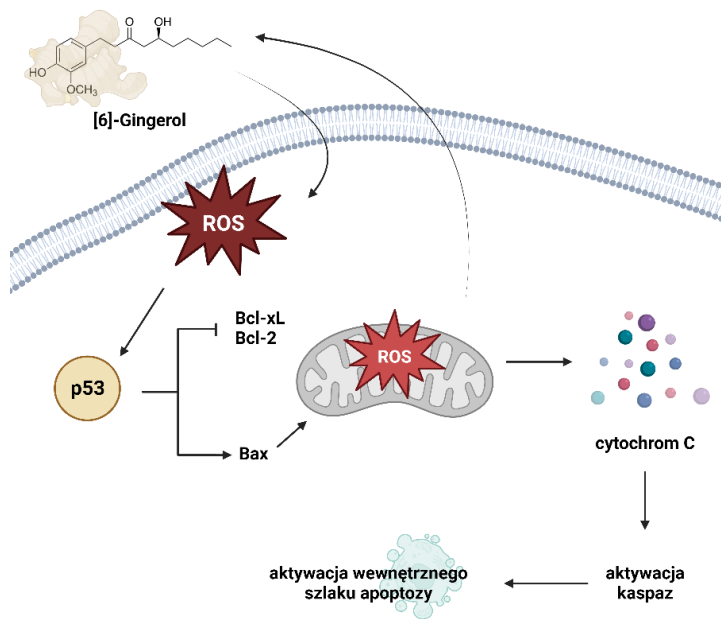
Ostatnie lata wykazały również znaczący wpływ stosowanej diety na rozwój chorób nowotworowych [65, 66]. W Polsce rocznie odnotowuje się średnio ~160 tys. nowych przypadków nowotworów (dane dla obu płci) oraz blisko 100 tys. zgonów [67]. Niepokojące statystyki skłaniają środowisko naukowe do poszerzania wiedzy i poszukiwania nowych rozwiązań terapeutycznych. Ze strony pacjentów priorytetem jest prewencja schorzeń onkologicznych. Spożywanie dużej ilości mięsa z jednoczesnym ograniczeniem konsumpcji błonnika, witamin oraz składników mineralnych może przyczynić się do rozwoju takich schorzeń jak rak piersi czy jelita grubego [68, 69].

W związku z tym szczególnie pacjenci znajdujący się w grupie zwiększonego ryzyka powinni rozważyć stosowaną przez siebie dietę i wprowadzić w niej odpowiednie modyfikacje. Spośród intensywnie analizowanych na przestrzeni ostatnich lat nutraceutyków wyselekcjonowano te, które mogą umożliwiać prewencję chorób onkologicznych oraz wspomagać terapię konwencjonalną. Najczęściej odnotowywane działanie przeciwnowotworowe tych związków wiąże się z zahamowaniem procesu podziału komórkowego, indukcją śmierci komórkowej: apoptozy oraz nekrozy, zredukowaniem tempa procesu angiogenezy oraz obniżeniem zdolności komórek nowotworowych do przerzutowania [70]. W poniższym rozdziale Autorzy opisali doniesienia przedstawiające potencjał przeciwnowotworowy trzech związków naturalnych: [6]-gingerolu, berberyny oraz kwasu salwianolowego B.

3.2.1. [6]-Gingerol

Gingerol (in. [6]-gingerol, [6]-G) jest związkiem fenolowym występującym w imbirze. Odpowiedzialny jest za aktywację receptorów ciepła na języku, a tym samym za ostry smak produktu [71]. Aktualna literatura zawiera dużą ilość doniesień wskazujących na przeciwpalną i przeciwnowotworową działalność [6]-gingerolu. Ekstrakt z imbiru posiada zdolność redukcji stanu zapalnego wywołanego przez lipopolisacharydy (LPS) na drodze hamowania aktywności enzymów indukowanej tlenkiem azotu syntazy (iNOS) oraz cyklooksygenazy-2 (COX-2), a także blokowania aktywacji czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B) [72]. Ponadto wstępne badania wykazały, iż zastosowanie [6]-G w leczeniu komórek nowotworowych skutkuje obniżeniem poziomu ekspresji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*), aktywacją białka p53 oraz redukcją ekspresji antyapoptotycznego białka Bcl-2. Lee i wsp. opisali również, iż [6]-gingerol hamuje adhezję, inwazję, ruchliwość komórek linii komórkowych ludzkiego nowotworu piersi [73]. Nafees i wsp. dokonali obszernego opisu szlaków molekularnych powiązanych z nowotworami, które mogą być modulowane przez gingerol [74].

Potencjał przeciwnowotworowy tego fenolu został przeanalizowany zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Tasi i wsp. przeprowadził obserwację efektów administracji gingerolu do komórek raka płuca A549 oraz modeli mysich [75]. Autorzy wykazali, iż leczenie skutkowało zmniejszeniem rozmiaru guza oraz wzrostu komórek linii A549 poprzez zahamowanie ekspresji białka peptydazy, specyficznego dla ubikwityny (USP14, ang. *ubiquitin specific peptidase 14*), odpowiedzialnego za odcinanie ubikwityny z białek. Co więcej, odnotowano spadek ekspresji białek biorących udział w ferroptozie zależnej od autofagii. [6]-G wykazał również możliwość indukcji wcześniej i później apoptozy w komórkach raka piersi [76]. Wykazano aktywację białka p53 w mechanizmie DDR (ang. *DNA damage response*), co skutkowało stymulacją ekspresji p21 i p27 oraz spadkiem poziomu cykliny D1, cykliny E i CDK4 zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i translacyjnym, powodując zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1. Autorzy zaobserwowali również wzrost poziomu pro-apoptotycznego białka BAX, przy jednoczesnym spadku anty-apoptotycznego Bcl-2 oraz Bcl-xL. Ponadto terapia z zastosowaniem [6]-gingerolu skutkowała obniżeniem poziomu ATP oraz potencjału błony mitochondrialnej, co prowadzi do uwolnienia cytochromu c z mitochondriów do cytozolu, a następnie aktywacji wewnętrznej apoptozy mitochondrialnej zależnej od kaspazy 9 (rys. 1).



Rysunek 1. Schemat mechanizmu regulacji wewnętrznego szlaku apoptozy zależnej od p53 przez [6]-gingerol w komórkach raka piersi

Obiecujące są doniesienia Farombi i wsp. przedstawiające wpływ [6]-G na mysie guzy raka jelita grubego wywołanego ekspozycją na benzo[a]piren (B[a]P) oraz sól sodową siarczanu dekstranu (DSS, ang. *dextran sulphate sodium*) [77]. Zaobserwowano redukcję w formowaniu guza, dodatkowo ekspresja Ki67, WNT3a, DVL-2 i β -kateniny spadła w efekcie ekspozycji myszy na [6]-gingerol. Badany związek indukował ekspresję białek APC, P53 oraz ilość jąder komórkowych pozytywnych dla markeru TUNEL. Jedno-

cześnie w rezultacie przeprowadzonej terapii nastąpiła redukcja ekspresji TNF- α , IL-1 β , INOS, COX-2 oraz cykliny D1. Ponadto [6]-G wykazuje zdolność do hamowania procesu angiogenezy poprzez zmniejszenie stężenia czynników wzrostu VEGF, angiopoetyny-1, FGF i GDF-15 w jelicie grubym myszy poddanych ekspozycji na B[a]P i DSS.

3.2.2. Berberyna

Berberyna (BBR) jest alkaloidem benzylotetraizochinoliny, związkiem fitochemicznym ekstrahowanym z korzeni takich roślin jak: *Berberis vulgaris*, *Hydrastis canadensis*, *Coptis chinensis*, *Arcangelisia flava*, *Berberis aquifolium* czy *Berberis aristata* [78]. Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci BBR znalazła powszechnie uznanie ze względu na wszechstronne działanie farmakologiczne, obejmujące właściwości przeciwbakteryjne, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe, przeciwparazytowe, przeciwbiegunkowe, hipolipemiczne, obniżające ciśnienie krwi [79]. Badania wykazują, że berberyna może być potencjalnym środkiem terapeutycznym w leczeniu różnych rodzajów nowotworów poprzez wpływ na różnorodne szlaki molekularne i białka związane z procesami nowotworzenia. Wykazuje działanie cytotoksyczne wobec potrójnie negatywnych nowotworów piersi (TNBC, ang. *triple-negative breast cancer*), które charakteryzują się wysokim poziomem agresji [80]. BBR wykazuje znaczny potencjał w wywoływaniu apoptozy i autofagii w komórkach nowotworowych [81-83]. Dodatkowo różne badania wskazują, że BBR może hamować proliferację komórek nowotworowych poprzez inhibicję cząsteczek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, prowadząc do zatrzymania cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych [84]. Ekspozycja komórek MDA-MB-468 na BRB indukowała znaczny wzrost populacji fazy G1 przy jednoczesnym spadku faz S i G2/M cyklu komórkowego.

Berberyna, podobnie jak inne związki naturalne, może być użyta jako dodatkowe wsparcie w terapii przeciwnowotworowej, wykazując wysoką skuteczność. Niestety, ograniczona przepuszczalność komórek oraz szybki rozpad berberyny w osoczu stanowią wyzwanie dla jej skutecznego zastosowania. Nanobiotechnologia oferuje innowacyjną platformę nano, która może zwiększyć efektywność przeciwnowotworową berberyny [85]. Obecne badania wskazują, że wykorzystanie nanonośników do dostarczenia berberyny do konkretnych miejsc w organizmie może aktywować szereg kluczowych szlaków molekularnych, takich jak p53, bax, beclin-1, kaspazy (w tym kaspazy 3/9) oraz kaskadę sygnałową MAPK, a także zmniejszyć ekspresję białek Bcl-2, mTOR i Wnt/ β -kateniny. Iqbal i wsp. przedstawili dokładny opis opartych na nanotechnologii aktualnych strategii terapeutycznych wykorzystywanych do dostarczania berberyny [85].

Istnieją również liczne doniesienia dotyczące berberyny i jej ochronnego działania na toksyny naturalne, przemysłowe i środowiskowe powodujące różnego rodzaju choroby, w tym cywilizacyjne [86]. Majeed i wsp. Udowodnili, że związki aktywne wyizolowane z *B. vulgaris* zmniejszają efekty uboczne popularnych leków, jak aspiryna, która ma działanie drażniące na śluzówkę żołądka, poprzez zmniejszenie infiltracji komórek i złagodzenie martwicy [87]. Przyjmowanie berberyny zmniejsza również stan zapalny wywołany substancjami zawieszonymi w dymie papierosowym, ograniczając rozwinięcie się nieinfekcyjnego zapalenia płuc [88]. Ponieważ berberyna obniża stres oksydacyjny i powstawanie wolnych rodników, powinna być także stosowana wspomagająco w leczeniu przewlekłych chorób spowodowanych neurotoksynami takimi jak etanol czy metale ciężkie, wykazując zarówno działanie niwelujące toksyczność, jak i neuroprotektoryjne [89, 90].

3.2.2.1. Korzyści stosowania berberyny w przemyśle

Właściwości biochemiczne berberyny wykorzystywane są nie tylko w przemyśle farmaceutycznym, ale również w rolno-spożywczym, chemicznym i perfumeryjno-kosmetycznym. Jej główna aktywność biologiczna opiera się na działaniu przeciwdrobnoustrojowym i przeciwzapalnym, jest chętnie wykorzystywana w dermo i nutrikosmetykach nie tylko jako składnik poprawiający wygląd, ale również jako środek konserwujący, ochraniający konsumenta podwójnie przed popularnymi szczepami bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, jak *S. aureus* czy *E. coli*, również tych lekoopornych [91]. Te same właściwości oraz niska toksyczność berberyny przemawiają również za wykorzystaniem jej w ochronie żywności. Najnowsze badania z 2022 roku ukazują możliwość wykorzystania berberyny do wytwarzania antybakteryjnych opakowań, które pozwolą na dłuższe zachowanie świeżości produktu wraz z jego walorami odżywczymi i smakowymi [92]. Sama berberyna jest też bezpieczna dla zwierząt, również hodowlanych, i może być wykorzystywana do wspomaganie w leczeniu ich pasożytów [93].

3.2.3. Kwas salwianolowy B

Kwas salwianolowy B (SAB) jest jednym z bioaktywnych związków izolowanych z korzenia i kłącza rośliny *Salvia miltiorrhiza*, która jest stosowana w tradycyjnej medycynie chińskiej. Dotychczasowe badania wykazały przeciwzapalną i antyoksydacyjną aktywność SAB, dzięki czemu może on przyczynić się do zatrzymania reakcji oksydacyjnych, które przyczyniają się do rozwoju wielu chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów [94]. Zastosowanie SAB spowodowało wyraźne zmniejszenie indukcji zarówno metaloproteinaz macierzy (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*), które odgrywają rolę mediatorów stanu zapalnego, jak i migracji komórek indukowanej przez LPS poprzez hamowanie produkcji białek MMP-2 i MMP-9, a także obniżenie aktywności kinazy sygnalizacyjnej pochodzącej z zewnątrz (ERK1/2) oraz kinazy NH2-końcowej c-Jun (JNK) [95]. Aktywność przeciwnowotworowa SAB wiązana jest z indukcją procesu apoptozy [96, 97]. Mechanizmy tego działania obejmują aktywację kaspaz, zmniejszenie poziomu białek antyapoptotycznych (Bcl-2), aktywację białek proapoptotycznych (Bak, Bax), regulację szlaków sygnalizacyjnych PI3K/Akt/MAPK oraz hamowanie aktywności NF-κB.

Wszystkie opisane wyżej działania przeciwnowotworowe sprawiają, że SAB jest interesującym kandydatem do dalszych badań nad jego potencjalnym wykorzystaniem w terapii przeciwnowotworowej lub jako składników dietetycznych w profilaktyce nowotworowej. Jednak zawsze należy pamiętać, że badania w tej dziedzinie są nadal w toku, a zastosowanie SAB w kontekście leczenia nowotworów wymaga dalszej weryfikacji oraz badań klinicznych.

3.2.3.1. Potencjalne wykorzystanie kwasu salwianolowego B w produktach kosmetycznych

Coraz częściej wspomina się o kwasie salwianolowy B w kontekście wykorzystywania go w przemyśle kosmetycznym. Nie tylko wspomaga produkcję kolagenu, głównie typu III, przez komórki nabłonka, ale również wpływa pośrednio na kondycję skóry, poprawiając jej mikrokrążenie [98, 99]. Eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem fibroblastów oraz keratynocytów potwierdziły, że kwas salwianolowy B powoduje efekt stymulujący ich wzrost oraz migrację [100]. Takie właściwości zachęcają do jego sto-

sowania nie tylko celem odwrócenia efektów starzenia się skóry, ale również do bezpośredniego stosowania na rany i blizny. Kwas salwianolowy B również zbadano pod kątem wykorzystania go w inhalacjach. Guan i wsp. potwierdzili, że wdychanie tego polifenolu korzystnie wpłynęło na stan zapalny dróg oddechowych spowodowany pyłem zawieszonym (PM_{2,5}), najbardziej szkodliwym spośród wszystkich stałych składników w zanieczyszczonym powietrzu i smogu [101]. Dodatkowo zastosowanie inhalacji, a nie podaży substancji aktywnej w postaci doustnej, spowodowało zwiększenie jego biodostępności.

4. Podsumowanie

Zanieczyszczenie powietrza, szczególnie w postaci smogu, przyczynia się do przedwczesnych zgonów i wielu chorób układu oddechowego oraz innych schorzeń, a także może wpływać na ryzyko nowotworów. Doniesienia te zostały potwierdzone przez szereg badań naukowych. Polska wyróżnia się jako jeden z krajów w Unii Europejskiej z najbardziej zanieczyszczonymi miastami. Ekspozycja na kadm i ołów, występujące w smogu przyczynia się do rodzajów szeregu nowotworów, w tym raka prostaty, piersi, nerki, pęcherza moczowego i płuc. Mechanizm działania metali ciężkich opiera się na tworzeniu reaktywnych form tlenu (ROS), które powodują uszkodzenia oksydacyjne. Konwencjonalna medycyna, oparta w głównej mierze na syntetycznych związkach chemicznych, stanowi coraz większy problem, biorąc pod uwagę chociażby rosnący problem oporności wielolekowej występujących w komórkach nowotworowych. Biorąc pod uwagę przedstawiony wyżej problem oraz fakt, iż wiele ze stosowanych rozwiązań terapeutycznych wiąże się ze szkodliwymi efektami ubocznymi, naukowcy na przestrzeni ostatnich lat poszukują związków pochodzenia naturalnego, które mogą zastąpić dotychczasowe rozwiązania terapeutyczne. Minione lata pokazały rosnący potencjał przeciwnowotworowy substancji pochodzenia naturalnego, co stanowi znakomitą podstawę do rozwoju nowego nurtu terapeutycznego w leczeniu pacjentów onkologicznych. Mechanizm kancerogennego działania metali ciężkich zawartych w smogu opiera się na intensywnej produkcji reaktywnych form tlenu. Szereg przebadanych dotychczas nutraceutyków wykazuje działanie antyoksydacyjne, co zostało przedstawione w powyższej pracy. Biorąc pod uwagę ten fakt, istnieje możliwość, iż nutraceutyki wykażą działanie ochronne wobec organizmu w kontekście kancerogennego działania składników smogu. Zdaniem autorów pracy jest to niezwykle intrygujący nurt badawczy, który wymaga przeprowadzenia szeregu odpowiednich analiz.

Finansowanie

Badania zostały sfinansowane przez projekt Ministerstwa Edukacji i Nauki w ramach programu pod nazwą „Studenckie koła naukowe tworzą innowacje” 2022/23 o tytule „Nutraceutyki w walce z kancerogennym działaniem smogu.” i numerze SKN/SP/534790/2022.

Literatura

1. IQAir World Air Quality Report 2022, 2023, <https://www.iqair.com/world-air-quality-report> [data dostępu: 6.08.2023].
2. Tvinnereim E., Liu X., Jamelske E.M., *Public perceptions of air pollution and climate change: different manifestations, similar causes, and concerns*, Climatic Change, 140, 2017, s. 399-412.

3. Zhu W., Yao N., Guo Q., Wang F., *Public risk perception and willingness to mitigate climate change: city smog as an example*, Environmental Geochemistry and Health, 42, 2020, s. 881-893.
4. Darçın M., *Association between air quality and quality of life*, Environmental Science and Pollution Research International, 21, 2014, s. 1954-1959.
5. *Ambient (outdoor) air pollution*, [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health) [data dostępu: 25.07.2023].
6. *Air pollution*, https://www.who.int/health-topics/air-pollution#tab=tab_1 [data dostępu: 25.07.2023].
7. *Air quality in Europe 2022*, European Environment Agency, <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2022>, [data dostępu: 25.07.2023].
8. World Bank Group, *Air Quality in Poland, what are the issues and what can be done?* <https://documents1.worldbank.org/curated/en/426051575639438457/pdf/Air-Quality-in-Poland-What-are-the-Issues-and-What-can-be-Done.pdf> [data dostępu: 25.07.2023].
9. Nazar W., Plata-Nazar K., *Changes in air pollution-related behaviour measured by Google Trends search volume index in response to reported air quality in Poland*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 18, 2021, 11709.
10. Traczyk P., Gruszecka-Kosowska A., *The condition of air pollution in Kraków, Poland, in 2005–2020, with Health Risk Assessment*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 17, 2020, s. 1-22.
11. Khomenko S., Cirach M., Pereira-Barboza E., Mueller N., Barrera-Gómez J., Rojas-Rueda D., de Hoogh K., Hoek G., Nieuwenhuijsen M., *Premature mortality due to air pollution in European cities: a health impact assessment*, The Lancet. Planetary Health, 5, 2021, s. 121-134.
12. Encyklopedia PWN, *Smog*, <https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/smog;3976775.html> [data dostępu: 25.07.2023].
13. English meaning – Cambridge Dictionary, *Smog*, <https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/smog> [data dostępu: 25.07.2023].
14. *Criteria air pollutants*, US EPA, <https://www.epa.gov/criteria-air-pollutants> [data dostępu: 25.07.2023].
15. *Air pollution sources*, European Environment Agency, <https://www.epa.gov/criteria-air-pollutants> [data dostępu: 25.07.2023].
16. Jandacka D., Durcanska D., Cibula R., *Concentration and inorganic elemental analysis of particulate matter in a road tunnel environment (Žilina, Slovakia): Contribution of non-exhaust sources*, Frontiers in Environmental Science, 10, 2022, 952577.
17. Lenschow P., Abraham H., Kutzner K., Lutz M., Preuß J.D., Reichenbacher W., *Some ideas about the sources of PM10*, Atmospheric Environment, 35, 2001, s. 23-33.
18. Jaecker-Voirol A., Pelt P., *PM10 emission inventory in Ile de France for transport and industrial sources: PM10 re-suspension, a key factor for air quality*, Environmental Modelling & Software, 15, 2000, s. 575-581.
19. *Non-exhaust, particulate emissions from road transport, an ignored environmental policy challenge*, 2020.
20. Krakowiak A., *Wpływ zanieczyszczenia środowiska na zdrowie*, Pulmonologia, cz. II., Medical Tribune Polska, 2010.
21. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 13 września 2012 r. w sprawie dokonywania oceny poziomów substancji w powietrzu (Dz.U. z 2012 poz. 1032).
22. Marek K., *Choroby zawodowe układu oddechowego wywołane przez pył*, Medical Tribune Polska, 2010.

23. Xu M., Li F., Wang M., Zhang H., Xu L., Adcock L.M., Chung K.F., Zhang Y., *Protective effects of VGX-1027 in PM_{2.5}-induced airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness*, European Journal of Pharmacology, 842, 2019, s. 373-383.
24. Brown J.S., *Integrated Science Assessment (ISA) for Ozone and Related Photochemical Oxidants* (Final Report, Feb 2013), US EPA National Center for Environmental Assessment, 2013.
25. Sacks J., *Integrated Science Assessment (ISA) for Particulate Matter* (Final Report, Dec 2019), US EPA National Center for Environmental Assessment, 2019.
26. Polivka B.J., *The Great London Smog of 1952*, American Journal of Nursing, 118, 2018, s. 57-61.
27. Kleczkowski P., *Smog w Polsce*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2019.
28. Chen F., Lin Z., Chen R., Norback D., Liu C., Kan H., Deng Q., Huang C., Hu Y., Zou Z., Liu W., Wang J., Lu C., Qian H., Yang X., Zhang X., Qu F., Sundell J., Zhang Y., Li B., Sun Y., Zhao Z., *The effects of PM_{2.5} on asthmatic and allergic diseases or symptoms in preschool children of six Chinese cities, based on China, Children, Homes and Health (CCHH) project*, Environmental Pollution, 232, 2018, s. 329-337.
29. King C., Kirkham J., Hawcutt D., Sinha I., *The effect of outdoor air pollution on the risk of hospitalisation for bronchiolitis in infants: A systematic review*, PeerJ, 2018, 5352.
30. Zanobetti A., Bind M.A.C., Schwartz J., *Particulate air pollution and survival in a COPD cohort*, Environmental Health: A Global Access Science Source, 7, 2008, s.1-9.
31. Hazari M.S., Haykal-Coates N., Winsett D.W., Costa D.L., Farraj A.K., *A single exposure to particulate or gaseous air pollution increases the risk of aconitine-induced cardiac arrhythmia in hypertensive rats*, Toxicological Sciences, 112, 2009, s. 532-542.
32. Selevan S.G, Borkovec L., Slott V.L., Zudová Z., Rubeš J., Evenson D.P., Perreault S.D., *Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution*, Environmental Health Perspectives, 108, 2000, s. 887-894.
33. Yi L., Wei C., Fan W., *Fine-particulate matter (PM_{2.5}), a risk factor for rat gestational diabetes with altered blood glucose and pancreatic GLUT2 expression*, Gynecological Endocrinology, 33, 2017, s. 611-616.
34. Perera F., Illman S., Kinney P., Whyatt R., Kelvin E., Shepard P., Evans D., Fullilove M., Ford J., Miller R., Meyer I., Rauh V., *The challenge of preventing environmentally related disease in young children: community-based research in New York City*, Environmental Health Perspectives, 110, 2002, s. 197-204.
35. Answer M., Godil D., Khan M., Nassani A., Zaman K., Abro M., *The impact of coal combustion, nitrous oxide emissions, and traffic emissions on COVID-19 cases: a Markov-switching approach*, Environmental Science and Pollution Research, 28, 2021, s. 64882-64891.
36. Conticini E., Frediani B., Caro D., *Can atmospheric pollution be considered a co-factor in extremely high level of SARS-CoV-2 lethality in Northern Italy?* Environmental Pollution, 261, 2020, 114465.
37. Hill W., Lim E., Weeden C., Lee C., Augustine M., Chen K., Kuan F., Marongiu F., Evans E., Moore D., Rodrigues F., Pich O., Bakker B., Cha H., Myers R., van Maldegem F., Boumelha J., Veeriah J., Rowan A., Naceur-Lombardelli C., Karasaki T., Sivakumar M., De S., Caswell D., Nagano A., Black J., Martínez-Ruiz C., Ryu M., Huff R., Li S., Favé M., Magness A., Suárez-Bonnet A., Priestnall S., Lüchtenborg M., Lavelle K., Pethick J., Hardy S., McRonald F., Lin M., Troccoli C., Ghosh M., Miller Y., Merrick D., Keith R., Al Bakir M., Bailey C., Hill M., Saal L., Chen Y., George A., Abbosh C., Kanu N., Lee S., McGranahan N., Berg C., Sasieni P., Houlston R., Turnbull C., Lam S., Awadalla P., Grönroos E., Downward J., Jacks T., Carlsten C., Malanchi I., Hackshaw A., Litchfield K., Lester J., Bajaj A., Nakas A., Sodha-Ramdeen A., Ang K., Tufail M., Chowdhry M., Scotland M., Boyles R., Rathinam S., Wilson C., Marrone D., Dulloo S., Fennell D.,

- Matharu G., Shaw J., Riley J., Primrose L., Boleti E., Cheyne H., Khalil M., Richardson S., Cruickshank T., Price G., Kerr K., Benafif S., Gilbert K., Naidu B., Patel A., Osman A., Lacson C., Langman G., Shackelford H., Djearaman M., Kadiri S., Middleton G., Leek A., Hodgkinson J., Totten N., Montero A., Smith E., Fontaine E., Granato F., Doran H., Novasio J., Rammohan K., Joseph L., Bishop P., Shah R., Moss S., Joshi V., Crosbie P., Gomes F., Brown K., Carter M., Chaturvedi A., Priest L., Oliveira P., Lindsay C., Blckhall F., Krebs M., Summers Y., Clipson A., Tugwood J., Kerr A., Rothwell D., Kilgour E., Dive C., Aerts W., Schwarz R., Kaufmann T., Wilson G., Rosenthal R., Van Loo P., Birkbak N., Szallasi Z., Kisistok J., Sokac M., Salgado R., Diossy M., Demeulemeester J., Bunkum A., Stewart A., Frankell A., Karamani A., Toncheva A., Huebner A., Chain B., Campbell B., Castignani C., Puttick C., Richard C., Hiley C., Pearce D., Karagianni D., Biswas D., Levi D., Hoxha E., Cadieux E., Colliver E., Nye E., Gálvez-Cancino F., Athanasopoulou F., Gimeno-Valiente F., Kassiotis G., Stavrou G., Mastrokalos G., Zhai H., Lowe H., Matos I., Goldman J., Reading J., Herrero J., Rane J., Nicod J., Lam J., Hartley J., Peggs K., Enfield K., Selvaraju K., Thol K., Ng K., Dijkstra K., Grigoriadis K., Thakkar K., Ensell L., Shah M., Duran M., Litovchenko M., Sunderland M., Dietzen M., Leung M., Escudero M., Angelova M., Tanić M., Chervova O., Lucas O., Al-Sawaf O., Prymas P., Hobson P., Pawlik P., Stone R., Bentham R., Hynds R., Vendramin R., Saghafinia S., López S., Gamble S., Ung S., Quezada S., Vanloo S., Zaccaria S., Hessey S., Ward S., Boeing S., Beck S., Bola S., Denner T., Marafioti T., Mourikis T., Watkins T., Spanswick V., Barbè V., Lu W., Liu W., Wu Y., Naito Y., Ramsden Z., Veiga C., Royle G., Collins-Fekete C., Fraioli F., Ashford P., Clark T., Forster M., Lee S., Borg E., Falzon M., Papadatos-Pastos D., Wilson J., Ahmad T., Procter A., Ahmed A., Taylor M., Nair A., Lawrence D., Patrini D., Navani N., Thakrar R., Janes S., Hoogenboom E., Monk F., Holding J., Choudhary J., Bhakhri K., Scarci M., Hayward M., Panagiotopoulos N., Gorman P., Khiroya R., Stephens R., Wong Y., Bandula S., Sharp A., Smith S., Gower N., Dhanda H., Chan K., Pilotti C., Leslie R., Grapa A., Zhang H., AbdulJabbar K., Pan X., Yuan Y., Chuter D., MacKenzie M., Chee S., Alzetani A., Cave J., Scarlett L., Richards J., Ingram P., Austin S., Lim E., De Sousa P., Jordan S., Rice A., Raubenheimer H., Bhayani H., Ambrose L., Devaraj A., Chavan H., Begum S., Buderis S., Kaniu D., Malima M., Booth S., Nicholson A., Fernandes N., Shah P., Proli C., Hewish M., Danson S., Shackcloth, Robinson L., Russell P., Blyth K., Dick C., Le Quesne J., Kirk A., Asif M., Bilancia R., Kostoulas N., Thomas M., DeGregori J., Jamal-Hanjani M., Swanton C., *Lung adenocarcinoma promotion by air pollutants*, *Nature*, 616, 2023, s. 159-167.
38. Gabet S., Lemarchand C., Guénel P., Slama R., *Breast cancer risk in association with atmospheric pollution exposure: a meta-analysis of effect estimates followed by a health impact assessment*, *Environmental Health Perspectives*, 129, 2021.
39. So R., Chen J., Mehta A., Liu S., Strak M., Wolf K., Hvidtfeldt U., Rodopoulou S., Stafoggia M., Klompmaker M., Samoli E., Raaschou-Nielsen O., Atkinson R., Bauwelinck M., Bellander T., Boutron-Ruault M., Brandt J., Brunekreef B., Cesaroni G., Concin H., Forastiere F., van Gils C., Gulliver J., Hertel O., Hoffmann B., de Hoogh K., Janssen N., Lim Y., Westendorp R., Jørgensen J., Katsouyanni K., Ketzel M., Lager A., Lang A., Ljungman P., Magnusson P., Nagel G., Simonsen M., Pershagen G., Peter R., Peters A., Renzi M., Rizzuto D., Sigsgaard T., Vienneau D., Weinmayr G., Severi G., Fecht D., Tjønneland A., Leander K., Hoek G., Andersen Z., *Long-term exposure to air pollution and liver cancer incidence in six European cohorts*, *International Journal of Cancer*, 149, 2021, s. 1887-1897.
40. Bogumil D., Wu A., Stram D., Yang J., Tseng C., Le Marchand L., Wu J., Cheng I., Setiawan V., *The association between ambient air pollutants and pancreatic cancer in the Multiethnic Cohort Study*, *Environmental Research*, 202, 2021.

41. Huang X., Guan S., Wang J., Zhao L., Jia Y., Lu Z., Yin C., Yang S., Song Q., Han L., Wang C., Li J., Zhou W., Guo X., Cheng Y., *The effects of air pollution on mortality and clinicopathological features of esophageal cancer*, *Oncotarget*, 8, 2017, 58563.
42. Sakhvidi M., Lequy E., Goldberg M., Jacquemin B., *Air pollution exposure and bladder, kidney and urinary tract cancer risk: A systematic review*, *Environmental Pollution*, 267, 2020.
43. WHO global air quality guidelines: particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀, ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide, carbon monoxide, World Health Organization, 2021.
44. Europeiska kommissionen, Generaldirektoratet för miljö, Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions – Pathway to a Healthy Planet for All EU Action Plan: „Towardz Zero Pollution for Air, Water and Soil”, 2021.
45. Verougstraete V., Lison D., Hotz P., *Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data*, *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 6, 2003, s. 227-256.
46. Feki-Tounsi M., Hamza-Chaffai A., *Cadmium as a possible cause of bladder cancer: a review of accumulated evidence*, *Environmental Science and Pollution Research International*, 21, 2014, s.10561-10573.
47. Filippini T., Torres D., Lopes C., Carvalho C., Moreira P., Naska A., Kasdagli M., Malavolti M., Orsini N., Vinceti M., *Cadmium exposure and risk of breast cancer: A dose-response meta-analysis of cohort studies*, *Environment International*, 142, 2020.
48. Rehman K., Fatima F., Waheed I., Akash M., *Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences*, *Journal of Cellular Biochemistry*, 119, 2018, s. 157-184.
49. Srinivas U., Tan B., Vellayappan B., Jeyasekharan A., *ROS and the DNA damage response in cancer*, *Redox Biology*, 25, 2019.
50. Kotsantis P., Petermann E., Boulton S., *Mechanisms of oncogene-induced replication stress: jigsaw falling into place*, *Cancer Discovery*, 8, 2018, s. 537-555.
51. Ebrahimi M., Khalili N., Razi S., Keshavarz-Fathi M., Khalili N., Rezaei N., *Effects of lead and cadmium on the immune system and cancer progression*, *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 18, 2020, s. 335-343.
52. Zheng K., Zeng Z., Tian Q., Huang J., Zhong Q., Huo X., *Epidemiological evidence for the effect of environmental heavy metal exposure on the immune system in children*, *The Science of the Total Environment*, 868, 2023.
53. Byrne C., Divekar S., Storchan G., Parodi D., Martin M., *Cadmium – a metallo hormone?* *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 2009, s. 266-271.
54. Martin M., Voeller H., Gelmann E., Jianming L., Stoica E., Hebert E., Reiter R., Singh B., Danielsen M., Pentecost E., Stoica A., *Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity*, *Endocrinology*, 143, 2002, s. 263-275.
55. DeFelice S., *The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D*, *Trends in Food Science & Technology*, 6, 1995, s. 59-61.
56. Olędzka R., *Nutraceutyki, żywność funkcjonalna – rola i bezpieczeństwo stosowania*, *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*, 2007, s. 1-8.
57. Bryła P., *Oświadczenia zdrowotne i żywieniowe na rynku produktów żywnościowych*, *Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego*, 2020.
58. Lordan R., *Dietary supplements and nutraceuticals market growth during the coronavirus pandemic – implications for consumers and regulatory oversight*, *PharmaNutrition*, 18, 2021, 100282.
59. *Rynek suplementów diety w Polsce. Analiza rynku i prognozy rozwoju na lata 2022-2027*, <https://mypmr.pro/products/rynek-suplementow-diety-w-polsce> [data dostępu: 7.08.2023].
60. Dąbrowska A., Janoś-Kresło M., *Suplementy diety a prawa konsumentów*, *Ekonomia*, 24, 2019, s. 9-23.

61. Karkoszka M., Banach K., Beberok A., Wrześniok D., *Beauty in a tablet – public knowledge about nutraceuticals*, *Farmacja Polska*, 76, 2020, s. 239-249.
62. Trziszka T., Różański H., *Żywność funkcjonalna i nutraceutyki w profilaktyce chorób cywilizacyjnych*, *HERBALISM*, 1, 2015, s. 9.
63. Freudlsparger C., Greten J., Schumacher U., *Curcumin induces apoptosis in human neuroblastoma cells via inhibition of NFκB*, *Anticancer Research*, 28, 2008, s. 209-214.
64. Walczak K., Marciniak S., Rajtar G., *Cancer chemoprevention – selected molecular mechanisms*, *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* (online), 71, 2017, s. 149-161.
65. Schwingshackl L., Schwedhelm C., Galbete C., Hoffmann G., *Adherence to mediterranean diet and risk of cancer: An updated systematic review and meta-analysis*, *Nutrients*, 9, 2017, s. 1-24.
66. Key T., Schatzkin A., Willett W., Allen N., Spencer E., Travis R., *Diet, nutrition and the prevention of cancer*, *Public Health Nutrition*, 7, 2004, s. 187-200.
67. Krajowy Rejestr Nowotworów, <https://onkologia.org.pl/pl/raporty>, [data dostępu: 2.07.2023].
68. Rossi R., Pericleous M., Mandair D., Whyand T., Caplin M., *The role of dietary factors in prevention and progression of breast cancer*, *Anticancer Research*, 34, 2014, s. 6861-6875.
69. Tárraga López P., Solera Albero J., Rodríguez-Montes J., *Primary and secondary prevention of colorectal cancer*, *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 7, 2014, s. 33-46.
70. Nowak-Perlak M., Bartoszevska E., Molik K., Woźniak M., *Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce. Choroby*, [w:] Nyckowiak J., Leśny J. (red.), *Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce. Nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Część I, Młodzi Naukowcy*, Poznań 2023, s. 77.
71. Yin Y., Dong Y., Vu S., Yang F., Yarov-Yarovoy V., Tian Y., Zheng J., *Structural mechanisms underlying activation of TRPV1 channels by pungent compounds in gingers*, *British Journal of Pharmacology*, 176, 2019, s. 3364-3377.
72. Manju V., Nalini N., *Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer*, *Clinica Chimica Acta*, 358, 2005, s. 60-67.
73. Lee H., Seo E., Kang N., Kim W., *[6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells*, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 2008, s. 313-319.
74. Nafees S., Zafaryab M., Mehdi S.H., Zia B., Rizvi M.A., Khan M.A., *Anti-cancer effect of gingerol in cancer prevention and treatment*, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21, 2020, s. 428-432.
75. Tsai Y., Xia C., Sun Z., *The Inhibitory Effect of 6-Gingerol on Ubiquitin-Specific Peptidase 14 Enhances Autophagy-Dependent Ferroptosis and Anti-Tumor in vivo and in vitro*, *Frontiers in Pharmacology*, 11, 2020, s. 1-11.
76. Sp N., Kang D., Lee J., Bae S., Jang K., *Potential antitumor effects of 6-gingerol in p53-dependent mitochondrial apoptosis and inhibition of tumor sphere formation in breast cancer cells*, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2021.
77. Farombi E., Ajayi B., Adedara I., *6-Gingerol delays tumorigenesis in benzo[a]pyrene and dextran sulphate sodium-induced colorectal cancer in mice*, *Food and Chemical Toxicology*, 142, 2020, 111483.
78. Habtemariam S., *Recent advances in berberine inspired anticancer approaches: From drug combination to novel formulation technology and derivatization*, *Molecules*, 25, 2020.
79. Samadi P., Sarvarian P., Gholipour E., Asenjan K., Aghebati-Maleki L., Motavalli R., Hojjat-Farsangi M., Yousefi M., *Berberine: A novel therapeutic strategy for cancer*, *IUBMB Life*, 72, 2020, s. 2065-2079.
80. El Khalki L., Maire V., Dubois T., Zyad A., *Berberine impairs the survival of triple negative breast cancer cells: Cellular and molecular analyses*, *Molecules*, 25, 2020, s. 506.

81. Wang K., Zhang C., Bao J., Jia X., Liang Y., Wang X., Chen M., Su H., Li P., Wan J., He C., *Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death*, Scientific Reports, 6, 2016, s. 1-14.
82. Dutta S., Mahalanobish S., Saha S., Ghosh S., Sil P., *Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer*, Food and Chemical Toxicology, 128, 2019, s. 240-255.
83. Dai B., Ma Y., Yang T., Fan M., Yu R., Su Q., Wang H., Liu F., Yang C., Zhang Y., *Synergistic effect of berberine and HMQ1611 impairs cell proliferation and migration by regulating Wnt signaling pathway in hepatocellular carcinoma*, Phytotherapy Research, 33, 2019, s. 745-755.
84. Lin Y., Chiu Y., Tsai Y., Tsai Y., Wang J., Tseng L., Chiu J., *Different mechanisms involved in the berberine-induced antiproliferation effects in triple-negative breast cancer cell lines*, Journal of Cellular Biochemistry, 120, 2019, s. 13531-13544.
85. Javed Iqbal M., Quispe C., Javed Z., Sadia H., Qadri Q., Raza S., Salehi B., Cruz-Martins N., Abdulwanis Mohamed Z., Sani Jaafaru M., Abdull Razis A., Sharifi-Rad J., *Nanotechnology-based strategies for berberine delivery system in cancer treatment: pulling strings to keep berberine in power*, Frontiers in Molecular Biosciences, 7, 2021, s. 1-12.
86. Mohammadzadeh N., Mehri S., Hosseinzadeh H., *Berberis vulgaris and its constituent berberine as antidotes and protective agents against natural or chemical toxicities*, Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 20, 2017, 538.
87. Majeed W., Aslam B., Muhammad F., *Histopathological evaluation of gastro protective effect of Berberis vulgaris (Zereshk) seeds against aspirin induced ulcer in albino mice White Mulberry (Morus alba) Evaluation Account View project Development of Bacteriophage Therapy against Multi Drug Resistant Avian Pathogenic E. coli Causing Colibacillosis in Poultry View project*, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015.
88. Lin K., Liu S., Shen Y., Li Q., *Berberine attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation*, Inflammation, 36, 2013, s. 1079-1086.
89. Patil S., Tawari S., Mundhada D., Nadeem S., *Protective effect of berberine, an isoquinoline alkaloid ameliorates ethanol-induced oxidative stress and memory dysfunction in rats*, Pharmacology Biochemistry and Behavior, 136, 2015, s. 13-20.
90. Abdel Moneim A., *Mercury-induced neurotoxicity and neuroprotective effects of berberine*, Neural Regeneration Research, 10, 2015, 881.
91. Freile M., Giannini F., Pucci G., Sturniolo A., Rodero L., Pucci O., Balzaretto V., Enriz R., *Antimicrobial activity of aqueous extracts and of berberine isolated from Berberis heterophylla*, Fitoterapia, 74, 2003, s. 702-705.
92. Zhang G., Maddili S., Tanganchu V., Gopala L., Gao W., Cai G., Zhou C., *Discovery of natural berberine-derived nitroimidazoles as potentially multi-targeting agents against drug-resistant Escherichia coli*, Science China Chemistry, 61, 2018, s. 557-568.
93. Malik T., Kamili A., Chishti M., Tanveer S., Ahad S., Johri R., *Synergistic approach for treatment of chicken coccidiosis using berberine – A plant natural product*, Microbial Pathogenesis, 93, 2016, s. 56-62.
94. Tsai M., Lin Y., Huang Y., *Effects of salviannolic acids on oxidative stress and hepatic fibrosis in rats*, Toxicology and Applied Pharmacology, 242, 2010, s. 155-164.
95. Lin S., Lee I., Chen Y., Lin F., Sheu L., Ku H., Shiao M., Chen J., Chen Y., *Salviannolic acid B attenuates MMP-2 and MMP-9 expression in vivo in apolipoprotein-E-deficient mouse aorta and in vitro in LPS-treated human aortic smooth muscle cells*, Journal of Cellular Biochemistry, 100, 2007, s. 372-384.
96. Sha W., Zhou Y., Ling Z., Xie G., Pang X., Wang P., Gu X., *Antitumor properties of salviannolic acid B against triple-negative and hormone receptor-positive breast cancer cells via ceramide-mediated apoptosis*, Oncotarget, 9, 2018, s. 36331-36343.

97. Guo P., Wang S., Liang W., Wang W., Wang H., Zhao M., Liu X., *Salvianolic acid B reverses multidrug resistance in HCT-8/VCR human colorectal cancer cells by increasing ROS levels*, *Molecular Medicine Reports*, 15, 2017, s.724-730.
98. Chen Y., Lee S., Lin Y., Chiang S., Lin C., *Effects of Danshensu and Salvianolic Acid B from Salvia miltiorrhiza Bunge (Lamiaceae) on cell proliferation and collagen and melanin production*, *Molecules*, 19, 2014, s. 2029-2041.
99. Meng H., Zhao M., Yang R., Deng X., Zhang H., Choi Y., An I., An S., Dong Y., He Y., Li L., Guo M., Yi F., *Salvianolic acid B regulates collagen synthesis: Indirect influence on human dermal fibroblasts through the microvascular endothelial cell pathway*, *Journal of Cosmetic Dermatology*, 21, 2022, s. 3007-3015.
100. Szwedowicz U., Szewczyk A., Gołąb K., Choromańska A., *Evaluation of wound healing activity of salvianolic acid b vitro experimental model*, *international journal of molecular Sciences*, 22, 2021, 7728.
101. Guan Y., Li L., Kan L., Xie Q., *Inhalation of salvianolic acid B prevents fine particulate matter-induced acute airway inflammation and oxidative stress by downregulating the LTR4/MyD88/NLRP3 pathway*, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022, s.1-13.

Potencjał leczniczy nutraceutyków wobec kancerogennego działania smogu

Streszczenie

Zanieczyszczenie powietrza, zwłaszcza w postaci smogu, jest powiązane z przedwczesnymi zgonami, chorobami układu oddechowego i ryzykiem nowotworów, co zostało potwierdzone przez liczne badania naukowe. Polska wyróżnia się w Unii Europejskiej jako kraj z najbardziej zanieczyszczonymi miastami. Ekspozycja na metale ciężkie, takie jak kadm i ołów, obecne w smogu, sprzyja rozwojowi różnych rodzajów nowotworów, w tym raka prostaty, piersi, nerki, pęcherza moczowego i płuc. Mechanizm działania metali ciężkich opiera się na tworzeniu reaktywnych form tlenu (ROS) powodujących uszkodzenia oksydacyjne. W kontekście rosnącego problemu oporności wielolekowej komórek nowotworowych naukowcy szukają związków pochodzenia naturalnego, które mogą stanowić alternatywę dla konwencjonalnych leków. Przyglądając się nutraceutykom, zauważono ich potencjał przeciwnowotworowy oraz zdolność do neutralizacji reaktywnych form tlenu. Autorzy pracy przedstawili najnowsze doniesienia naukowe opisujące potencjał leczniczy nutraceutyków oraz dane dotyczące kancerogennego działania składników smogu.

Słowa kluczowe: smog, metale ciężkie, nowotwory, nutraceutyki, antyoksydanty

Therapeutic potential of nutraceuticals against the carcinogenic effects of smog

Abstract

Air pollution, particularly in the form of smog, is associated with premature deaths, respiratory diseases, and the risk of cancer, as confirmed by numerous scientific studies. Poland stands out as a country in the European Union with the most polluted cities. Exposure to heavy metals, such as cadmium and lead, present in smog, promotes the development of various types of cancer, including prostate, breast, kidney, bladder, and lung cancer. The mechanism of action of heavy metals is based on the generation of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative damage. Given the growing issue of multidrug resistance in cancer cells, scientists are exploring natural compounds as an alternative to conventional drugs. Nutraceuticals have been recognized for their potential anticancer properties and their ability to neutralize reactive oxygen species. The authors present the latest scientific findings describing the therapeutic potential of nutraceuticals and data regarding the carcinogenic effects of smog components.

Keywords: smog, heavy metals, cancer, nutraceuticals, antioxidants

Innowacyjne metody ekologicznej produkcji nasion roślin warzywnych

1. Wprowadzenie

Produkcja nasienna roślin warzywnych charakteryzuje się odmienną specyfiką od warzyw przeznaczonych do spożycia. Zarówno zabiegi agrotechniczne, jak i ochrona roślin muszą uwzględniać czynniki decydujące o potencjale plonotwórczym roślin nasiennych, a więc specyficzną wiedzę z zakresu architektury nasienników, zmierzającą do wytworzenia optymalnego pokroju roślin matecznych, z dobrze wykształconymi pędami głównymi i pierwszego rzędu – wytwarzającymi najlepszej jakości nasiona, znajomość poszczególnych faz rozwoju generatywnego roślin nasiennych, zwłaszcza biologii kwitnienia i zawiązywania nasion, a następnie właściwy dobór metod ukierunkowanych na uzyskanie najlepszej jakości nasion [1, 2]. Dlatego uprawa roślin warzywnych na nasiona, a zwłaszcza dwuletich warzyw (marchew, cebula), stwarza producentom poważne trudności, generując równocześnie zwiększone nakłady na ochronę roślin w dwóch latach wegetacji, pracochłonność i ryzyko strat materiału rozmnożeniowego (wysadków) podczas przechowywania i zaprawiania nasion [3]. Preferowany dotychczas w kraju system produkcji tzw. wysadkowy, polegający na produkcji w pierwszym roku korzeni czy główek na wysadki, które po wykopaniu przechowuje się przez zimę i wysadza w polu w drugim roku uprawy celem reprodukcji nasion, jest systemem kosztochłonnym, obciążonym dużym ryzykiem strat plonów, zwłaszcza w produkcji ekologicznej. Podejmowane próby uprawy warzyw dwuletich na nasiona systemem bezwysadkowym, w którym wysadki pozostają na zimę w glebie (nie ma więc konieczności ich wykopywania i przechowywania), jak dotąd nie przyniósł w naszych warunkach klimatycznych oczekiwanych rezultatów (z wyjątkiem rejonów Pomorza Zachodniego) ze względu na przemarzanie wysadków [4]. W tym zakresie uzasadnione są badania nad opracowaniem i wdrożeniem skutecznych metod indukcji odporności roślin przy pomocy biostymulatorów, jak również odporności uzyskanej na etapie kiełkowania nasion. Wstępne badania autorów wskazują na efektywność wybranych metod i potencjalne możliwości wdrożenia ich do produkcji nasiennej roślin warzywnych i rolniczych [5, 6]. Znaczący problem w produkcji nasiennej wymienionych gatunków stanowią także trudne do zwalczania agrofagi, a zwłaszcza choroby, często przenoszone z nasionami. W uprawach ekologicznych dziesiątkują one plony roślin już w pierwszym roku uprawy, ograniczając możliwości reprodukcji nasion. Uzyskane z takich upraw nasiona są zazwyczaj niskiej jakości i zdrowotności [7, 8]. W uprawach ekologicznych nie dopuszcza się stosowania pestycydów, istnieje więc konieczność zastępowania ich alternatywnymi, proekologicznymi metodami i środkami biologicznymi kompleksowo oddziałującymi na patogeny oraz wzrost i rozwój

¹ regina.janas@inhort.pl, Instytut Ogrodnictwa – PIB Skierniewice.

² mieczyslaw.grzesik@inhort.pl, Instytut Ogrodnictwa – PIB Skierniewice.

³ aleksandra.wojska@inhort.pl, Instytut Ogrodnictwa – PIB Skierniewice.

⁴ katarzyna.traczyk@inhort.pl, Instytut Ogrodnictwa – PIB Skierniewice.

roślin nasiennych, a zwłaszcza na te fazy fenologiczne, podczas których roślina nasienne wykazuje największą wrażliwość na infekcje (kiełkowanie nasion, kwitnienie roślin nasiennych, zawiązywanie nasion) [9]. Odmienna specyfika uprawy roślin nasiennych, ukierunkowana na zwiększenie potencjału plonotwórczego i produkcję wysokiej jakości nasion, wymaga pilnego opracowania kompleksowych programów i zaleceń uprawy oraz ochrony dla producentów ekologicznych nasion, podejmujących znacznie większe ryzyko i wyzwania od producentów ekologicznych warzyw przeznaczonych do spożycia [10, 11]. Muszą one uwzględniać wpływ każdej opracowanej metody na rozwój generatywny roślin nasiennych, zwłaszcza kwitnienie i zawiązywanie nasion na roślinie matecznej, jakość materiału rozmnożeniowego (wysadków) w przypadku roślin dwuletnich, wartość przechwalniczą wysadków oraz jakość otrzymanych nasion. Badania w zakresie ekologicznych metod produkcji nasion wybranych gatunków roślin warzywnych uwzględniają innowacyjne techniki uszlachetniania materiału siewnego, stymulację potencjału plonotwórczego roślin nasiennych oraz ocenę wpływu stosowanych metod i środków biologicznych na ontogenezę i zdrowotność roślin nasiennych, formowanie nasion na roślinach matecznych oraz jakość reproduktowanego materiału siewnego [12-14].

Jedną z najbardziej skutecznych metod uszlachetniania nasion, doskonalonych na szeroką skalę w Instytucie Ogrodnictwa – PIB i adresowanych dla praktyków (stąd większość autorskiej cytowanej literatury), jest ich odkażanie i biokondycjonowanie celem eliminacji porażenia zewnętrznego (kontaminacji) i/lub inhibitorów kiełkowania z okrywy nasiennej oraz poprawy kiełkowania i wzrostu uzyskanych roślin. Do nich należy:

- ozonowanie przy pomocy dostępnych ozonatorów;
- hydrotermoterapia w gorącej wodzie od 40°C do 50°C przez okres od 20 do 30 minut [1, 2, 15,];
- traktowanie pulsującymi falami radiowymi [16, 17];
- hydrokondycjonowanie, biokondycjonowanie, stosowanie naturalnych odkażalników i biokondycjonerów [1, 2, 9, 18-21].

Odkażanie nasion jest jednym z najważniejszych wstępnych zabiegów przedsięwzięcia uszlachetniania nasion. Prawidłowo wyznaczone parametry stosowania zabiegów związanych z odkażaniem dają potencjalną osłonę nasionom przed patogenami, eliminując mikoflorę kontaminującą i hamując procesy kolonizacji oraz sporulacji grzybów. Doświadczenia z odkażaniem przy pomocy ozonowania, hydrotermoterapii, traktowania falami radiowymi i preparatem Huwa San wykazały wysoką skuteczność w ograniczeniu zasiedlenia nasion przez mikrofiorę patogeniczną, która potencjalnie mogłaby przemieścić się na, powodując ich słabszy wzrost lub nawet zamieranie [1, 2, 15, 20].

Użyteczną metodą poprawy jakości nasion jest również zaprawianie biologiczne stosowane celem poprawy zdrowotności i wartości siewnej. Wykorzystuje się tu możliwości synergistycznego oddziaływania aplikowanych środków biologicznych o zróżnicowanych mechanizmach, aplikowanych przedsięwzięciem bądź jako biokondycjonery podczas biokondycjonowania nasion [8, 9]. Najważniejszym kryterium przy opracowaniu biologicznej osłony nasion jest wysoka skuteczność zastosowanych środków i metod w ochronie nasion przed kompleksem patogenów zasiedlających poszczególne gatunki roślin, jak również zapewnienie nasionom już na starcie niezbędnych mikro- i makroelementów podczas ich kiełkowania i wschodów roślin. Z przeprowadzonych analiz i badań wynika, że najkorzystniejszym zabiegiem, kompleksowo oddziałującym na materiał

siewny, jest uszlachetnianie za pomocą biokondycjonowania [9, 20, 15]. Zabieg łączy kondycjonowanie nasion, przyspieszające wschody i ich równomierność z ochroną przed chorobami i szkodnikami dzięki wprowadzaniu do okrywy nasiennej biokondycjonerów o właściwościach fungistatycznych i stymulujących odporność roślin [5, 11, 20, 22].

W poprawie wartości siewnej skuteczne jest zastosowanie szoku termicznego na etapie imbibicji nasion, którego celem jest indukcja odporności roślin na stres termiczny w juwenilnej fazie wzrostu (kiełkowanie, wschody, tworzenie pierwszych liści właściwych). Stres termiczny, stałe lub naprzemienne wysokie i niskie temperatury stosowane na etapie imbibicji, w różnych stadiach wzrostu zarodka i korzonków zarodkowych wymienionych gatunków roślin warzywnych korzystnie wpływa na kiełkowanie nasion i wzrost roślin w niekorzystnych warunkach. Zabieg ten jest bardziej efektywny, ekonomiczny i łatwiejszy do wykonania niż stosowane dotychczas hartowanie roślin przesadzanych ze szklarni do gruntu [23, 24].

Pomimo wysokiej skuteczności ochronnej i plonotwórczej zakres stosowania biologicznych metod uszlachetniania nasion jest stosunkowo niewielki. Wynika to z ograniczonej wiedzy praktyków zajmujących się produkcją nasienną (mimo licznych prac badawczych i popularyzatorskich prowadzonych w instytucjach badawczych, które prowadzą w szerokim zakresie badania dotyczące ekologicznej produkcji nasiennej i testują przydatne środki biologiczne, jak i biotechniczne) [22].

Celem prezentowanych studiów było wykazanie skuteczności niechemicznych metod uszlachetniania i osłony materiału siewnego roślin nasiennych przed patogenami oraz ich korzystnego wpływu na zwiększenie potencjału prozdrowotnego i plonotwórczego warzyw – w aspekcie produkcji ekologicznej przyjaznej środowisku i poprawie jakości żywności.

2. Metodyka badań

2.1. Metody traktowania nasion

Badania realizowano w ramach programu celowego finansowanego przez MRiRW w Instytucie Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach. Materiałem badań były komercyjne, ekologiczne nasiona marchwi, poddane przedsięwzięciu uszlachetnianiu, uzyskane z nich rośliny – uprawiane na nasiona oraz reprodukowane w doświadczeniach nasiona. Badania prowadzono w warunkach laboratoryjnych, szklarniowych i polowych. Doświadczenia polowe zlokalizowano na Certyfikowanym Ekologicznym Polu Doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach. Do badań wybrano odmianę ustaloną celem zapewnienia powtarzalności cech genetycznych w drugim pokoleniu. Komercyjne ekologiczne nasiona marchwi odmiany Dolanka uszlachetniano wstępnie, stosując zróżnicowane pod kątem spektrum oddziaływania metody: fizjologiczne (kondycjonowanie nasion), biologiczne (odkaszanie i zaprawianie), fizyczne (traktowanie nasion falami radiowymi, ozonem i gorącą wodą – hydrotermoterapia) oraz łączne stosowanie metody biologicznej i fizjologicznej – biokondycjonowanie. Szczegółowe parametry uszlachetniania nasion zestawiono w tabeli 1 i 2.

Tabela 1. Metodyka uszlachetniania nasion marchwi

Metoda uszlachetniania nasion	Parametry kondycjonowania		
	Wilgotność nasion (%)	Czas traktowania (min)	Okres inkubacji
Kontrola	10	0	0
Odkazanie w preparacie Huwa San (2%)	10	5	24 h/20°C
Traktowanie nasion ozonem (wydajność ozonu: 40 g/h)	10	30	24 h/20°C
Traktowanie pulsującymi falami radiowymi	20	30, 60	18 h
Hydrotermoterapia (40°C, 45°C, 50°C)	10	20, 30	16 h
Stres termiczny (5°C i 45°C)	10	240	16 h
Biokondycjonowanie (środki proekologiczne) Agawit 25%, EM + wrotycz (5%), Chlorella 20%, 40%, Ocet winny 10%, Kurkuma 1%, Pieprz Cayenne 1% Biówęgiel (50%) Huminpol (50%)	40	20	24, 48 h/ 20°C

Tabela 2. Uszlachetnianie nasion marchwi przy pomocy pulsujących fal radiowych

Wilgotność nasion/dni inkubacji	Parametry traktowania pulsującymi falami radiowymi				
	Parametry traktowania	Napięcie prądu (V)	Częstotliwość impulsów (Hz)	Okres trwania impulsu (MS)	Czas traktowania (min)
20% / 16 h	F1	10	4	20	60
	F2	50	4	20	60
	F3	25	4	20	30

2.2. Metody oceny kiełkowania uszlachetnionych nasion

Uszlachetnione i kontrolne (nietraktowane) nasiona marchwi Dolanka poddano analizom laboratoryjnym, zgodnie z wymogami ISTA (*International Seed Testing Association*) oraz Polskiej Normy Nasiennej i odnośnych rozporządzeń Ustawy o Nasiennictwie, z uwzględnieniem wskazań dotyczących podłoża, temperatury oraz oceny energii kiełkowania (EK) i zdolności kiełkowania (ZK), masy tysiąca nasion (MTN) i wilgotności. Stosując się do odnośnych przepisów EK i ZK były liczone: dla marchwi po 7 i 14 dniach inkubacji nasion wysianych na uwilgotnionej bibule filtracyjnej. Analizy były prowadzone w termostatach. Wilgotność nasion wymienionych gatunków wykonano metodą suszarkową, zalecaną i stosowaną standardowo w ocenie laboratoryjnej nasion.

2.3. Analizy mikrobiologiczne nasion, ocena zdrowotności, diagnostyka i określenie składu jakościowego i ilościowego patogenicznej mikroflory zasiedlającej nasiona

Celem analizy zdrowotności było określenie składu jakościowego (diagnostyka do rodzaju i gatunku patogena) i ilościowego zasiedlenia nasion przez mikroorganizmy patogeniczne oraz wskazanie celowanej osłony biologicznej przed najgroźniejszymi patogenami przenoszonymi z nasionami na rośliny potomne. Analizy zdrowotności prowadzone były metodą sztucznych kultur (z zastosowaniem selektywnych podłoży pokarmowych, głównie standardowej pożywki dekstrozowo-ziemniaczanej PDA) oraz porównawczo metodą testu bibułowego (TB). Nasiona badanych gatunków roślin z określonych kombinacji były wysiewane w szalkach Petriego na pożywki i bibułę filtracyjną (test TB), inkubowane przez okres od 7 do 10 dób i w zależności od wymagań poszczególnych gatunków roślin – naprzemiennie doświetlane światłem NUV w cyklu 24-godzinnym. Diagnostyka patogenów zasiedlających nasiona prowadzona była z zastosowaniem mikroskopii świetlnej (wysokiej klasy mikroskop Leica) oraz kluczy diagnostycznych [16, 25, 26].

2.4. Ocena kiełkowania nasion i wzrostu roślin w testach Phytotoxkit

Phytotoxkit jest precyzyjnym, szybkim testem kiełkowania nasion i wczesnego wzrostu roślin oraz określenia fitotoksyczności środków użytych do traktowania nasion, z bezpośrednim pomiarem długości korzeni zarodkowych i pędów roślin metodą analizy obrazu. Uszlachetnione i kontrolne (nietraktowane nasiona wymienionych gatunków roślin warzywnych wysiewano na płytках Phytotoxkit (od 5 do 10 sztuk na płytce, w zależności od gatunku rośliny i wielkości nasion), a następnie inkubowano w kabinach klimatycznych w temperaturze 20°C przez okres od 10 do 21 dób. Oceniono dynamikę wzrostu korzeni zarodkowych i pędów powstałych z traktowanych nasion oraz fitotoksyczność testowanych odkaźników i biokondycjonerów.

2.5. Doświadczenia w warunkach polowych

Doświadczenia polowe zlokalizowano na polu doświadczalnym IO-PIB w Skierniewicach. Założono je w układzie bloków losowanych, w trzech powtórzeniach w rozstawie roślin 30 cm × 45 cm. Powierzchnia poletka wynosiła 32,4 m², powierzchnia całego doświadczenia 6 arów. Nasiona marchwi ‘Dolanka’ wysiewano wprost do gruntu w terminach agrotechnicznych wymaganych dla poszczególnych gatunków warzyw uprawianych na nasiona. Nasiona marchwi wysiewano 28 kwietnia. W planowaniu schematu doświadczeń polowych kierowano się zasadami dobrej praktyki rolniczej, uwzględniając allelopatyczne oddziaływanie poszczególnych gatunków roślin (dobre sąsiedztwo).

Prowadzone były następujące, cykliczne obserwacje i pomiary:

- dynamika wschodów roślin [20];
- pomiary biometryczne roślin [27];
- indeks zawartości chlorofilu w liściach aparatem SPAD-502 (Japan) [28];
- pomiary wymiany gazowej roślin (fotosynteza netto, transpiracja, przewodność szparkowa, zawartość międzykomórkowego CO₂) przy pomocy aparatu TPS-2 Portable Photosynthesis System (Amesbury, USA) [29];
- monitoring pojawów chorób [16, 25, 26].

Zbiory korzeni (wysadków) marchwi wykonano w drugiej dekadzie października i oceniono ich plon oraz ciężar jednego wysadka.

3. Omówione wyników badań

Wyniki badań laboratoryjnych prowadzonych w zakresie uszlachetniania nasion marchwi wskazują na wysoką skuteczność ochronną przedsięwziętych metod odkażania nasion i poprawę ich wartości siewnej. Potwierdzono spektakularne efekty ograniczania porażenia nasion po zastosowaniu ozonowania oraz po traktowaniu nasion pulsującymi falami radiowymi, podobnie jak to stwierdzono w przypadku sałaty, buraka ćwikłowego i kopru [16]. O ile ozonowanie nasion jest zabiegiem stosunkowo prostym do zastosowania w praktyce, o tyle traktowanie nasion pulsującymi falami radiowymi jest nieco bardziej skomplikowane i trudniejsze, wymagające specjalistycznej wiedzy [14, 16, 30]. Przedsięwzięte traktowanie nasion gorącą wodą (hydrotermoterapia) oraz odkażanie 2% preparatem Huwa San okazało się także bardzo skuteczne w uwalnianiu nasion z grzybów chorobotwórczych, kontaminujących okrywą nasienną i ze względu na łatwość wykonania oraz skuteczność zabiegi te są polecane ekologicznym producentom warzyw [12, 22, 30, 31] – tabela 3, 4, 5. W rezultacie odnotowano istotny wzrost jakości nasion (energii, dynamiki i zdolności kiełkowania), zdrowotności nasion i kiełków oraz szybsze wschody (rys. 1).

Tabela 3. Wpływ biokondycjonowania nasion marchwi na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

Patogen	Biokondycjonowanie nasion marchwi					
	Kontrola	Spirulina	Chlorella	Kurkuma	Agawit	Polyversum
<i>Alternaria tenuis</i>	79,5	50,5	52,0	10,5	61,5	18,5
<i>Alternaria dauci</i>	5,2	3,0	2,5	0,0	4,0	1,3
<i>Alternaria radicina</i>	15,0	9,5	8,0	2,1	10,8	2,5
<i>Stemphylium spp.</i>	6,0	3,5	3,5	0,0	4,5	1,0
<i>Fusarium spp.</i>	3,5	1,5	1,8	0,0	2,9	0,5
<i>Drechslera sp.</i>	4,8	2,0	2,3	0,0	4,0	0,8
<i>Phoma sp.</i>	3,0	1,8	2,0	0,5	2,6	0,0
<i>Epicoccum purpurascens</i>	5,7	3,5	3,0	1,1	4,5	1,0
<i>Erysiphe heraclei</i>	2,8	1,6	1,3	0,0	2,0	0,5
<i>Cladosporium herbarum</i>	5,0	2,5	2,5	0,0	3,9	0,0
<i>Penicillium sp.</i>	4,8	3,0	2,6	0,0	3,5	1,5
<i>Rhizopus nigricans</i>	6,0	2,5	3,0	0,0	4,0	0,9
<i>Aspergillus spp.</i>	5,2	3,3	2,8	0,5	4,2	0,8
Porażenie nasion (%)	93,5	48,5	49,9	11,8	64,0	20,5

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych.

Tabela 4. Wpływ ozonowania nasion marchwi na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

Patogen	Ozonowanie nasion marchwi			
	Kontrola	10 min	20 min	30 min
<i>Alternaria tenuis</i>	79,5	20,0	9,2	4,5
<i>Alternaria dauci</i>	5,2	2,0	0,0	0,0
<i>Alternaria radicina</i>	15,0	6,2	2,8	0,6
<i>Stemphylium spp.</i>	6,0	2,5	0,9	0,0
<i>Fusarium spp.</i>	3,5	1,7	0,5	0,0

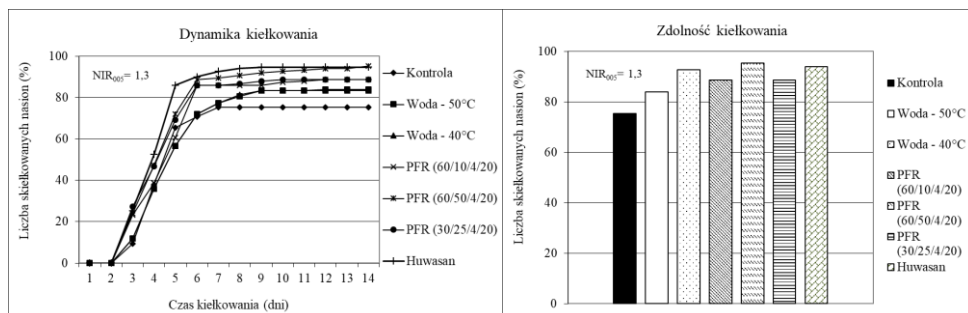
<i>Drechslera</i> sp.	4,8	0,6	0,0	0,0
<i>Phoma</i> sp.	3,0	2,0	0,8	0,0
<i>Epicoccum purpurascens</i>	5,7	3,0	1,1	0,5
<i>Erysiphe heraclei</i>	2,8	1,0	0,0	0,0
<i>Cladosporium herbarum</i>	5,0	1,8	0,6	0,0
<i>Penicillium</i> sp.	4,8	2,0	0,9	0,3
<i>Rhizopus nigricans</i>	6,0	2,6	1,0	0,0
<i>Aspergillus</i> spp.	5,2	2,0	0,5	0,0
Porażenie nasion (%)	93,5	28,0	9,6	4,2

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych.

Tabela 5. Wpływ traktowania nasion marchwi falami radiowymi (PRF) na zasiedlenie mikoflorą (% w stosunku do ogółu izolatów)

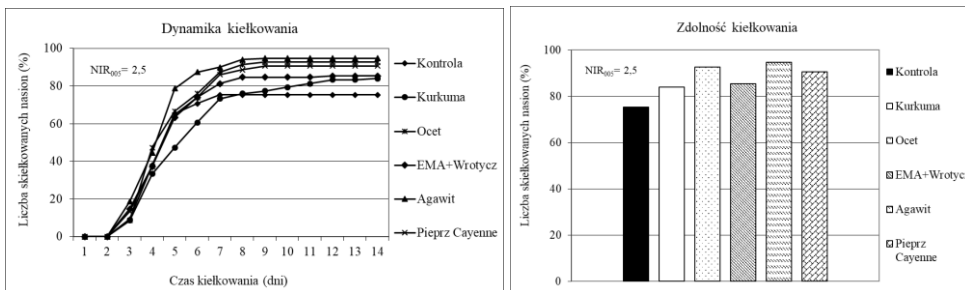
Patogen	Fale radiowe – traktowanie nasion marchwi		
	Kontrola	F1/10/4/20/60	F2/50/4/20/60
<i>Alternaria tenuis</i>	79,5	8,5	4,8
<i>Alternaria dauci</i>	5,2	2,0	0,0
<i>Alternaria radicina</i>	15,0	6,5	0,8
<i>Stemphylium</i> spp.	6,0	2,9	0,6
<i>Fusarium</i> spp.	3,5	1,5	0,0
<i>Drechslera</i> sp.	4,8	1,0	0,5
<i>Phoma</i> sp.	3,0	1,3	0,5
<i>Epicoccum purpurascens</i>	5,7	3,0	1,0
<i>Erysiphe heraclei</i>	2,8	0,5	0,0
<i>Cladosporium herbarum</i>	5,0	2,0	0,0
<i>Penicillium</i> sp.	4,8	1,9	0,5
<i>Rhizopus nigricans</i>	6,0	2,5	0,8
<i>Aspergillus</i> spp.	5,2	3,0	1,1
Porażenie nasion (%)	93,5	10,0	5,8

Źródło: opracowanie na podstawie badań własnych.

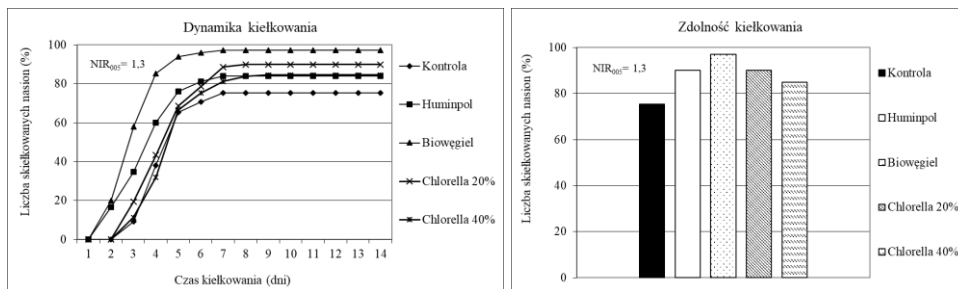


Rysunek 1. Wpływ przedsięwziętego traktowania nasion marchwi gorącą wodą (50°C i 40°C), pulsującymi falami radiowymi (PFR /min/V/Hz/Ms) oraz preparatem Huwa San na dynamikę i zdolność kiełkowania [opracowanie na podstawie badań własnych]

Zastosowanie przedsiewnego biokondycjonowania nasion z użyciem wielokierunkowo oddziałujących biokondycjonerów: Agawitu 25%, EM + wrotycz (5%), *Chlorelli* w stężeniu 20%, 10% octu winnego, 1% kurkumy, pieprzu Cayenne w stężeniu 1%, biowęglu (50%) lub Huminolu (50%) istotnie zwiększyło dynamikę i zdolność kiełkowania oraz wschody i początkowy wzrost roślin zarówno w doświadczeniach szklarniowych, jak i polowych. Wśród stosowanych biokondycjonerów szczególnie pozytywnie wyróżniały się w warunkach laboratoryjnych, szklarniowych i polowych ocet, Agawit, pieprz Cayenne, biowęgiel i Huminol, podobnie jak w przypadku innych gatunków roślin, w tym fasoli, ogórka, cebuli, brokułu, pietruszki i pomidora [13, 14, 22] – rysunek 2 i 3.

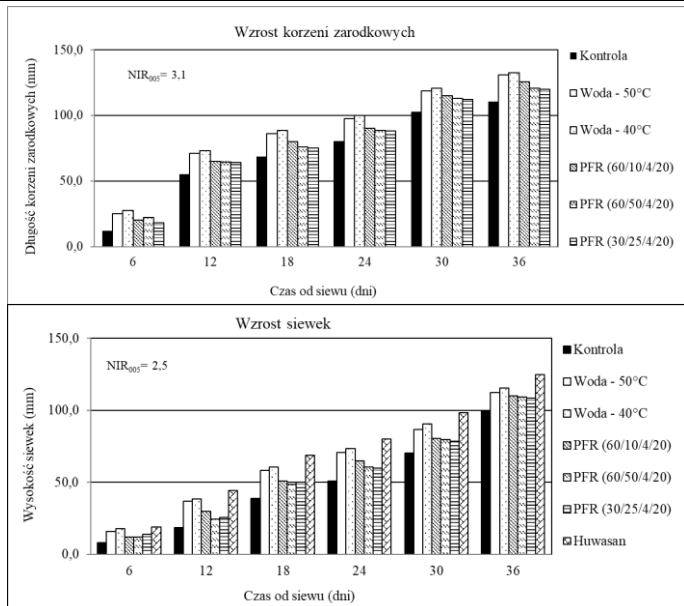


Rysunek 2. Wpływ przedsiewnego traktowania nasion marchwi biokondycjonerami na dynamikę i zdolność kiełkowania [opracowanie na podstawie badań własnych]

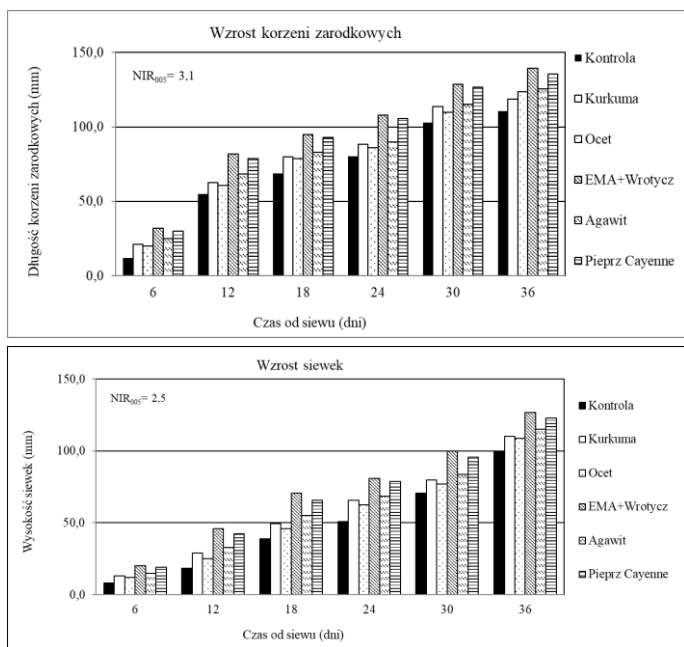


Rysunek 3. Wpływ przedsiewnego biokondycjonowania nasion marchwi przy pomocy preparatu Huminol oraz biowęglu i glonu *Chlorella* na dynamikę i zdolność kiełkowania [opracowanie na podstawie badań własnych]

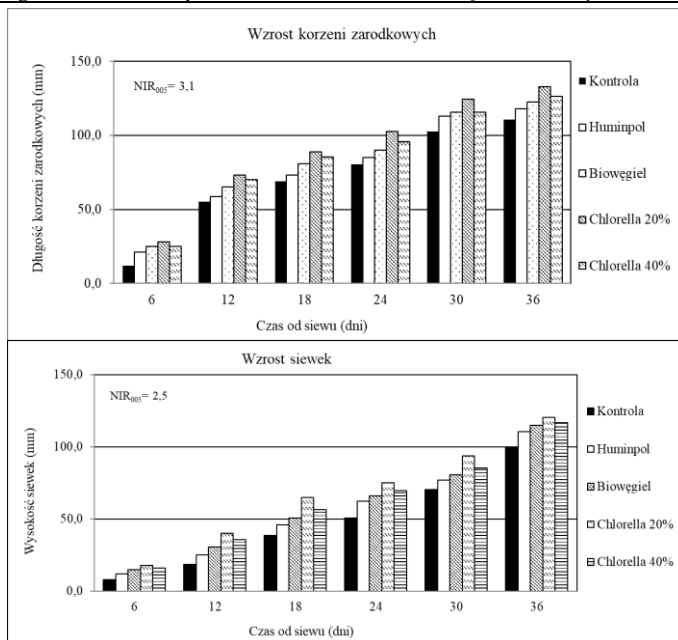
Wyniki badań potwierdzono w laboratoryjnych testach Phytotoxkit, gdzie odnotowano istotnie większe różnice we wzroście siewek i korzeni zarodkowych oraz prawidłowe ich wykształcenie (brak siewek anormalnych i uszkodzonych) w porównaniu z innymi kombinacjami (rys. 4, 5, 6). Przeprowadzane w warunkach laboratoryjnych i szklarniowych testy Phytotoxkit i budowane na ich bazie mikrokosmosy symulują warunki polowe, umożliwiają analizę wzrostu korzeni oraz łodyg i z tego względu na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować o wzroście testowanych roślin w polu [6, 27-29].



Rysunek 4. Wpływ przedsięwziętego traktowania nasion marchwi gorącą wodą (50 i 40°C), pulsującymi falami radiowymi (PFR/min/V/Hz/Ms) oraz preparatem Huwa San na dynamikę wzrostu korzeni zarodkowych i siewek w testach Phytotoxkit [opracowanie na podstawie badań własnych]



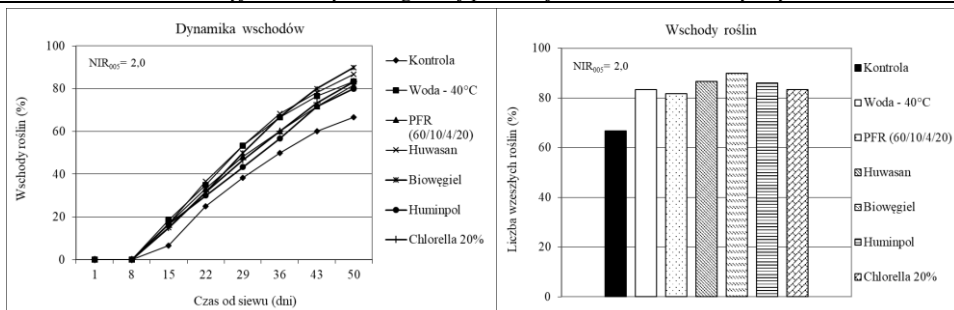
Rysunek 5. Wpływ przedsięwziętego traktowania nasion marchwi biokondycjonerami w wybranych biokondycjonerach na wzrost korzeni zarodkowych i siewek w testach Phytotoxkit [opracowanie na podstawie badań własnych]



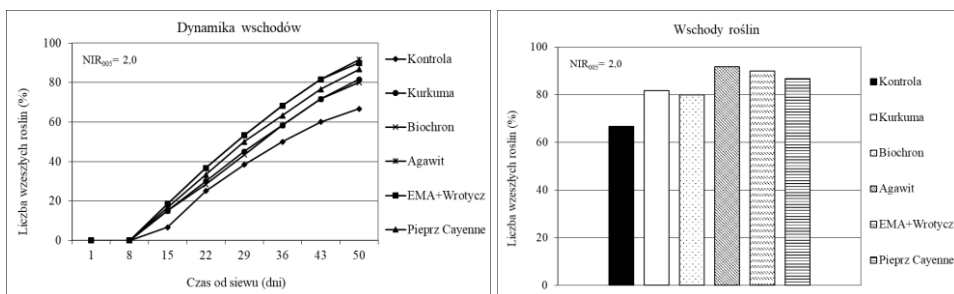
Rysunek 6. Wpływ przedsiewnego biokondycjonowania nasion marchwi przy pomocy preparatu Huminpol oraz biowęgla i glonu *Chlorella* na dynamikę wzrostu korzeni zarodkowych i siewek w testach Phytotoksit [opracowanie na podstawie badań własnych]

Skuteczność ochronną zabiegów uszlachetniania nasion marchwi potwierdzono w doświadczeniach szklarniowych i w warunkach polowych. Efekty zabiegów uszlachetniania były widoczne nie tylko we wczesnych fazach wzrostu i rozwoju roślin, lecz utrzymywały się przez cały sezon wegetacyjny. Skutkowało to istotną poprawą zdrowotności siewek i roślin w porównaniu do obiektów kontrolnych (nietraktowanych) oraz eliminacją patogenów odpowiedzialnych za zgorzele siewek, a także wielu grzybów patogennych przenoszonych z nasionami na rośliny.

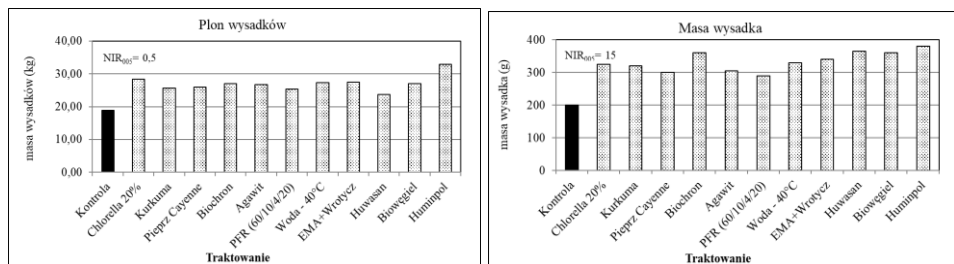
Ocena skuteczności stosowanych metod uszlachetniania oraz środków biologicznych, aplikowanych w uprawach nasiennych badanych gatunków roślin warzywnych, prowadzona w warunkach polowych do chwili uzyskania reprodukcji nasion wskazuje na ich wielokierunkowe, kompleksowe oddziaływanie. Większość z nich wykazywała działania ochronne, dzięki czemu ograniczono do minimum presję patogenów w uprawach testowanych gatunków roślin, a traktowane rośliny wykazywały się wysoką zdrowotnością, wyrównanym wzrostem i stabilnym plonowaniem. Efekty plonotwórcze zwiększono po aplikacji biowęgla i Huminpolu, uzyskując istotnie lepsze parametry metabolizmu roślin (wymiany gazowej, indeksu zawartości chlorofilu w liściach) w porównaniu z kontrolą [13, 14]. Wymienione środki i metody uszlachetniania wydajnie zwiększyły także plon i parametry jakości reprodukowanego materiału siewnego marchwi (wysadków), jak również aktywność kluczowych procesów metabolicznych determinujących wzrost i rozwój (fotosynteza netto, transpiracja, przewodność szparkowa, zawartość międzykomórkowego CO₂, indeks zawartości chlorofilu), co również stwierdzono we wcześniejszych badaniach autorów stosujących inne metody i środki biologiczne [3, 18, 15, 20] – rysunek 7, 8, 9, 10.



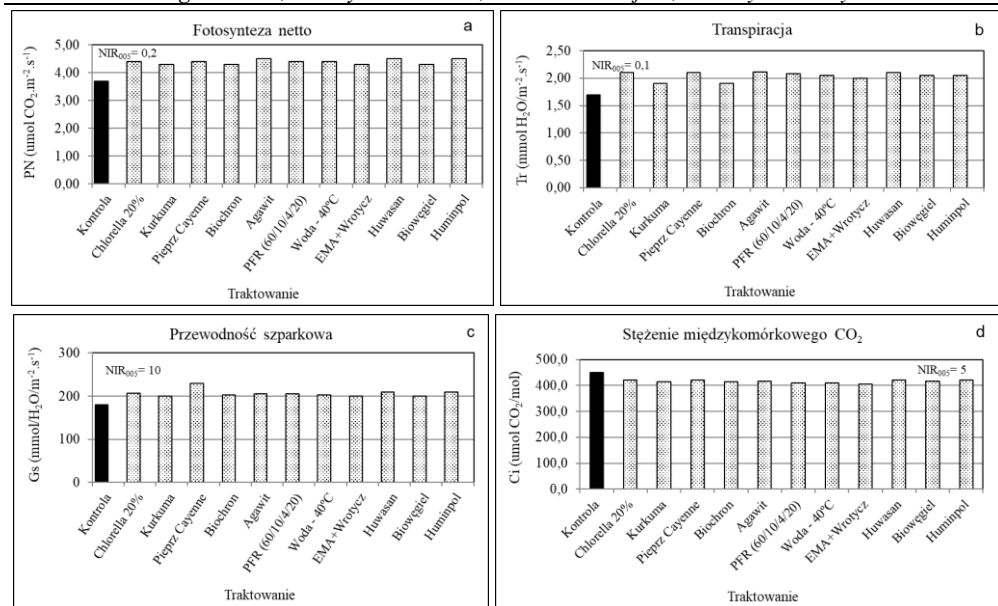
Rysunek 7. Wpływ przedsewnego traktowania nasion marchwi gorącą wodą (40°C), pulsującymi falami radiowymi oraz preparatami Hywa San, biowęgłem i Huminpołem na dynamikę i liczbę wczeszych roślin w warunkach polowych [opracowanie na podstawie badań własnych]



Rysunek 8. Wpływ traktowania nasion marchwi środkami biologicznymi na dynamikę i liczbę wczeszych roślin w warunkach polowych [opracowanie na podstawie badań własnych]



Rysunek 9. Wpływ przedsewnego uszlachetniania nasion marchwi na plon wysadków i masę jednego wysadka uzyskanego w warunkach polowych [opracowanie na podstawie badań własnych]



Rysunek 10. Wpływ przedsiewnego uszlachtniania nasion marchwi na: fotosyntezę netto (a), transpirację (b), przewodność szparkową (c) i zawartość międzykomórkowego CO₂ (d) w liściach roślin marchwi uprawianej w warunkach polowych [opracowanie na podstawie badań własnych]

4. Podsumowanie

Ze względu na największe zagrożenie degradacji materiału siewnego (spadku jakości nasion) przez zasiedlające je patogeny, które w pierwszej fazie kontaminują okrywą nasienną, a następnie wnikają do wnętrza nasion, uszkadzając zarodek, poszukuje się skutecznych, niechemicznych metod przydatnych w produkcji zdrowego, wysokiej jakości materiału siewnego. Jedną z najbardziej efektywnych metod i nieskomplikowanych w praktycznym zastosowaniu jest stosowanie odkaźników, których zadaniem jest uwalnianie nasion z mikrofłory bytującej na okrywie nasiennej, a tym samym przeciwdziałanie infekcji wgłębnej. Przedstawione wyniki badań wykazały spektakularne efekty ograniczenia porażenia nasion po zastosowaniu ozonowania, traktowania nasion pulsującymi falami radiowymi i gorącą wodą (hydrotermoterapia), odkażaniu w 2% preparacie Huwa San oraz aplikacji biokondycjonerów: Agawit (25%), EM +wrotycz (5%), *Chlorella* (20%), octu winnego (10%), kurkumy (1%), pieprzu Cayenne (1%), biowęgla (50%) i Huminopolu (50%). Traktowanie nasion tymi metodami istotnie zwiększyło ich kiełkowanie, wigor oraz wschody i ich wyrównanie, a także początkowy wzrost roślin i wymianę gazową zarówno w doświadczeniach szklarniowych, jak i polowych. Wykazane efektywne zabiegi przedsiewnego odkażania mogą wyeliminować konieczność zaprawiania nasion, co usprawni ekologiczną produkcję roślin i nasion. Prezentowane wyniki badań wychodzą naprzeciw oczekiwaniom sektora nasiennego, co stworzy warunki rozwoju gospodarstw zajmujących się nasienną produkcją roślin warzywnych, prowadząc do zwiększenia ekologicznej produkcji nasiennej warzyw oraz konkurencyjności sektora nasiennego na rynku amatorskim i profesjonalnym – krajowym i międzynarodowym.

Finansowanie badań

Badania realizowano w ramach dotacji celowej MriRW – Zadanie 7.3.

Literatura

1. Baraniecki P., Bojarczuk J., Buchwald W., Burczyk H., Czerwińska E., Erlichowska B., Grzesik M., Heller K., Janas R., Księżak J., Kucharski W.A., Łowiński Ł., Mordalski R., Nawrocki P., Piskier T., Romanowska-Duda Z., Sekutowski T.R., Staniak M., Szaroleta M., Szparaga A., Talarczyk W., Wielgus K., Zalińska H., Zbytek Z., *Wybrane zagadnienia ekologiczne we współczesnym rolnictwie. Monografia*, t. 9, red. Zbytek Z., Przemysłowy Instytut Maszyn Rolniczych, Poznań 2016, s. 1-93, ISBN 978-83-940788-5-0.
2. Adamczyk F., Bilińska E., Bojarszczuk J., Buchwald W., Czerwińska E., Danelski W., Deszcz E., Domańska J., Dymkowska-Malesa M., Erlichowska B., Feledyn-Szewczyk B., Fijoł-Adach E.B., Gawel E., Grzelak M., Grzesik M., Jabłoński M., Janas R., Juliszewski T., Kazimierzczak R., Kielbasa P., Księżak J., Kucharski W.A., Leszczyńska D., Łowiński Ł., Mordalski R., Piłat A., Piskier T., Romanowska-Duda Z., Stalenga J., Staniak M., Szaroleta M., Szczepaniak J., Szparaga A., Tadeusiewicz R., Talarczyk W., Tylek P., Walczyk J., Zbytek Z., *Wybrane zagadnienia ekologiczne we współczesnym rolnictwie. Monografia*, t. 10, red. Zbytek Z., Przemysłowy Instytut Maszyn Rolniczych, Poznań 2017, s. 1-134.
3. Janas R., Grzesik M., Górnik K., *Badania nad możliwością przechowywania biokondycjonowanych nasion marchwi oraz ocena efektu ochrony i wartości siewnej*, [w:] Łuczycza D. (red.), *Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania*, Idea Knowledge Future, Wrocław 2018, s. 123-132, ISBN 978-83-945311-9-5.
4. Grzesik M., Janas R., Górnik K., Romanowska-Duda Z., *Biologiczne metody produkcji nasion w aspekcie zmian klimatycznych*, *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 57(3), 2012, s. 147-152.
5. Janas R., Grzesik M., *Skuteczność wybranych preparatów biologicznych w uprawach ekologicznych roślin prozdrowotnych na nasiona*, *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 56(3), 2011, s. 152-157, ISSN 1642-686X.
6. Romanowska-Duda Z., Szufa S., Grzesik M., Piotrowski K., Janas R., *The promotive effect of Cyanobacteria and Chlorella sp. foliar biofertilization on growth and metabolic activities of willow (Salix viminalis L.) plants as feedstock production, solid biofuel and biochar as C carrier for fertilizers via torrefaction process*, *Energies*, 14(17), 2021, s. 52-62.
7. Grzesik M., Janas R., *Wpływ przedsewnego kondycjonowania na kiełkowanie nasion i wschody roślin kopru ogrodowego (Anethum graveolens L.)*, *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 58(3), 2013, s.188-192.
8. Janas R., *Wykorzystanie pożytecznych mikroorganizmów i środków ekologicznych do biologicznego zaprawiania nasion oraz zwalczania fitopatogenów w uprawach nasiennych wybranych gatunków roślin warzywnych*, [w:] *Wyniki badań w zakresie rolnictwa ekologicznego, realizowanych w 2016 roku*, MRiRW, 2016, s. 350-363.
9. Janas R., Grzesik M., *Ocena fizjologicznych, biologicznych i fizycznych metod uszlachetniania nasion sałaty przeznaczonych do wysiewu na plantacjach ekologicznych*, [w:] Łuczycza D. (red.), *Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania*, Wrocław 2018, s. 133-143.
10. Grzesik M., Janas R., Górnik K., *Poprawa kiełkowania nasion oraz wschodów i wzrostu siewek kolendry siewnej (Coriandrum sativum l.) metodą kondycjonowania*, *Episteme*, 20(1), 2013, s. 333-340.
11. Janas R., Grzesik M., *Niechemiczne metody poprawy jakości i zdrowotności nasion roślin warzywnych*, XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane 30.01-3.02.2017, s. 73-76.
12. Janas R., Grzesik M., Górska R., *Ekologiczne metody zwiększenia potencjału plonotwórczego i poprawy jakości nasion roślin bobowatych*, program wieloletni „Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego” –

- aktualności 2019, Konf. Upowszechniowo-Wdrożeniowa Nauka w Praktyce, Skierniewice 2019, s. 90.
13. Grzesik M., Janas R., Wojska A., Traczyk K., Grotkowski G., *Huminpol, the natural fermentation extract from mud deposits stimulates seed germination and development of vegetable plants*, ICA 2023, 14th International Conference on Agrophysics, 11-13.09.2023, Lublin, Poland, 2023, s. 180.
 14. Janas R., Grzesik M., Wojska A., Traczyk K., *Innovative methods of refining vegetable seeds and their impact on germination and emergence, growth and physiological activity of plants in organic farming*. ICA 2023 14th International Conference on Agrophysics, 11-13.09.2023, Lublin, Poland, 2023, s. 181.
 15. Janas R., Grzesik M., Górnik K., *Badania nad możliwością przechowywania biokondycjonowanych nasion marchwi oraz ocena efektu ochronnego i wartości siewnej*, [w:] Łuczycka D. (red.), *Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania*, Wrocław 2018, s. 123-133.
 16. Janas R., Górnik K., Grzesik M., Romanowska-Duda Z., Duijn B., *Effectiveness of pulsed radio frequency in seed quality improvement of vegetable plant species*, *International Agrophysics*, 33, 2019, s. 463-471, doi: 10.31545/intagr/108953.
 17. Janas R., Grzesik M., *Zastosowanie fal elektromagnetycznych w uszlachetnianiu nasion wybranych gatunków roślin warzywnych*, *Biuletyn IHAR*, 285, 2019, s. 203-205.
 18. Grzesik M., Janas R., *Wpływ hydrokondycjonowania na aktywność metaboliczną oraz kiełkowanie nasion i wschody siewek marchwi*, *Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering*, 56(3), 2011, s. 127-132, ISSN 1642-686X.
 19. Grzesik M., Janas R., *Physiological method for improving seed germination and seedling emergence of root parsley in organic systems*, *Journal of Research and Applications, Agricultural Engineering*, 59(3), 2014, s. 80-86.
 20. Grzesik M., Górnik K., Janas R., Lewandowki M., Romanowska-Duda Z., Duijn B., *High efficiency stratification of apple cultivar Ligol seed dormancy by phytohormones, heat shock and pulsed radio frequency*, *Journal of Plant Physiology*, 219, 2017, s. 81-90, doi: 10.1016/j.jplph.2017.09.007.
 21. Janas R., Grzesik M., *Ocena fizjologicznych, biologicznych i fizycznych metod uszlachetniania nasion salaty przeznaczonych do wysiewu na plantacjach ekologicznych*, [w:] *Rolnictwo XXI wieku – problemy i wyzwania*, Wrocław 2018, s. 133-143.
 22. Janas R., *Opracowanie ekologicznych metod produkcji nasiennych roślin jednorocznych (fasola, ogórek, brokuł) i dwuletnich (marchew, cebula) o zwiększonym potencjale plonotwórczym oraz przyjaznej środowisku kompleksowej technologii produkcji nasion o wysokiej jakości i zdrowotności*, program wieloletni MriRW, Zadanie Celowe 7.3, 2021.
 23. Górnik K., Lahuta LB., *Application of phytohormones during seed hydropriming and heat shock treatment on sunflower (*Helianthus annuus* L.) chilling resistance and changes in soluble*, *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 2017, s. 1-12, doi: 10.1007/s11738-017-2413-x.
 24. Górnik K., Badowiec A., Weidner S., *The effect of seed conditioning, short-term heat shock and salicylic, jasmonic acid or brassinolide on sunflower (*Helianthus annuus* L.) chilling resistance and polysome formation*, *Acta Physiologiae Plantarum*, 36, 2014, s. 2547-2554, doi: 10.1007/s11738-014-1626-5.
 25. Murali M.S., Madhusudhana R., Mathur K., Chakravarthi D.V.N., Rathore S., Nagaraja Reddy R., Satish S., Srinivas G., Sarada Mani N., Seetharama N., *Identification of quantitative trait loci associated with resistance to foliar diseases in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) Moench.*, *Euphytica*, 176, 2010, s. 199-211, doi: 10.1007/s10681-010-0224-x.
 26. Norvell L.L., *Fungal nomenclature. Melbourne approves a new code*, *Mycotaxon*, 116, 2011, s. 481-490, doi: 10.5248/116.481.

27. Steglińska A., Pielech-Przybylska K., Janas R., Grzesik M., Borowski S., Kręgiel D., Gutarowska B., *Volatile organic compounds and physiological parameters as markers of potato (*Solanum tuberosum* L.) infection with phytopathogens*, *Molecules*, 27, 2022, 3708.
28. Grzesik M., Janas R., Steglińska A., Kręgiel D., Gutarowska B., *Influence of microclimatic conditions during year-long storage of 'Impresja' potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) on the emergence, growth, physiological activity and yield of plants*, *Journal of Stored Products Research*, 99, 2022, 102033, doi: 10.1016/j.jspr.2022.102033.
29. Steglińska A., Sulyok M., Janas R., Grzesik M., Liszkowska W., Kręgiel D., Gutarowska B., *Metabolite formation by fungal pathogens of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) in the presence of bioprotective agents*, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20, 2023, 5221, doi: 10.3390/ijerph20065221.
30. Golijan-Pantović J., Sečanski M., Gordanić S., *Seed health treatments in organic seed production*, *Agriculture and Forestry*, 68(4), 2022, s. 41-57, doi: 10.17707/AgricultForest.68.4.04.
31. Kubala S., Wojtyła Ł., Garnczarska M., *Kondycjonowanie jako strategia uszlachetniania nasion*, *Postępy Biologii Komórki*, 40(2), 2013, s. 215-230.

Innowacyjne metody ekologicznej produkcji nasion roślin warzywnych

Streszczenie

Jednym z najważniejszych problemów w ekologicznej produkcji warzyw jest duże porażenie nasion mikroflorą patogeniczną, która powoduje niskie kiełkowanie i przenosząc się z okryw nasiennych na rośliny wpływa niekorzystnie na ich zdrowotność oraz wzrost, rozwój i plonowanie. Celem prezentowanych badań było wykazanie skuteczności niechemicznych metod przedsiewnego uszlachetniania nasion i ich korzystnego wpływu na zwiększenie potencjału prozdrowotnego i plonotwórczego warzyw w aspekcie produkcji ekologicznej. Nasiona marchwi traktowano przedsiewnie różnymi niechemicznymi metodami i następnie oceniano ich kiełkowanie oraz wzrost i rozwój uzyskanych z nich roślin. Przedstawione wyniki badań wykazały spektakularne efekty ograniczania porażenia nasion po zastosowaniu ozonowania, traktowania nasion pulsującymi falami radiowymi i gorącą wodą (hydrotermoterapia), odkażaniu w 2% preparacie HuwaSan oraz aplikacji biokondycjonerów: Agawit (25%), EM + wrotycz (5%), *Chlorella* (20%), ocet winny (10%), kurkuma (1%), pieprz Cayenne (1%), biowęgiel (50%) i Huminpol (50%). Traktowanie nasion tymi metodami korzystnie wpłynęło na zdrowotność i kiełkowanie oraz wschody, początkowy wzrost roślin i wymianę gazową w warunkach szklarniowych i polowych.

Słowa kluczowe: marchew, uszlachetnianie nasion, zdrowotność, kiełkowanie, wzrost

Innovative methods for organic vegetable seed production

Abstract

One of the most important problems in organic vegetable production is the high infection of seeds with pathogenic microflora, which causes poor germination and, when transferred from seed coats to plants, adversely affects their health, growth, development and yield. The aim of the presented research was to demonstrate the effectiveness of non-chemical methods of pre-sowing seed refinement and their beneficial impact on increasing the health-promoting and yielding potential of vegetables in the aspect of organic production. Carrot seeds were treated before sowing with various non-chemical methods and then their germination as well as the growth and development of the plants obtained from them were assessed. The presented research results showed spectacular effects of reducing seed infection after ozonation, treatment of seeds with pulsed radio waves and hot water (hydrothermotherapy), disinfection with 2% HuwaSan preparation and application of bioconditioners: Agawit (25%), EM + tansy (5%), *Chlorella* (20%), wine vinegar (10%), turmeric (1%), Cayenne pepper (1%), Biocarbon (50%) and Huminpol (50%). Treating seeds with these methods had a positive effect on health, germination and emergence, initial plant growth and gas exchange in greenhouse and field conditions.

Keywords: carrots, seed improvement, health, germination, growth

Sekwencjonowanie nowej generacji – historia, przebieg procesu i rodzaje sekwencjonowania

1. Wprowadzenie

Opracowanie metod sekwencjonowania DNA stanowi krok milowy w rozwoju wielu dziedzin biologii, w tym biotechnologii, biologii molekularnej, a także medycyny. Rozwój technologii sekwencjonowania umożliwia między innymi ocenę genomów organizmów, ich bioróżnorodności, a także pozwala określić podłoże genetyczne wielu chorób. Najbardziej rewolucyjną metodą sekwencjonowania jest niewątpliwie sekwencjonowanie nowej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*). W niniejszej pracy przedstawiona zostanie historia, przebieg procesu oraz rodzaje sekwencjonowania.

2. Historia sekwencjonowania

Technologia sekwencjonowania swój początek zawdzięcza Jamesowi Watsonowi i Francisowi Crickowi, którzy to w roku 1953 za pomocą badań krystalograficznych zaproponowali trójwymiarową strukturę helisy DNA [1]. Wydarzenie to zapoczątkowało szereg prac, których celem było stworzenie metody umożliwiającej odczytanie kolejności nukleotydów w genomie.

Przełom w sekwencjonowaniu nastąpił w latach 70. XX wieku, gdy Frederick Sanger wraz z zespołem opublikował pracę opisującą metodę sekwencjonowania DNA z wykorzystaniem dideksynukleotydów powodujących terminację syntezy po wbudowaniu do powstającego łańcucha. Metoda opierała się na syntezie DNA przy użyciu czterech typów dideksynukleotydów, które były znakowane izotopowo. Fragmenty DNA poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu na niezależnych ścieżkach w żelu poliakrylamidowym. W późniejszych modyfikacjach nukleotydy wzbogacane były markerami fluorescencyjnymi. Po reakcji sekwencjonowania fragmenty DNA rozdziela się na podstawie długości przy użyciu elektroforezy kapilarnej i analizuje w detektorze fluorescencyjnym, co pozwala na odczyt sekwencji DNA [2]. Technologia sekwencjonowania Sangera znana jest również jako sekwencjonowanie kapilarno-elektroforetyczne. Sekwencjonowanie Sangera wywarło ogromny wpływ na biologię molekularną i genetykę. Dzięki tej metodzie odkryto wiele kluczowych sekwencji DNA, w tym wykorzystanie sekwencjonowania Sangera przyczyniło się do poznania genomu ludzkiego. Sekwencjonowanie Sangera przez wiele lat było dominującą metodą sekwencjonowania DNA, jednak pojawienie się technologii sekwencjonowania nowej generacji w latach 2000. doprowadziło do wycofania się technologii Sangera jako głównej metody sekwencjonowania ze względu na jej ograniczenia, takie jak koszt, czas i – przede wszystkim – przepustowość. Rozwijanie technologii sekwencjonowania doprowadziło do jej udoskonalenia i opracowywania coraz nowszych sekwenatorów. Wprowadzenie sekwencjonowania do procesów zarówno naukowych, jak i diagnostycznych stało się obecnie powszechne i pożądane [3, 4].

¹ magda5.stawiarz@gmail.com, Zakład Biologii Medycznej, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, <https://www.ujk.edu.pl/>.

3. Sekwencjonowanie nowej generacji

Wysokoprzepustowe, masowo-równoległe sekwencjonowanie DNA, powszechnie określane jako sekwencjonowanie nowej generacji (NGS), jest innowacją w sekwencjonowaniu rozwijaną w okresie ostatniej dekady. NGS określane jest również jako sekwencjonowanie drugiej lub kolejnej generacji [5]. Termin „sekwencjonowanie nowej generacji” nie dotyczy pojedynczej technologii, lecz określa kilka rodzajów technologii mających wspólną cechę – równoległe sekwencjonowanie cząsteczki DNA w komórce przepływowej lub chipie. Sekwencjonowanie nowej generacji oparte jest na technologii angażującej reakcje chemiczne, które różnią się od wcześniej zastosowanej w technologii sekwencjonowania Sangera [6]. Metody sekwencjonowania drugiej generacji mogą być pogrupowane w dwie główne kategorie: sekwencjonowanie przez hybrydyzację i sekwencjonowanie przez syntezę (SBS). Metody SBS rozwijają technologię sekwencjonowania Sangerowskiego, jednak bazują na sekwencjonowaniu znacznie krótszych fragmentów DNA. Charakteryzują się wyższym wskaźnikiem błędów w stosunku do sekwencjonowania Sangera. Z tego też powodu polegają na wysokim pokryciu sekwencji (masowo-równoległe sekwencjonowanie) – od milionów do miliardów krótkich odczytów sekwencji DNA, co jest sposobem na uzyskanie dokładnej sekwencji opartej na identyfikacji sekwencji konsensusowej. Każda platforma generuje swój własny, unikalny zestaw potencjalnych błędów i ich użytkownicy powinni być świadomi tych ograniczeń. Pomimo początkowego przejścia od dłuższych długości odczytu do technologii krótkich odczytów aktualnie obserwuje się tendencję do powrotu w kierunku rozwoju technologii, które generują dłuższe odczyty przy zachowaniu masowo-równoległego charakteru technologii. Dzieje się tak w trzeciej i zwłaszcza czwartej generacji technologii sekwencjonowania, do których zaliczyć można takie platformy jak Pacific Biosciences (PacBio) lub Oxford Nanopore [6-9]. Technologie długiego odczytu mogą przezwyciężyć problemy napotymane w metodach opartych na krótkich odczytach, jak np. wykrywanie obejmujących cały genom powtórzeń i wykrywanie wariantów strukturalnych. W porównaniu z metodami drugiej generacji zmiany procesu obejmują minimalizację etapu przygotowania bibliotek i wykorzystanie niefragmentowanych cząsteczek DNA. Wczesnym ograniczeniem technologii trzeciej generacji w porównaniu z metodami drugiej generacji była dokładność odczytów, która z czasem ulega poprawie, również dzięki rozwojowi technologii analizowania danych [8]. Technologie sekwencjonowania oparte na krótkich odczytach dominują na aktualnym rynku platform sekwencjonowania. Do najczęściej stosowanych platform zalicza się platformy Illumina oraz Ion Torrent [10].

4. Procedura przygotowania bibliotek DNA do sekwencjonowania nowej generacji

Biblioteka NGS jest kluczowa w procesie sekwencjonowania NGS, ponieważ zawiera materiał genetyczny, który zostanie zsekwencjonowany, i to od jakości bibliotek zależy sukces procesu sekwencjonowania. W technologii sekwencjonowania nowej generacji terminem „biblioteka NGS” określa się fragmenty interesujących nas sekwencji, zbiór krótkich fragmentów DNA lub cDNA otrzymanych na matrycy RNA, które zostały oznakowane specjalnymi kodami kreskowymi (ang. *barcodes*), sekwencjami oligonukleotydowymi umożliwiającymi identyfikację matryc pochodzących z różnych próbek.

W celu przygotowania bibliotek konieczna jest izolacja odpowiedniego materiału genetycznego: DNA lub RNA z różnych rodzajów materiałów, takich jak próbki tkanek, krwi, śliny lub mikroorganizmów. Przed przygotowaniem biblioteki (lub w trakcie tego

procesu) RNA poddawany jest odwrotnej transkrypcji z użyciem enzymu odwrotnej transkryptazy w celu przepisania RNA na cDNA [11, 12]. Istotne są: uzyskanie dobrej jakości materiału DNA/cDNA do sekwencjonowania i pomiar parametrów jakościowych oraz ilościowych. Do tworzenia bibliotek wymagany jest precyzyjny pomiar stężenia kwasu nukleinowego i jego odpowiednie rozcieńczenie. W pracowni NGS użycie spektrofotometru nie jest zalecane, konieczna jest analiza fluorymetryczna z zastosowaniem barwników wiążących DNA [13, 14]. Kontrola jakości DNA/cDNA jest przeprowadzana w procesie elektroforezy.

Kolejny etap przygotowywania bibliotek stanowi dostosowanie DNA/cDNA do wymogów konkretnej platformy do sekwencjonowania, zawarty jest tutaj etap fragmentacji, namnożenia matrycy oraz znakowanie matrycy za pomocą specjalnych adapterów, które pełnią funkcje identyfikujące i kontrolne na etapie sekwencjonowania. W procesie fragmentacji matryca jest rozdzielana na krótkie fragmenty, zwykle od 300 pz do 500 pz w technologii krótkich odczytów. Fragmentacja materiału może odbywać się w sposób mechaniczny lub (najczęściej) enzymatyczny.

Następnym etapem jest proces ligacji z kodami kreskowymi. Ligację adapterów wykonuje ligaza DNA. Do krótkich sekwencji DNA/cDNA są kolejno przyłączane fragmenty DNA o znanej sekwencji (barkody). Dzięki wykorzystaniu barkodów o znanych sekwencjach możliwe jest przeprowadzenie procesu sekwencjonowania z wykorzystaniem wielu prób w jednym procesie sekwencjonowania [15, 16].

Biblioteki z przyłączonymi adapterami poddawane są procesowi oczyszczania z zastosowaniem zawiesziny złoża magnetycznego. W trakcie oczyszczania biblioteki ulegają wielokrotnej inkubacji z kulkami magnetycznymi oraz naprzemiennym odpłukiwaniem w alkoholu etylowym. Celem procedury oczyszczania jest oczyszczenie DNA/cDNA z resztek reakcji oraz zateżenie DNA/cDNA.

W większości protokołów ostatnim procesem enzymatycznym przygotowania bibliotek jest namnożenie biblioteki. W procesie sekwencjonowania istotne jest odczytanie jak największej liczby unikalnych cząsteczek DNA, jednak każda amplifikacja PCR generuje kopie, które mogą zdominować sekwencjonowanie. Jeżeli w kopiowanym fragmencie DNA polimeraza robi błąd, a błąd ten powieli się w zduplikowanych kopiach, można uzyskać fałszywy wynik. Dlatego też w celu zapewnienia odpowiedniej ilości materiału wyjściowego do sekwencjonowania przeprowadzana jest reakcja PCR z małą liczbą cykli. Ze względu na ryzyko wzrostu liczby duplikatów niosących błąd reakcja PCR najczęściej zawiera kilka cykli, zwykle 7-9 cykli.

Biblioteki ulegają procesowi sekwencjonowania charakterystycznemu dla użytej technologii. Pierwszym etapem jest namnożenie DNA/cDNA, aby wzmocnić odczytywany sygnał. Następnie wykonywane są naprzemiennie cykle inkorporacji zasad i odczytu sygnału. Generalnie sekwencjonowanie polega na procesie odczytywania sekwencji nukleotydów (A, C, G, T) w każdym fragmencie. Sposób odczytania sekwencji zależy od stosowanej technologii i został szerzej opisany w kolejnym rozdziale. Sekwencjonowanie jest procesem trwającym od kilku godzin (Ion Torrent) do nawet 3 dób (Illumina).

5. Popularne platformy sekwencjonowania – technologia Illumina oraz technologia Ion Torrent

Niniejszy rozdział przedstawi charakterystykę dwóch często stosowanych platform NGS – Illumina oraz Ion Torrent. Platformy Illumina szybko stały się jedną z najczęściej stosowanych technologii sekwencjonowania z uwagi na fakt generowania wysokiej jakości odczytów przy malejącym koszcie procesu [17, 18]. Platformy Illumina wspierają

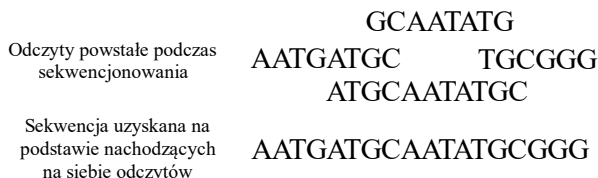
zarówno sekwencjonowanie pojedynczych odczytów (*single-reads*), jak i odczytów sparowanych (*paired-reads*). Proces sekwencjonowania odbywa się w komorach przepływowych, które w zależności od technologii mogą być podzielone na oddzielne ścieżki w liczbie od jednej do ośmiu. Platformy Illumina wykorzystują amplifikację mostkową, w przypadku której startery reakcji PCR są kowalentnie przyłączone do powierzchni, a fragmenty DNA ulegają hybrydyzacji (tworząc most) w wyniku komplementarności starterów i przyłączonych adapterów. Prowadzona w ten sposób amplifikacja prowadzi do powstania na powierzchni komory przepływowej tzw. „kłastrów”, czyli plamek o średnicy poniżej 1 μm zawierających ok. 1000 kopii tego samego fragmentu DNA. Proces odczytu sekwencji odbywa się na zasadzie sekwencjonowania przez syntezę (SBS, ang. *sequencing by-synthesis*) oraz odczytu fluorescencji znakowanych dNTP, które funkcjonują jako odwracalne terminatory. Każdy z czterech nukleotydów znakowany jest innym fluoroforem. Tylko jeden nukleotyd, zawierający fluorescencyjny inhibitor syntezy, może być przyłączony do nici DNA przez polimerazę. Po odczytaniu sygnału fluorescencji następuje chemiczne usunięcie grupy blokującej, przyłączenie kolejnego nukleotydu i odczytanie sygnału fluorescencji pochodzącego od tego nukleotydu. Dzięki zastosowaniu wysokorozdzielczej kamery ze światłoczułą matrycą CDD (ang. *charge-coupled device*) możliwe jest jednoczesne rejestrowanie sygnałów fluorescencyjnych pochodzących z milionów „kłastrów” utworzonych na powierzchni komory przepływowej [19-23].

Technologia Ion Torrent to technologia sekwencjonowania przez syntezę z detekcją protonów w układzie scalonym z wykorzystaniem chipów półprzewodnikowych. Przygotowanie bibliotek do procesu sekwencjonowania jest podobne jak w technologii Illumina. Proces rozpoczyna się izolacją materiału genetycznego, w dalszej kolejności następuje przygotowanie bibliotek, tj. namnożenie matrycy, następnie jej fragmentacja na krótkie amplikony oraz znakowanie powstałych krótkich odcinków odpowiednimi, unikalnymi znacznikami. Różnica między technologią Illumina i Ion Torrent polega na amplifikacji gotowych bibliotek. W technologii Ion Torrent proces ten przeprowadza się poza sekwenatorem w formie PCR emulsyjnego z wykorzystaniem osobnego urządzenia. Proces ten zachodzi w instrumencie Ion Chef. PCR emulsyjny przebiega na powierzchni sfer (ISPs, ang. *ion sphere particles*) w niewielkich kroplach wodnych unoszących się w roztworze oleju (emulsji). Powstałe krople powinny zawierać następujące składniki: jedną sferę (ISPs), jeden fragment (amplikon), startery, polimerazę DNA, dNTP i bufor. Kroplę można określić jako minireaktor. Do amplifikacji DNA dochodzi na wytworzonych kulkach wg zasady: jeden fragment DNA – jedna kulka. Chip z nałożonymi bibliotekami należy umieścić w sekwenatorze Ion Studio, w którym to zachodzi właściwy proces sekwencjonowania. Proces sekwencjonowania polega na wielokrotnym przepłukiwaniu chipa nukleotydami w określonej kolejności, co w konsekwencji pozwala na odczytanie sekwencji badanej matrycy. W przypadku wbudowania do sekwencji badanej nukleotydu komplementarnego do nici matrycowej następuje uwolnienie jonów wodoru, co wpływa na zmianę pH. Jeżeli kolejny nukleotyd nie jest komplementarny do już obecnego, w roztworze nie zachodzi inkorporacja, w związku z czym nie jest odnotowywana zmiana pH. Aparat odnotowuje sygnał, a jego siła zależy od liczby nukleotydów przyłączonych w cyklu. Technologia Ion Torrent™ zamienia informacje chemicznie (A, C, G, T) na informację cyfrową (0, 1) za pośrednictwem chipa półprzewodnikowego.

Wyzwaniem w tej metodzie jest prawidłowa ocena liczby wbudowanych zasad w długich ciągach homopolimerowych, a zaletą – wyeliminowanie części aparatury rejestrującej (laser, kamera), uproszczenie procesu, skrócenie czasu odczytu i obniżenie kosztów sekwencjonowania [24-27].

6. Bioinformatyczna analiza danych

Ostatnim etapem procesu sekwencjonowania jest bioinformatyczna analiza danych, tj. analiza *in silico*. Otrzymane dane z sekwenatora należy uporządkować przy użyciu zaawansowanych algorytmów bioinformatycznych. Analizy te obejmują porównywanie otrzymanych sekwencji z badanymi prób z sekwencjami referencyjnymi dostępnymi w bazach danych. Zidentyfikowane różnice między sekwencją badaną a referencyjną należy na końcu zinterpretować i wyciągnąć wnioski na temat badanej próbki. W przypadku braku dostępu do sekwencji referencyjnej stosuje się algorytmy pozwalające na składanie sekwencji *de novo*, tj. na podstawie nachodzących na siebie odczytów. W tym przypadku dochodzi do porównania odczytanych fragmentów DNA pochodzących z różnych regionów sekwencji, nałożenia ich na siebie i stopniową jej rekonstrukcję. Proces ten zobrazowano poniżej (rys. 1) [28, 29].



Rysunek 1. Schemat składania sekwencji *de novo*

7. Podsumowanie

Sekwencjonowanie DNA stało się dziś istotnym narzędziem biologii molekularnej, rozwijanym od lat 70., kiedy to opracowano proces sekwencjonowania Sangerowskiego. Dziś obserwowana jest gama platform NGS, które choć w założeniu spełniają tę samą funkcję, różnią się sposobem przygotowania materiału genetycznego oraz samym procesem sekwencjonowania, zapewniając równoległe masowe sekwencjonowanie. Niewątpliwie proces sekwencjonowania jest procesem wieloetapowym i w wielu aspektach skomplikowanym. Platformy te są stale udoskonalane. Prowadzi to do zmniejszenia kosztów uzyskania sekwencji, również kompletnych genomów, co pozwala na nowe odkrycia biologiczne. Dzięki temu NGS znajduje coraz większe zastosowanie w diagnostyce chorób o podłożu genetycznym, pozwalając na pełniejsze zrozumienie ich mechanizmów molekularnych. Rozwój technologii stojącej za procesem NGS sprawi, że sekwencjonowanie tego typu zyska jeszcze większe znaczenie.

Literatura

1. Watson J.D., Crick F.H.C., *Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid*, Nature, 171, 1953, s. 737-738.
2. Gromadka R., *Wykorzystanie sekwencjonowania nowej generacji do poznania genomu ziemiaka*, Biotechnologia, 4(91), 2010, s. 69-75.
3. Shendure J., Ji H., *Next-generation DNA sequencing*, Nature Biotechnology, 26(10), 2008, s. 1135-1145.
4. Metzker M.L., *Sequencing technologies – the next generation*, Nature Reviews Genetics, 11(1), 2010, s. 31-46.

5. Rizzo J.M., Buck M.J., *Key principles and clinical applications of „next-generation” DNA sequencing*, *Cancer Prevention*, 5(7), 2012, s. 887-900.
6. Voelkerding K.V., Coonrod E.M., Durtschi J.D., Margraf R.L., *Next-generation sequencing: principles for clinical application*, [w:] Leonard D.G.B. (red.), *Molecular pathology in clinical practice*, Springer, New York 2016, s. 889-909.
7. Slatko B.E., Gardner A.F., Ausubel F.M., *Overview of next-generation sequencing technologies*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 122(1), 2018, s. 1-11.
8. Zhong Y., Xu F., Wu J., Schubert J., Li M.M., *Application of next generation sequencing in laboratory medicine*, *Annals of Laboratory Medicine*, 41(1), 2021, s. 25-43.
9. Kwong J.C., McCallum N., Sintchenko V., Howden B.P., *Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology*, *Pathology*, 47(3), 2015, s. 199-210.
10. Forth L.F., Höper D., *Highly efficient library preparation for Ion Torrent sequencing using Y-adapters*, *BioTechniques*, 67(5), 2019, s. 229-237.
11. Boone M., De Koker A., Callewaert N., *Capturing the „ome”: the expanding molecular toolbox for RNA and DNA library construction*, *Nucleic Acids Research*, 46(6), 2018, s. 2701-2721.
12. Haynes B.C., Blidner R.A., Cardwell R.D., Zeigler R., Gokul S., Thibert J.R., Chen L., Fujimoto J., Papadimitrakopoulou V.A., Wistuba I.I., Latham G.J., *An integrated next-generation sequencing system for analyzing DNA mutations, gene fusions, and RNA expression in lung cancer*, *Translational Oncology*, 12(6), 2019, s. 836-845.
13. Hussing C., Kampmann M.L., Mogensen H.S., Børsting C., Morling N., *Comparison of techniques for quantification of next-generation sequencing libraries*, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 5, 2015, s. 276-278.
14. Simbolo M., Gottardi M., Corbo V., Fassan M., Mafficini A., Malpeli G., Lawlor R.T., Scarpa A., *DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples*, *Plos One*, 8, 2013, s. 1-8.
15. Head S.R., Komori H.K., LaMere S.A., Whisenant T., Van Nieuwerburgh F., Salomon D.R., Ordoukhanian P., *Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges*, *BioTechniques*, 56(2), 2014, s. 1-31.
16. Hess J.F., Kohl T.A., Kotrová M., Rönsch K., Paprotka T., Mohr V., Hutzenlaub T., Brüggemann M., Zengerle R., Niemann S., Paust N., *Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies*, *Biotechnology Advances*, 41, 2020, s. 1-14.
17. Agbachi C.P.E., *Pathways in bioinformatics: a window in computer science*, *International Journal of Computer Trends and Technology*, 49(2), 2017.
18. Baker M., *De novo genome assembly: what every biologist should know*, *Nature Methods*, 9, 2012, s. 333-337.
19. Hodkinson B.P., Grice E.A., *Next-generation sequencing: A review of technologies and tools for wound microbiome research*, *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(1), 2015, s. 50-58.
20. Tan G., Opitz L., Schlapbach R., Rehraue H., *Long fragments achieve lower base quality in Illumina paired-end sequencing*, *Scientific Reports*, 9, 2019, s. 1-7.
21. Schirmer M., D’Amore R., Ijaz U.Z., *Illumina error profiles: resolving fine-scale variation in metagenomic sequencing data*, *BMC Bioinformatics*, 17, 2016, s. 1-15.
22. Quail M.A., Swerdlow H., Turner D.J., *Improved protocols for the illumina genome analyzer sequencing system*, *Current Protocols in Human Genetics*, 18/18.2, 2009, s. 1-27.
23. Emiyu K., Lelisa K., *Review on Illumina sequencing technology*, *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 9, 2022, s. 1-3.
24. Bronner I.F., Quail M.A., *Best practices for Illumina library preparation*, *Current Protocols in Human Genetics*, 102, 2019, s. 1-48.

25. Buermans H.P., den Dunnen J.T., *Next generation sequencing technology: Advances and applications*, Biochimica et Biophysica Acta, 1842(10), 2014, s. 1932-1941.
26. Woźniak A., Boroń M., Zbieć-Piekarska R., Spólnicka M., *Zastosowanie technologii wysokoprzepustowego sekwencjonowania DNA w genetyce sądowej*, Problemy Kryminalistyki, 304(2), 2019, s. 5-14.
27. Dijk E.L., Auger H., Jaszczyszyn Y., Thermes C., *Ten years of next-generation sequencing technology*, Trends in Genetics, 30(9), 2014, s. 418-426.
28. Płoski R., *Next generation sequencing – general information about the technology, possibilities, and limitations*, [w:] Demkow U., Płoski R. (red.), *Clinical applications for next-generation sequencing*, 2016, s. 1-18.
29. Piątkowski J., Skalniak A., Bodzioch M., Pach D., Hubalewska-Dydejczyk A., *Wprowadzenie do sekwencjonowania ludzkiego genomu w diagnostyce*, Przegląd Lekarski, 70(7), 2013, s. 458-462.

Sekwencjonowanie nowej generacji – historia, przebieg procesu i rodzaje sekwencjonowania

Streszczenie

Technologie, dzięki którym możliwe jest przeprowadzenie procesu sekwencjonowania kwasów nukleinowych, są od wielu lat ulepszane. Dzięki rozwojowi technologicznemu możliwe jest stosowanie coraz szybszych, tańszych i prostszych systemów sekwencjonowania. Sekwencjonowanie swój początek zawdzięcza opisaniu struktury podwójnej helisy DNA przez Jamesa Watsona i Francis Cricka w roku 1953. Rozwój technologii sekwencjonowania sięga lat 70. XX wieku, kiedy to Frederick Sanger wraz z zespołem opublikował pracę opisującą metodę sekwencjonowania DNA z wykorzystaniem dideoksynukleotydów powodujących terminację syntezy po wbudowaniu do powstającego łańcucha. Jednak pojawienie się w latach 2000. technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*) i jej późniejszy rozwój zapoczątkował rewolucję w biologii molekularnej i genetyce. NGS zaliczany jest do niesangerowskich technologii sekwencjonowania o dużej przepustowości. Miliony fragmentów DNA i/lub cDNA mogą być sekwencjonowane jednocześnie, jest to masowe równoległe sekwencjonowanie, co w znacznym stopniu wpływa na wzrost wydajności sekwencjonowania. Badanie NGS umożliwia przejście od analizy niewielkich fragmentów genu tradycyjnymi metodami do zastosowania technik umożliwiających uzyskanie pełnej sekwencji wielu genów, a nawet całego genomu. Sekwencjonowanie nowej generacji jest narzędziem, które już dziś znajduje szerokie zastosowanie w biologii molekularnej i diagnostyce chorób genetycznych, zwłaszcza w onkologii. Słowa kluczowe: sekwencjonowanie nowej generacji, NGS, Ion Torrent, Illumina

Next generation sequencing – history, process flow and types of sequencing

Abstract

Technologies that make it possible to carry out the process of nucleic acid sequencing have been improved for many years. Thanks to technological development, it is possible to use faster, cheaper and simpler sequencing systems. Sequencing began with the description of the structure of the double helix of DNA by James Watson and Francis Crick in 1953. The development of sequencing technology dates back to the 1970s, when Frederick Sanger and his team published a paper describing the method of DNA sequencing using dideoxynucleotides that terminate the synthesis after incorporation into the nascent chain. However, the advent of next generation sequencing (NGS) technology in the 2000s and its subsequent development ushered in a revolution in molecular biology and genetics. NGS is classified as a non-Sangerian high-throughput sequencing technology. Millions of DNA and/or cDNA fragments can be sequenced simultaneously, this is massive parallel sequencing, greatly increasing sequencing efficiency. NGS allows to move from analyzing small fragments of a gene using traditional methods to using techniques that enables to obtain the full sequence of many genes and even the entire genome. Next generation sequencing is a tool that is already widely used in the molecular biology and diagnosis of genetic diseases, especially in oncology.

Keywords: next generation sequencing, NGS, Ion Torrent, Illumina

Fizyczne podstawy tomografii NMR

1. Wprowadzenie

Powszechnie stosowanym w medycynie przyrządem diagnostycznym jest rezonans NMR (z ang. *nuclear magnetic resonance*) [1]. Pozwala on na dokładne zobrazowanie wewnętrznych tkanek organizmu, ich zmian a nawet nieprawidłowego działania wybranych komórek [2-5]. Tomograf jądrowego rezonansu magnetycznego jest przyrządem skomplikowanym, składającym się z wielu podzespołów oraz zaawansowanego oprogramowania. Wiele zjawisk fizykochemicznych współdziała z komputerową obróbką danych, aby otrzymać końcowy wynik badania. Jednakże startowym zjawiskiem w działaniu tomografu NMR jest magnetyczny rezonans jądrowy (NMR) [6]. Punktem wyjścia do opisu tego efektu w fizyce jest spin jądra atomowego. Zachowanie się spinu w polu magnetycznym można opisać na gruncie teorii kwantowej. W pewnych uproszczonych sytuacjach te same wyniki otrzymuje się na gruncie mechaniki klasycznej, utożsamiając spin z momentem pędu. Należy jednak zaznaczyć, że spin nie jest momentem pędu cząstki. Jest jej własnością wynikającą z równania Diraca w elektrodynamice kwantowej, a więc w zaawansowanej dziedzinie fizyki. Dlatego do klasycznego opisu NMR należy podchodzić z dużą ostrożnością. Niemniej dla personelu obsługującego tomograf NMR uproszczony opis jest bardzo cenny, bo lekarze z reguły nie mają dostatecznej wiedzy z fizyki. Dlatego jednym z celów niniejszego opracowania jest opisanie dynamiki spinu w polu magnetycznym i porównanie jej do dynamiki bryły sztywnej w ruchu obrotowym w polu grawitacyjnym. Jest to bardzo dobrze znane zjawisko, bo chodzi tu o zwykłą zabawkę, atrakcyjną zarówno dla najmłodszych dzieci, jak i dla dorosłych – jest to bąk. Zjawisko znamy dobrze, jednakże do jego opisu potrzebna jest teoria dynamiki bryły sztywnej na poziomie średniego wykształcenia akademickiego. Wspólną wielkością, która charakteryzuje ruch bąka oraz ruch spinu jest częstość Larmora – podstawa NMR, czyli również podstawa tomografii NMR. Ruch spinu w polu magnetycznym opiszemy teoretycznie. Własności spinów w polu magnetycznym badane są za pomocą spektrometrów NMR. Dla potrzeb medycznych stosuje się tak zmodyfikowany spektrometr NMR, aby można było badać układy spinów w bardzo małej przestrzeni. Uzyskuje się to poprzez wprowadzenie dodatkowych cewek wytwarzających gradient zewnętrznego pola magnetycznego. W pracy dużo miejsca poświęcamy technice impulsowej pomiaru dynamiki spinów, ponieważ ten sposób badań jest bardziej czuły i jest stosowany w tomografach NMR nowej generacji.

¹ jasinski@prz.edu.pl, Katedra Fizyki i Inżynierii Medycznej, Wydział Matematyki i Fizyki Stosowanej Politechniki Rzeszowskiej, al. Powstańców Warszawy 8, 35-959 Rzeszów, Polska.

² Katedra Fizyki i Inżynierii Medycznej, Wydział Matematyki i Fizyki Stosowanej Politechniki Rzeszowskiej, al. Powstańców Warszawy 8, 35-959 Rzeszów, Polska.

³ Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Pigionia 1, 35-959 Rzeszów, Polska.

⁴ Instytut Nauk Technicznych, Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Przemysłu, ul. Książąt Lubomirskich 6, 37-700 Przemysł, Polska.

⁵ Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Uniwersytet Rzeszowski, ul. Pigionia 1, 35-959 Rzeszów, Polska; Instytut Nauk Technicznych, Państwowa Akademia Nauk Stosowanych w Przemysłu, ul. Książąt Lubomirskich 6, 37-700 Przemysł, Polska.

2. Spinowy moment pędu fermionów

Wszystkie fermiony, a więc protony, złożone jądra atomowe, atomy, jony oraz elektrony posiadają wewnętrzny moment pędu (spinowy moment pędu) $\hbar \vec{S}$, gdzie \vec{S} jest spinem cząstki. Moment pędu w mechanice klasycznej \vec{K} , jak i spin \vec{S} są wielkościami wektorowymi. Długość wektora spinu \vec{S} określona jest przez spinową liczbę kwantową S oznaczaną jako I dla protonu lub neutronu lub S dla elektronu. Relacja między spinem \vec{S} a spinową liczbą kwantową S jest określona poprzez zależność:

$$|\vec{S}| = \hbar [S(S+1)]^{1/2}, \quad (1)$$

gdzie: $|\vec{S}|$ jest długością wektora \vec{S} , $\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1,05 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$, h jest stałą Plancka $h = 6.63 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$. Dla protonu, neutronu i elektronu spin wynosi $\frac{1}{2}$.

Spin nie jest to moment pędu zdefiniowany jak w mechanice klasycznej.

$$\vec{K} = \vec{r} \times \vec{p}, \quad (2)$$

gdzie: \vec{K} jest momentem pędu, \vec{r} jest wektorem promieniowania wodzącego, \vec{p} jest wektorem pędu.

Spinowy moment pędu \vec{S} wynika z równania Diraca i nie ma odpowiednika w mechanice klasycznej. Często kojarzy się ten wewnętrzny moment pędu z momentem pędu kuli będącej w obrocie wokół swojej średnicy. Jest to nieprawidłowa analogia, ponieważ kwantowa średnica elektronu jest rzędu 10^{-20} m (klasyczna jest rzędu 10^{-15} m) i proste obliczenia wykazują, że nie może być to moment pędu ruchu wirowego. Ale inne własności ruchu wirowego bryły sztywnej w polu grawitacyjnym są podobne do własności ruchu spinowego momentu pędu w polu magnetycznym. Taką własnością jest precesja Larmora. Analogia taka istnieje, ponieważ z istnienia spinu wynikają własności magnetyczne cząstki.

Ustawienie wektora spinu w polu magnetycznym określają magnetyczne spinowe liczby kwantowe m_l , m_s . Całkowity moment pędu $\hbar \vec{J}$ cząstki składa się z sumy orbitalnego momentu pędu $\hbar \vec{L}$ i spinowego momentu pędu $\hbar \vec{S}$ elektronów oraz jądrowego momentu pędu $\hbar \vec{I}$.

Moment magnetyczny cząstki wiąże się z jej całkowitym momentem pędu \vec{J} poprzez zależność:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{J} = -g \mu_B \vec{J}, \quad (3)$$

gdzie: γ jest czynnikiem giromagnetycznym, który przedstawia stosunek momentu magnetycznego do momentu pędu. Dla różnych cząstek γ jest różne. $\mu_B = 9.27401 \times 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$ jest magnetonem Bohra, g jest spektroskopowym współczynnikiem rozszczepienia ($g = 2.0023$ dla elektronów).

Czyli zarówno jądro, jak i elektron posiadają moment magnetyczny μ_j, μ_e

$$\vec{\mu}_j = +\gamma \vec{K} = \gamma \hbar \vec{I}, \quad (4)$$

$$\vec{\mu}_e = -g_e \hbar \vec{I}_e, \quad (5)$$

gdzie: \vec{I}, \vec{I}_e – spin jądra, spin elektronu, γ – współczynnik giromagnetyczny dla jądra (protonu), $\gamma = g_n = \frac{e}{2m_p}$, $m_p = 1,67 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$, $m_e = 1,60 \cdot 10^{-19} \text{ kg}$, g_e – współczynnik rozszczepienia spektroskopowego – $g_e = 2,0023$ dla elektronu.

Dla różnych jąder mamy różne wartości spinu (np. 1/2, 1, 3/2) i różne współczynniki giromagnetyczne. W tabeli 1 przedstawiono wartości spinów S dla kilku pierwiastków, których naturalna izotopowa zawartość w przyrodzie jest 100%.

Tabela 1. Parametry spinowe i magnetyczne wybranych jąder oraz ich częstotliwości rezonansowe dla pola magnetycznego o indukcji $B_0 = 1T$

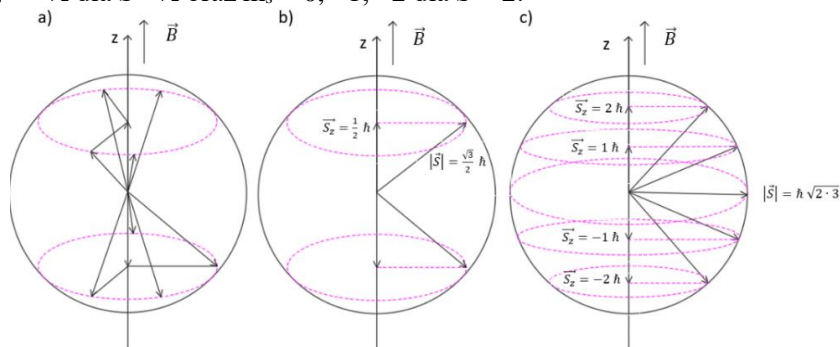
Izotop	Spin	Współczynnik giromagnetyczny [$\gamma/10 \text{ rad T}^{-1}$]	Moment magnetyczny*	Częstość rezonansowa ν_L [MHz]
^1H	1/2	26,7520	2,7927	400,000
^{14}N	1	1,9338	0,4036	28,894
^{19}F	1/2	25,181	2,6273	376,308
^{23}Na	3/2	7,08013	2,2161	105,805
^{31}P	1/2	10,841	1,1305	161,923

* moment magnetyczny wyraża się w jednostkach magnetonu jądrowego $\mu_n = \frac{e\hbar}{2M_p c} = 5.0509 \cdot 10^{-27} JT^{-1}$

Zasadniczą różnicą pomiędzy klasycznym momentem pędu a kwantowym momentem pędu jest to, że kwantowy moment pędu jest wielkością skwantowaną. Oznacza to, że w zewnętrznym polu magnetycznym ustawia się on w takich kierunkach, że jego rzut na oś z (zgodną z kierunkiem pola magnetycznego) jest całkowitą lub połówkową wielokrotnością stałej Plancka h . Ustawienie spinu określa magnetyczna liczba kwantowa m_s , która może przyjmować wartości

$$m_s = -S, -S + 1, \dots + S \quad (6)$$

Na rysunku 1 pokazano niektóre możliwe ustawienia momentu pędu o wartości $S = 1/2$ (rys. 1 a, b) i $S = 2$ (rys. c). Jak widać dla $S = 1/2$ możliwe są ustawienia wektora \vec{S} zgodnie lub przeciwnie do kierunku pola, tak aby rzut wektora \vec{K} na tę oś wynosił $\hbar m_s$, gdzie $m_s = \pm 1/2$ dla $S = 1/2$ oraz $m_s = 0, \pm 1, \pm 2$ dla $S = 2$.



Rysunek 1. Obraz przedstawiający: a – przykładowe ustawienie spinu $S = 1/2$ w przestrzeni, b – rzut wszystkich ustawień na oś z równy $S_z = \pm \frac{1}{2} \hbar$, c – ustawienia spinu $S = 2$ [opracowanie własne]

3. Energia spinu w polu magnetycznym

Energia spinu w polu magnetycznym zależy od jego ustawienia i wynosi (patrz np. [7] rozdz. 16)

$$W = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (7)$$

W przypadku spinów ułożonych w kierunku pola (skośnie w górę) mówimy o „ułożeniu równoległym”, energia jest mniejsza niż w przypadku ułożenia przeciwnego, tzn. z rzutem na oś skierowanym przeciwnie do pola (ułożenie antyrównoległe).

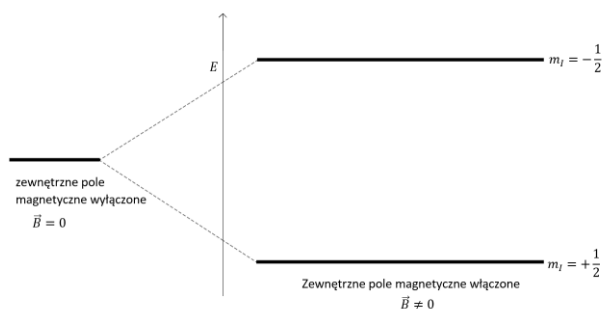
Przykładowo poziomy energetyczne dla spinu protonu $I = \frac{1}{2}$ przedstawione są na rysunku 2. Energia dolnego poziomu wynosi

$$W_1 = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar B_0 I_z = -\gamma \hbar B_0 m_I = \gamma \hbar B_0 - (1/2) \quad (8)$$

Energia górnego poziomu wynosi

$$W_2 = -\gamma \hbar B_0 \left(\frac{1}{2}\right) \quad (9)$$

Dolny poziom oznaczamy więc jako $m_I = \frac{1}{2}$, natomiast górny $m_I = -\frac{1}{2}$.



Rysunek 2. Poziomy energetyczne momentu magnetycznego jądra o spinie $1/2$ w zewnętrznym polu magnetycznym [opracowanie własne]

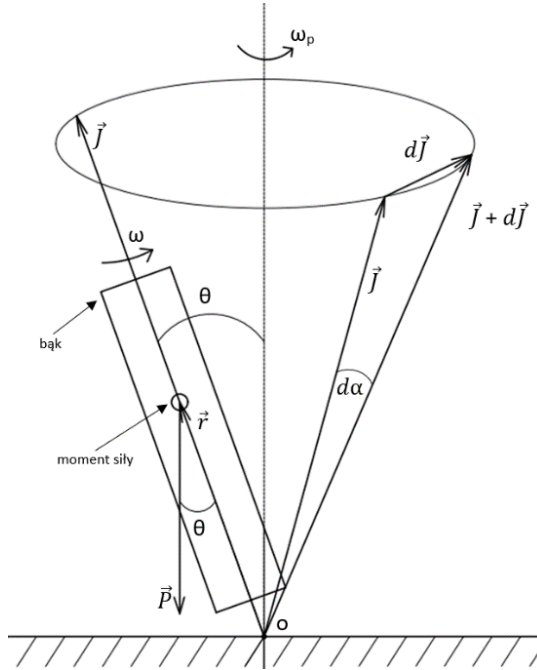
Omawiany diagram energetyczny ma duże znaczenie dla wyjaśnienia zjawiska jądrowego rezonansu magnetycznego NMR. W medycznym obrazowaniu tkanek za pomocą NMR wykorzystuje się jądra wodoru, czyli protony mające omawiany spin jądrowy $I = 1/2$. W tkance biologicznej jest dużo atomów wodoru, bo wchodzi one w skład wody i innych biologicznych molekuł węglowodorowych. Umieszczając tkankę w stałym polu magnetycznym B_0 , otrzymujemy rozszczepienie poziomu energetycznego takie jak na rys. 2. Jeżeli teraz przez tkankę przepuścimy falę elektromagnetyczną o energii kwantu $\hbar\omega = \frac{h\omega}{2\pi} = \Delta W$, gdzie ΔW jest różnicą energii poziomów 2 i 1, to energia fali zostanie pochłonięta. Ilość pochłoniętej energii będzie proporcjonalna do ilości protonów. Mierząc to pochłonięcie kolejno w różnych miejscach tkanki (w woskach), możemy zobrazować różną strukturę tkanki. Jak wynika z równań (8) i (9)

$$\Delta W = \gamma \hbar B_0 \quad (10)$$

Energia ta odpowiada fali o częstotliwości Larmora, czyli częstotliwości precesji momentu magnetycznego w stałym polu magnetycznym.

4. Dynamika wirującego bąka w polu grawitacyjnym

Precesja spinu przypomina precesję wirującego ciała stałego o masie m , podpartego w jednym punkcie, spowodowaną siłą ciężkości (rys. 4). Walec na tym rysunku oznacza wirującą bryłę sztywną (np. zabawka – bąk).



Rysunek 3. Wirująca bryła sztywna w polu grawitacyjnym. [opracowanie własne]

Bąk „obraca się” z częstością ω wokół własnej osi obrotu. W związku z tym ma moment pędu:

$$\vec{J} = I\omega \quad (11)$$

Równaniem ruchu tej bryły jest:

$$\vec{N} = \frac{d\vec{J}}{dt} \quad (12)$$

gdzie: \vec{N} jest momentem siły (jest to analogia do równania ruchu w ruchu postępowym, w którym ruch bryły o masie m pod wpływem siły \vec{F} opisuje II zasada dynamiki Newtona $\vec{F} = d\vec{p}/dt$).

W ruchu obrotowym analogiem pędu jest moment pędu, a sile odpowiada moment siły. Moment siły definiujemy jako iloczyn wektorowy:

$$\vec{N} = \vec{r} \times \vec{F} \quad (13)$$

gdzie: \vec{F} – siła, \vec{r} – wektor odległości siły od osi obrotu.

Siła ciężkości działająca na bąk wynosi:

$$\vec{P} = m\vec{g}, \quad P = mg \quad (14)$$

gdzie: $P = \vec{P}$ jest wartością wektora \vec{P}

oraz moment siły

$$\vec{N} = N = P \cdot r \cdot \sin\theta \quad (15)$$

gdzie: θ jest kątem pomiędzy \vec{P} i \vec{r} .

Moment siły \vec{N} powoduje zmianę momentu pędu:

$$\vec{N} = \frac{d\vec{J}}{dt} \quad (16)$$

Ponieważ długość wektora \vec{J} nie zmienia się (bo nie ma tarcia), to zmienia się kierunek tego wektora, dając $\vec{J} + d\vec{J}$, po czasie dt zmienia się o $d\vec{J} = \vec{N} \cdot dt$, co wynika z równania (17). Wektor \vec{J} zakreśla wtedy kąt $d\alpha$ (jak na rys. 3). Z proporcji $d\vec{J}/2\pi r = d\alpha/2\pi$ otrzymujemy:

$$d\vec{J} = \frac{d\alpha}{r} \quad (17)$$

Definiując $d\alpha/dt$ jako prędkość kątową końca wektora \vec{J} , czyli prędkość precesji ω_p , otrzymujemy:

$$\omega_p = N/(J\sin\theta) = rP/J \quad (18)$$

5. Dynamika spinu w polu magnetycznym

Precesja Larmora jest analogicznym zjawiskiem do precesji wirującej bryły sztywnej wokół osi obrotu. W stałym polu magnetycznym \vec{B} na moment magnetyczny $\vec{\mu}$ działa moment siły \vec{N} :

$$\vec{N} = \vec{\mu} \times \vec{B} \quad (19)$$

Ten moment siły powoduje zmianę momentu pędu \vec{K} wektora $\vec{\mu}$.

Moment magnetyczny $\vec{\mu}$ związany jest ze spinem, więc nastąpi zmiana wektora spinu. Ponieważ wartość spinu nie ulega zmianie, więc zmianie ulega jego kierunek. Zgodnie z II zasadą dynamiki Newtona ($K = dp/dt$) zmiana momentu magnetycznego w czasie opisana jest równaniem ruchu:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma(\vec{\mu} \times \vec{B}) \quad (20)$$

Jest to równanie różniczkowe, którego rozwiązanie opisuje zachowanie się momentu magnetycznego w czasie. Wybierając układ współrzędnych tak, żeby pole magnetyczne było skierowane wzdłuż osi z , współrzędne wektora pola są $\vec{B} = (0, 0, B_0)$, a wektor $\vec{\mu}$ ma współrzędne $\vec{\mu} = (\mu_x, \mu_y, \mu_z)$.

Równanie (20) możemy wtedy zapisać jako trzy równania skalarne:

$$d\mu_x/dt = \gamma B_0 \mu_y \quad (21a)$$

$$d\mu_y/dt = \gamma B_0 \mu_x \quad (21b)$$

$$d\mu_z/dt = 0 \quad (21c)$$

Z równania (21c) wynika, że μ_z nie zależy od czasu. Rozwiązaniami równań (21a), (21b) i (21c) są funkcje:

$$\mu_x = a \cos(\omega t) \quad (22a)$$

$$\mu_y = -a \sin(\omega t) \quad (22b)$$

$$\mu_z = \text{const} \quad (22c)$$

gdzie: a jest amplitudą.

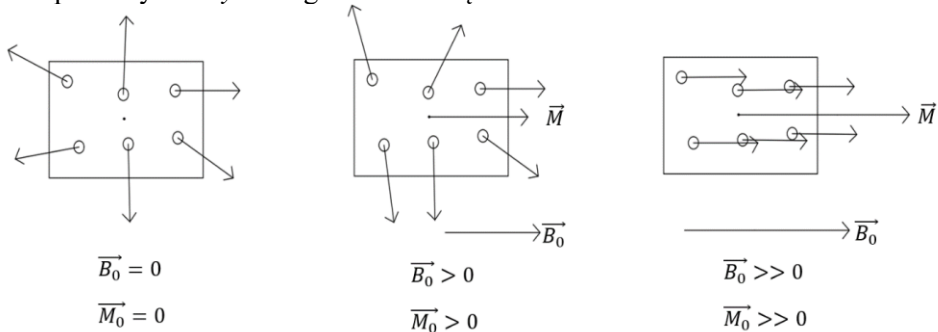
Z równań (22a) i (22b) wynika, że rzut wektora $\vec{\mu}$ na płaszczyznę xy rotuje z częstością ω , natomiast rzut $\vec{\mu}$ na oś z jest stały w czasie (rys. 1). Wstawiając równania (22a), (22b) do (21a) i (21b) otrzymujemy:

$$\omega = \omega_0 = \gamma B_0 \quad (23)$$

Częstość ω_0 jest to częstość precesji wektora $\vec{\mu}$ wokół osi z i nazywa się częstością Larmora. Jak wynika ze wzoru (23), częstość ta jest proporcjonalna do pola magnetycznego i zależy od czynnika giroskopowego cząstki.

Mając do czynienia z układem momentów magnetycznych, jak w przypadku ferromagnetyka, suma wszystkich momentów daje namagnesowanie.

Zakładając, że mamy układ składający się z dużej ilości jąder o niezerowym jądrowym spinie $\vec{I} = 1/2$, momenty magnetyczne ułożą się częściowo chaotycznie, analogicznie do momentów pędu na rys. 1a. Wektor namagnesowania \vec{M} tego układu jest momentem magnetycznym sumy wektorowej magnetycznych momentów jądrowych (rys. 4). Ponieważ obsadzenie poziomu o niższej energii jest większe od obsadzenia wyższego poziomu, w kierunku pola (czyli osi z) otrzymamy niezerowe namagnesowanie. Natomiast w płaszczyźnie xy namagnesowanie będzie zerowe.



Rysunek 4. Ilustracja wektorowa namagnesowania [opracowanie własne]

Po wyłączeniu zewnętrznego pola B_0 momenty magnetyczne spinów wracają do konfiguracji wyjściowej, czyli z nieuporządkowanym ich ukierunkowaniem. Czas, w którym spiny powracają po wyłączeniu pola do sytuacji początkowej nazywamy czasem relaksacji.

Ponieważ na każdy składowy moment magnetyczny działa moment siły wyrażony zależnością (12), to na wypadkowy moment magnetyczny, czyli na namagnesowanie działa moment siły \vec{N}_M . Moment ten powoduje zmianę momentu pędu układu, który wiąże się z namagnesowaniem zależnością:

$$\vec{M} = \gamma \vec{K}_c \quad (24)$$

gdzie wypadkowy moment pędu \vec{K}_c jest

$$\vec{K}_c = \sum_i \vec{k}_i \quad (25)$$

Otrzymujemy więc, podobnie jak dla pojedynczego momentu magnetycznego, moment siły całego układu

$$\vec{N} = \vec{M} \times \vec{B}_0 \quad (26)$$

Moment ten powoduje zmianę namagnesowania zgodnie z II zasadą dynamiki

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\vec{M}}{\gamma} \right) = \vec{M} \times \vec{B}_0 \quad (27)$$

czyli:

$$\frac{d(\vec{M})}{dt} = \gamma \vec{M} \times \vec{B}_0 \quad (28)$$

Równania różniczkowe ruchu dla poszczególnych składowych wektora \vec{M} różnią się jednak od tych przedstawionych wzorami (21), ponieważ zawierają człony relaksacyjne:

$$dM_x/dt = \gamma(\vec{M} \times \vec{H})_x - M_x/T_2 \quad (29a)$$

$$dM_y/dt = \gamma(\vec{M} \times \vec{H})_y - M_y/T_2 \quad (29b)$$

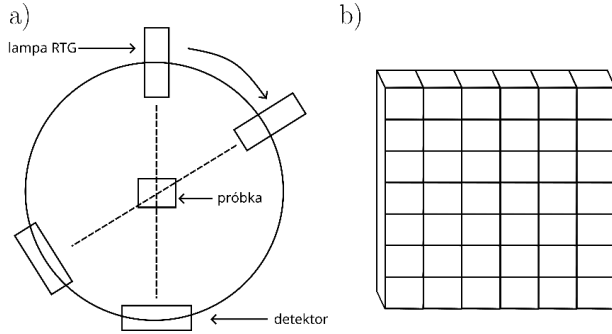
$$dM_z/dt = \gamma(\vec{M} \times \vec{H})_z - (M_0 - M_z)/T_1 \quad (29c).$$

Są to znane równania Blocha [7]. W przypadku statycznego pola \vec{B}_0 otrzymujemy rozwiązania analogiczne do tych przedstawionych we wzorach (22), czyli wektor namagnesowania \vec{M} wykonuje precesję dookoła osi z (pola \vec{B}_0) z częstotliwością Larmora ω_0

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad (30)$$

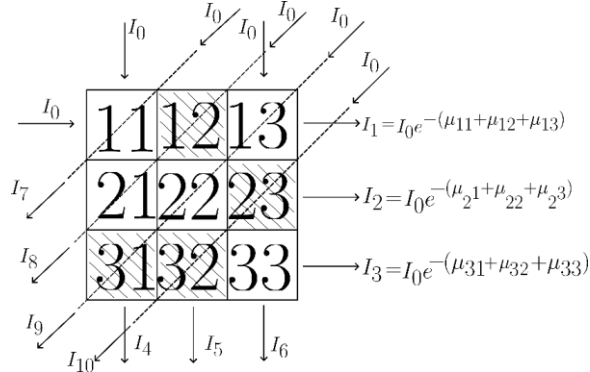
6. Rentgenowska tomografia komputerowa

Technika NMR obrazowania próbek przypomina technikę tomografii rentgenowskiej. W tej tomografii obiekt dzielony jest na warstwy, które są dzielone z kolei na woksele, tzn. obszary w kształcie prostopadłościanu o podstawie piksel \times piksel i wysokości równej grubości warstwy (rys. 5b). Piksel ma rozmiary od 0,1 mm do 1 mm. Po okręgu w płaszczyźnie warstwy przemieszczany jest układ lampa rentgenowska–detektor – leżące naprzeciw siebie (rys. 5a).



Rysunek 5. Obraz przedstawiający: a – zasadę tomografii komputerowej, b – podział warstwy na woksele [opracowanie własne]

W danym położeniu układu lampa–detektor detektor zarejestruje natężenie wiązki, która częściowo została pochłonięta przez tkankę na drodze lampa–detektor. Pochłanianie jednak jest różne w różnych wokselał leżących na drodze promieniowania, ponieważ tkanka nie jest jednorodna. Różne komórki pochłaniają różnie promieniowanie rentgenowskie, np. komórki kostne pochłaniają znacznie w porównaniu z tkanką miękką co jest wykorzystywane od dawna w prześwietlaniu rentgenowskim (np. złamanych kości). Jeżeli jednak zdołamy określić współczynnik pochłaniania pojedynczego pikselu, to zobrazujemy skład rozważanej warstwy, ponieważ współczynniki pochłaniania są dobrze znane dla wszystkich rodzajów tkanek. Poprzez pomiar pochłaniania w różnych kierunkach otrzymujemy układ równań, z których można wyznaczyć nieznane współczynniki pochłaniania we wszystkich pikselach. Pomiar natężenia promieniowania w danym kierunku nazywa się projekcją. Dla każdej projekcji można ułożyć zestaw równań z nieznanymi współczynnikami pochłaniania w wokselał. Każdy wokselał ma swój numer (ij), dlatego współczynnik pochłaniania w danym wokselał numerujemy wskaźnikami wokselał: μ_{ij} . Metodę ilustruje rysunek 6, gdzie warstwa tkanki składa się z 9 wokselał.



Rysunek 6. Przykładowe pomiary projekcji dla warstwy składającej się z 9 wokselał [opracowanie własne]

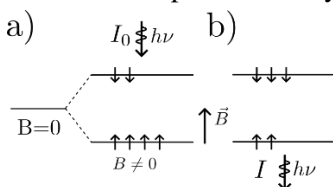
Otrzymany układ równań rozwiązujemy numerycznie. W realnych przypadkach ilość równań sięga tysięcy. Jest ich więcej niż wokselał, np. 256×256 . Współczynnik pochłaniania dla różnych tkanek normuje się do współczynnika pochłaniania wody, czyli podaje się je w skali Hunsfieldda. W ten sposób można uzyskać różne odcienie szarości pikseli, które zebrane razem tworzą przejrzysty obraz obiektu.

7. Jądrowy rezonans magnetyczny

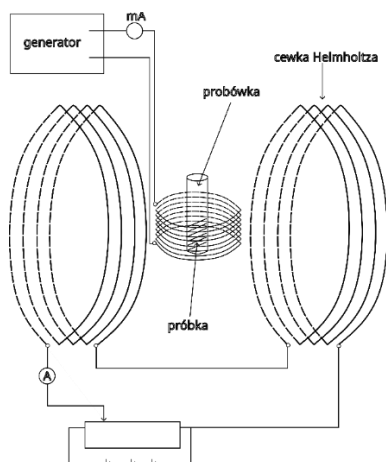
7.1. Jądrowy rezonans magnetyczny fali ciągłej

W jądrowym rezonansie magnetycznym układem pochłaniającym promieniowanie jest układ spinów (np. pochodzących od jąder wodoru, czyli układ spinów protonów). Wodór w tkankach jest zwykle w postaci związanej (np. H_2O lub molekule organiczne, jak wszelkiego rodzaju węglowodory). Ilość protonów jest różna w różnych tkankach. Zatem ilość pochłoniętego promieniowania zależy od tkanki. Układ spinów może pochłoniąć promieniowanie, jeżeli zostanie umieszczony w polu magnetycznym. Wtedy poziom energetyczny rozszczepia się na dwa: dla spinów skierowanych w kierunku pola i dla spinów skierowanych przeciwnie do pola (rys. 7a). Większość spinów jest w stanie o niższej energii w danej temperaturze. Wielkość rozszczepienia zależy od wielkości pola magnetycznego. Jeżeli teraz na układ padnie promieniowanie elektromagnetyczne monochromatyczne, którego energia równa się różnicy energii poziomów, to promieniowanie to zostanie pochłonięte. Im więcej spinów (np. protonów) będzie w próbce, tym pochłanianie będzie większe. Spiny zostaną odwrócone i „przejdą” na poziom o wyższej energii, tak jak na rysunku 7b. Aby absorpcja nastąpiła, wielkość rozszczepienia musi odpowiadać energii promieniowania elektromagnetycznego. Czyli musimy dopasować wielkość pola magnetycznego do częstotliwości promieniowania lub odwrotnie – dopasujemy częstotliwość do stałego pola magnetycznego o indukcji B_0 . Dlatego takie pochłanianie nazywamy rezonansowym.

Zjawisko rezonansu magnetycznego obserwujemy za pomocą spektrometrów NMR. Schemat najprostszego spektrometru NMR przedstawiony jest na rysunku 8.



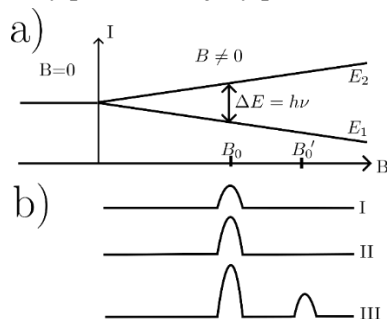
Rysunek 7. Rozszczepienie energii spinów w polu magnetycznym (a) i absorpcja promieniowania elektromagnetycznego (b) [opracowanie własne]



Rysunek 8. Schemat ideowy spektrometru NMR [opracowanie własne]

Zewnętrzne pole magnetyczne wytwarzane jest przez cewkę Helmholtza. Wewnątrz tej cewki umieszczona jest druga cewka wytwarzająca zmienne pole elektromagnetyczne wysokiej częstości. Pole to jest prostopadłe do pola magnetycznego B_0 . Wewnątrz cewek umieszczona jest próbka z próbką. Jeżeli wielkość pola B_0 zwiększymy potencjometrem, tak aby różnica poziomów była równa energii promieniowania elektromagnetycznego, to nastąpi pochłonięcie energii tego pola, które objawi się np. zwiększeniem prądu układu zasilającego generator.

Zazwyczaj pole zewnętrzne zmienia się w sposób ciągły liniowy i zmianę tę podaje się na oś x plotera. Na oś y podaje się wielkość pochłoniętej energii. Wtedy przy odpowiedniej wartości B otrzymamy pik oznaczający pochłonięcie rezonansowe (rys. 9).



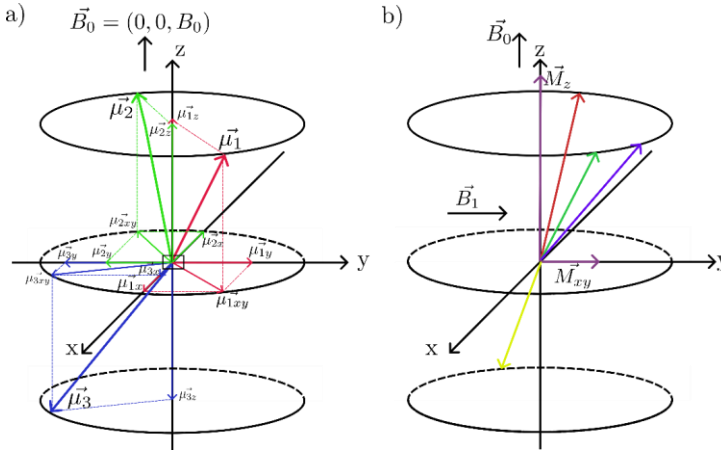
Rysunek 9. Obraz przedstawiający: a) absorpcja promieniowania $h\nu$ przy odpowiedniej wartości pola magnetycznego B , b) widmo NMR [opracowanie własne]

Wykres I umieszczony pod układem xy na rysunku 9 nazywamy widmem NMR, a pik na nim nazywamy linią widma albo sygnałem NMR. Jeżeli próbka składa się z większej ilości spinów, to linia będzie miała większe natężenie, czyli będzie wyższa (widmo II). Jeżeli próbka zawiera dodatkowo inne spiny o tym samym czynniku γ , to sygnał od tych spinów pojawi się w innym miejscu, czyli przy innym polu rezonansowym B_0' (widmo III).

8. Impulsowy rezonans jądrowy

8.1. Czasy relaksacji podłużnej i poprzecznej

W badanej próbce czy w wybranym worteksie jest wiele spinowych momentów magnetycznych (pochodzących od jądrowych momentów pędu). Są one zorientowane chaotycznie w przestrzeni. Suma wektorowa tych wszystkich momentów jest magnetyzacją (namagnesowaniem \vec{M}). Po przyłożeniu pola magnetycznego magnetyzacja \vec{M} nie wykonuje precesji wokół tego pola, ale ustawia się równoległe do tego pola. Dzieje się to dlatego, bo po przyłożeniu pola B_0 składowe μ_x μ_y wszystkich momentów jądrowych precesujących chaotycznie redukują się w płaszczyźnie xy , a jedynie składowe μ_z leżą dokładnie w kierunku pola, więc dodają się (rys. 10a). Zatem namagnesowanie ma składowe $\vec{M} = (0, 0, M_z)$.



Rysunek 10. Precesja wielu protonów w polu magnetycznym: a – precesja nieskorelowana, b – precesja skorelowana [opracowanie własne]

Porządkowanie dipoli w kierunku z nie jest procesem natychmiastowym. Zmianę magnetyzacji w czasie opisuje równanie różniczkowe

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = -\frac{M_z(t) - M_0}{T_1} \quad (31)$$

Rozwiązaniem jest funkcja eksponentialna charakteryzowana czasem T_1 , zwanym czasem relaksacji podłużnej, opisującym szybkość ustawiania się dipoli wzdłuż osi z .

$$M_z(t) = M_0 [1 - \exp(-\frac{t}{T_1})] \quad (32)$$

Układ spinów całkowicie chaotycznych ma wyższą energię (entropia wyższa) niż układ składający się z choćby częściowo uporządkowanych spinów. Dlatego układ oddaje energię do otoczenia podczas procesu porządkowania. W przypadku kryształów otoczeniem tym jest sieć krystaliczna, dlatego czas relaksacji T_1 nazywa się także czasem relaksacji spin-sieć.

Po przyłożeniu dodatkowego pola B_1 o częstotliwości zbliżonej do rezonansowej, prostopadłego do B_0 , ruch precesyjny momentów magnetycznych staje się koherentny i pojawia się pewne namagnesowanie \vec{M}_{xy} w płaszczyźnie xy (rys. 10b).

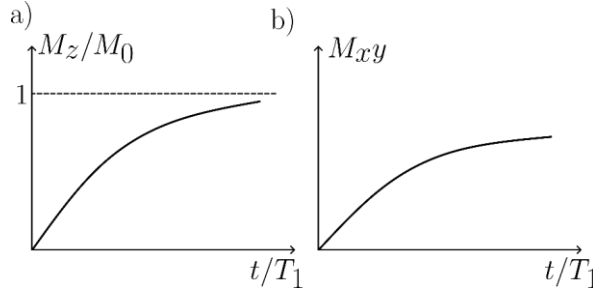
Powstanie magnetyzacji \vec{M}_{xy} nie jest procesem natychmiastowym. Równanie opisujące zmianę tej magnetyzacji w czasie i rozwiązanie tego równania można zapisać jako:

$$\frac{dM_{xy}}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2} \quad (33)$$

$$M_{xy} = M_0 \exp(-\frac{t}{T_2}) \quad (34)$$

Występujący tutaj czas T_2 nazywa się czasem relaksacji poprzecznej (płaszczyzna xy) lub czasem relaksacji spin-spin, bo jest czasem ustalania się równowagi w układzie spinów.

Zależność magnetyzacji \vec{M}_z i \vec{M}_{xy} od czasu przedstawia rysunek 11.



Rysunek 11. Zależność magnetyzacji podłużnej (a) i poprzecznej (b) od czasu [opracowanie własne]

Równanie Blocha jest ogólnym równaniem różniczkowym opisującym zmianę magnetyzacji, ujmującym zjawiska relaksacyjne:

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B}) - \hat{i} \frac{M_x}{T_2} - \hat{j} \frac{M_y}{T_2} - \hat{k} \frac{M_z - M_0}{T_1} \quad (35)$$

Jest to podstawowe równanie w teorii rezonansów magnetycznych. Rozwiązania tego równania można znaleźć w rozdziale I monografii [6].

8.2. Wirujący układ odniesienia

Wygodnie jest analizować dynamikę wektora $\vec{\mu}$ w układzie wirującym, wokół osi z z prędkością kątową ω . Równania ruchu tego wektora w układzie stałym i wirującym są podobne:

$$\frac{1}{\gamma} \frac{d\vec{\mu}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad (36)$$

$$\left(\frac{d\vec{\mu}}{dt} \right)_{\text{wir}} = \gamma \vec{\mu} \times \left(\vec{B}_0 + \frac{\vec{\mu}}{\gamma} \right) \quad (37)$$

W wirującym układzie pojawia się dodatkowe pole ω/γ .

Jeżeli ω jest równe częstości Larmora

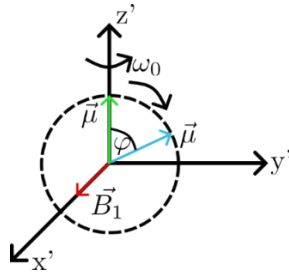
$$\omega = \omega_0 = -\gamma B_0 \quad (38)$$

wtedy wyrażenie w nawiasie po prawej stronie równania 37 jest równe zero i dla obserwatora związanego z układem ruchomym wektor $\vec{\mu}$ jest stały w czasie. Co więcej, jeżeli na układ pada poprzeczna do pola B_0 (np. w kierunku x) fala elektromagnetyczna z częstością rezonansową, czyli ω_0 , to dla tego obserwatora, w układzie ruchomym, wektor magnetyczny \vec{B}_1 tej fali też będzie nieruchomy. Wtedy wektor $\vec{\mu}$ będzie precesował wokół tego wektora \vec{B}_1 w płaszczyźnie zy z częstością

$$\omega_1 = \gamma B_1 \quad (39)$$

W czasie t wektor $\vec{\mu}$ zatoczy kąt φ (rys. 12).

$$\varphi = \omega_1 t \quad (40)$$



Rysunek 12. Precesja wektora $\vec{\mu}$ w układzie ruchomym [opracowanie własne]

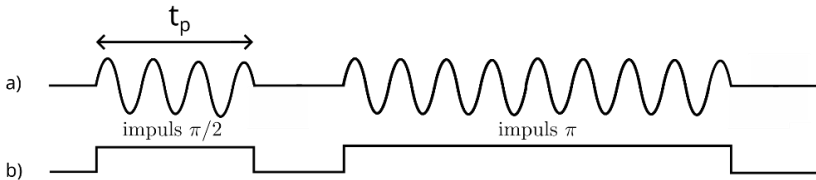
Należy zaznaczyć, że precesja ω_1 jest dużo powolniejsza od precesji ω_0 , ponieważ \vec{B}_1 jest dużo mniejsze od \vec{B}_0 .

Po wyłączeniu pola \vec{B}_1 wektor $\vec{\mu}$ wraca relaksacyjnie do położenia wyjściowego, czyli w kierunku osi z.

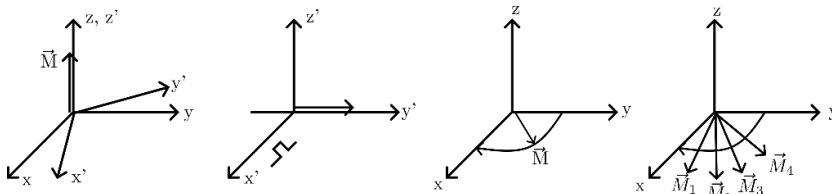
8.3. Impulsy pola mikrofalowego

Metoda jądrowego rezonansu magnetycznego na fali ciągłej nie jest zbyt czuła ze względu na duży stosunek szumów do sygnału. Taką metodą można wykryć więcej niż 10^{18} spinów. W dodatku jest mała rozdzielczość sygnałów ze względu na duże poszerzenie linii rezonansowych. Dużym postępem było opracowanie w latach 50. ubiegłego wieku metody impulsowej [8]. W metodzie tej stosuje się impulsy pola magnetycznego \vec{B}_1 (rys. 13). Czas trwania impulsu dobiera się do rodzaju substancji i roli impulsu. Ogólnie impulsy pola w.c.z. stosuje się, aby wytrącić z położenia równowagi wektor magnetyzacji \vec{M} i skierować go np. wzdłuż osi y (rys. 14b). Jeżeli czas trwania impulsu $t = t_p$ wynosi tyle, że wektor \vec{M} obróci się o $90^\circ = \pi/2$, to impuls nazywa się impulsem $\pi/2$. Natomiast impuls π obraca wektor \vec{M} o kąt 180° .

Po obrocie o kąt $\pi/2$ impulsem t_p wektor \vec{M} leży na osi y' w układzie ruchomym, a w układzie nieruchomym wykonuje precesję w płaszczyźnie xy (rys. 14). Z upływem czasu wskutek niejednorodności pola magnetycznego B_0 wektor \vec{M} rozpada się na kilka niezależnych wektorów \vec{M}_i precesujących każdy z inną częstotliwością (rys. 14).



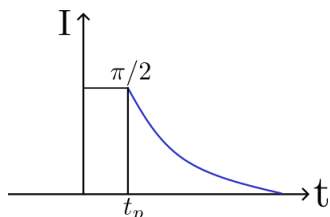
Rysunek 13. Impulsy fali elektromagnetycznej o częstotliwości ω_0 [opracowanie własne]



Rysunek 14. Precesja wektora \vec{M} wokół pola \vec{B}_1 w układzie obracającym się z prędkością kątową ω_0 [opracowanie własne]

8.4. Swobodna precesja FID (*free induction decay*)

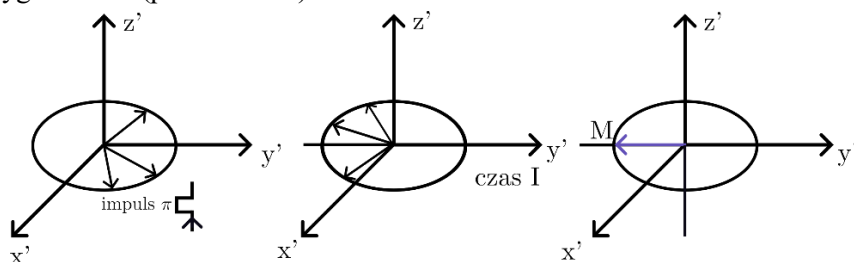
Po ustaniu impulsu $\pi/2$ wektor \vec{M} ulega „rozsypaniu” wskutek niejednorodności pola, tzn. układ traci koherencję i spiny powracają do stanu wyjściowego, czyli wzrasta składowa M_z z czasem T_1 wskutek oddziaływania spinów z siecią oraz zanika składowa M_y ze stałą czasową T_2 wskutek oddziaływania między spinami. Czas T_1 jest dłuższy niż czas T_2 . Detektor w spektrometrze rejestruje eksponencjalny zanik sygnału z czasem T_2 . Jest to sygnał PID (rys. 15).



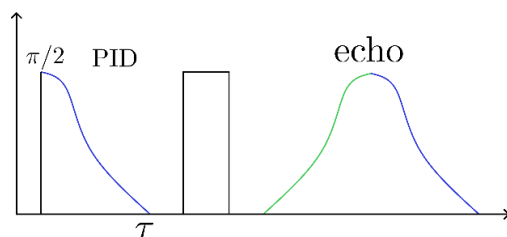
Rysunek 15. Sygnał swobodnej precesji PID [opracowanie własne]

8.5. Echo spinowe

Jeżeli po impulsie $\pi/2$ i dostatecznie długim czasie $t = \tau$ zadziałamy impulsem $\pi = 180^\circ$, to nastąpi odwrócenie kierunku precesji momentów magnetycznych, tzn. elementarne wektory namagnesowania wykonują obrót wokół osi x' o 180° . Po ustaniu impulsu π elementarne wektory namagnesowania „schodzą się” w jeden wektor \vec{M} z przyczyn takich, które powodowały ich rozsypaniu, tylko odwrotnych w działaniu, tzn. te wektory które opóźniały się z rotacją, teraz przyspieszają, a te, które przyspieszyły rotację, teraz ją opóźniły, efekt działania impulsu π przedstawia rysunek 16. Porządkowanie spinów rejestruje spektrometr w postaci linii absorpcyjnej zwanej echem spinowym (rys. 17). Linia ta jest w zasadzie złożeniem narastającego sygnału FID (lewa strona) i zanikającego sygnału FID (prawa strona).



Rysunek 16. Efekt działania impulsu π na układ elementarnych wektorów namagnesowania [opracowanie własne]



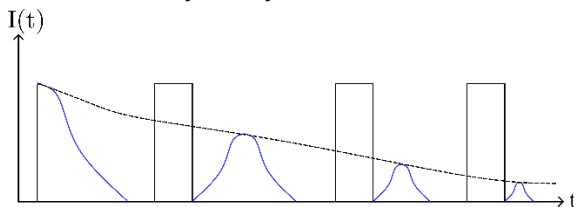
Rysunek 17. Echo spinowe [opracowanie własne]

Jeżeli po czasie τ znowu przyłożymy impuls π , to powstanie drugie echo. Na rysunku 18 przedstawiono efekt działania kilku impulsów π . Na rysunku tym obwiednia ech spinowych (linia przerywana) jest funkcją eksponentialną

$$I(t) = I_0 \exp \left[- \left(\frac{1}{T_2} + \frac{1}{3} D \gamma^2 G^2 t_1^2 \right) t \right] \quad (40)$$

gdzie: D jest współczynnikiem dyfuzji, G jest gradientem pola magnetycznego, $t = n\tau$, $n = 1, 2, \dots$, $t_1 = \tau$.

Z powyższego wzoru można wyznaczyć T_2 .



Rysunek 18. Ciąg ech spinowych [opracowanie własne]

9. Spektroskopia fourierowska w NMR

Duży postęp w spektrometrii NMR nastąpił dzięki opracowaniu algorytmu szybkiego numerycznego liczenia transformat Fouriera (FFT – *fast Fourier transform*) [9].

Transformata Fouriera daje możliwość przejścia od wyników otrzymanych w domenie czasowej na domenę częstotliwościową. W NMR w spektrometrach z falą ciągłą wynik jest w domenie częstotliwościowej, tzn. zależność absorpcji od częstotliwości fali mikrofalowej lub równoważnie od pola magnetycznego. W impulsowej technice wynik otrzymuje się w domenie czasowej (zanik sygnału w czasie). Przejście z jednej domeny w drugą zapewniają nam wzory Fouriera [10].

$$F(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} G(\omega) \exp(i\omega t) d\omega \quad (41a)$$

$$G(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} F(t) \exp(-i\omega t) dt \quad (41b)$$

Zastosowanie transformaty w spektrometrach poprawia rozdzielność widm i ułatwia ich interpretację [11].

10. Tomografia NMR

Zjawisko jądrowego rezonansu magnetycznego zostało wykorzystane w medycynie dla obrazowania narządów i tkanek. Stosuje się tutaj również metodę projekcji i rekonstrukcji obrazu – podobnie jak w tomografii komputerowej. Jednakże istnieją pewne różnice polegające na tym, że pochłanianie fali (w NMR jest to promieniowanie radiowe – pole w.cz.) może nastąpić tylko w polu magnetycznym o wartości równej polu rezonansowemu B_0 . W domenie częstotliwościowej, mając stałe pole, pochłanianie wystąpi, gdy zmieniające się pole w.cz. osiągnie wartość częstotliwości rezonansowej ω_0 . W praktyce stosowany jest wariant 1, tzn. obiekt naświetla się polem w.cz. o stałej częstotliwości, a zmienia się pole magnetyczne. Aby uzyskać projekcje warstwowe, próbkę w formie warstwy dzieli się na worteksy i umieszcza się w polu magnetycznym w płaszczyźnie xy .

10.1. Gradient pola – izolowanie warstwy

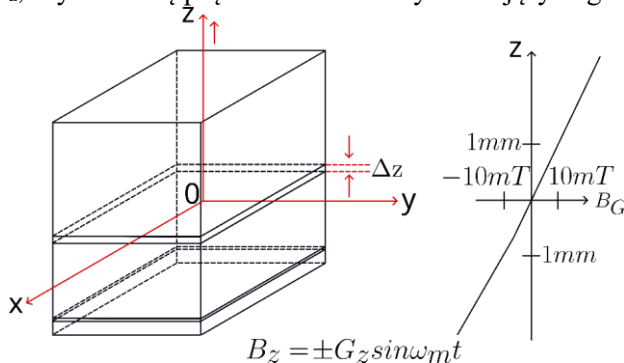
Wykonanie projekcji próbki wymaga podzielenia próbki na warstwy. W tomografii NMR określenie warstwy wykonuje się poprzez nałożenie na pole rezonansowe B_0 dodatkowego pola liniowego gradientu, np. wzdłuż osi z , jak na rys. 19. Dodatkowe pole ma modulowaną amplitudę z częstością ω_m . Sumaryczne pole wyraża się wzorem

$$B_z = B_0 \pm G_z z \sin(\omega_m t) \quad (42)$$

Dla płaszczyzny xy , dla której $z = 0$, $B_z = B_0$, a więc tam jądra są w rezonansie. W praktyce płaszczyzna ta ma określoną grubość, tj. $\Delta z \approx \omega_m / \gamma G_z$.

Sygnaly spoza tej płaszczyzny ulegają uśrednieniu do zera podczas akumulacji sygnału.

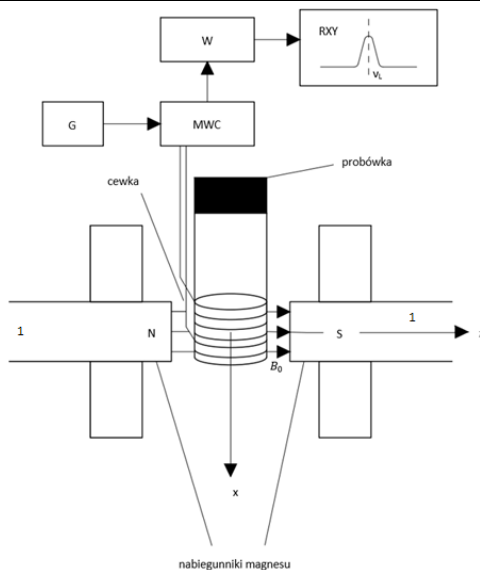
Wybrana płaszczyzna nazywa się czułą płaszczyzną i może być przemieszczana zmianą wartości G_z , czyli zmianę prądu w cewkach wytwarzających gradient pola.



Rysunek 19. Wyizolowanie warstwy za pomocą liniowego gradientu pola [opracowanie własne]

10.2. Budowa tomografu NMR

Schemat budowy spektrometru NMR przedstawia rysunek 20. Główne elementy spektrometru NMR to elektromagnes z zasilaczem i generator drgań elektrycznych w.cz. połączony z cewką indukcyjną umieszczoną między nabiegunkami elektromagnesu. Pomiary są sterowane komputerowo. W komputerze zbierane są dane pomiarowe i są one opracowywane numerycznie oraz wyświetlane w postaci widma. W spektrometrach impulsowych dodatkowo jest generator modulujący falę w.cz. w impulsy o danej amplitudzie i długości impulsu. Dodatkowo spektrometry są wyposażone w kriostat ciekłego azotu i ciekłego helu, ponieważ często sygnał NMR można otrzymać tylko w niskich temperaturach: azotowej lub helowej. Próbka umieszczana jest wewnątrz cewki w próbownicy, jeżeli próbka jest ciekła lub w stanie stałym.

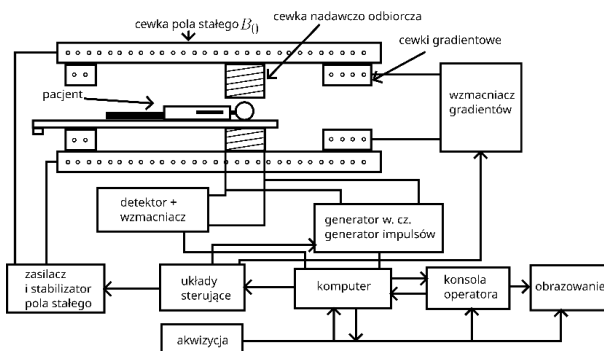


Rysunek 20. Schemat budowy spektrometru NMR, gdzie: (1) – elektromagnes wytwarzający stałe pole magnetyczne od 0 do B_0 , którego wartość zmienia się powoli, (2) – MWC – mostek wysokiej częstotliwości, (3) – G – generator, (4) – W – wzmacniacz, (5) – RXY – rejestrator XY [opracowanie własne]

Spektrometry NMR są przyrządami stosowanymi w laboratoriach naukowych fizyki, chemii lub biologii molekularnej. Próbki są małe, o objętości rzędu kilku mm^3 . Dlatego cewki i próbki są małe. W przypadku tomografu NMR obiektem badanym jest człowiek, a więc zarówno pole magnetyczne, jak i mikrofalowe wytwarzane są w dużo większej objętości. Dlatego nie stosuje się tutaj elektromagnesu, tylko cewki Helmholtza.

W spektrometrze NMR sygnał jest rejestrowany z całości próbki. Natomiast w tomografii NMR sygnał rejestrujemy w poszczególnych wokelsach. Umożliwia to nałożenie na cewki stałego pola cewek gradientowych. Jest to druga zasadnicza różnica w budowie spektrometru NMR i tomografu NMR.

Na rysunku 21 przedstawiono schemat blokowy tomografu NMR.



Rysunek 21. Schemat tomografu NMR [opracowanie własne]

Aby zapewnić jednorodny i stabilny rozkład pola magnetycznego wykorzystywany jest odpowiedni układ czterech cewek, gdzie środki ich uzwojeń znajdują się na powierzchni sfery. Odpowiedni rozkład pola magnetycznego jest szczególnie ważny, by

zapewnić jak najlepszą rozdzielczość wyników badania. Konstrukcja urządzenia powinna być symetryczna, szczególnie uwzględniając przy tym rozłożenie stałych elementów, które mogą wpływać niekorzystnie na uzyskiwane wyniki badań.

Aby wytworzyć gradient pola magnetycznego o liniowym charakterze, wykorzystywany jest odrębny zbiór cewek. Wypadkowa niejednorodnego pola uzyskanego za pomocą cewek gradientowych oraz stałe pole magnetyczne tworzą superpozycję. W tomografach NMR stosowane przeważnie są trzy wzajemnie niezależne gradienty: G_x , G_y , G_z , którymi steruje komputer. Odpowiednia konfiguracja systemu gradientów pozwala na zobrazowanie rozłożenia spinów w poszczególnych płaszczyznach podczas włączenia odpowiedniego gradientu.

11. Zastosowanie NMR w medycynie

11.1. Obrazowanie serca z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego [2]

Dzięki nieustannej poprawie jakości badań z wykorzystaniem obrazowania za pomocą rezonansu magnetycznego metoda ta coraz częściej zostaje wykorzystywana w kardiologii. Często nawet bez wymogu podania środka kontrastowego istnieje możliwość wykonania nieinwazyjnych badań dotyczących oceny wad serca czy jego funkcjonalności. Przeważnie badania takie są wykonywane, gdy standardowa echokardiografia nie jest w stanie precyzyjnie określić nieprawidłowego funkcjonowania serca.

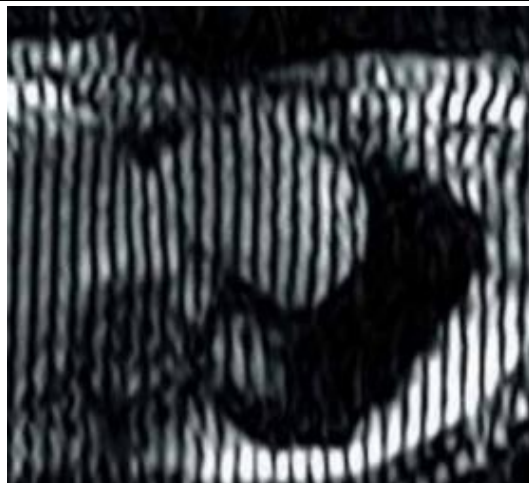
Stosowanie tego typu metody jest jednak niemożliwe w przypadku, gdy pacjent posiada zaburzenia rytmu serca, migotanie przedsionków oraz kiedy istnieją ogólne przeciwwskazania typowe dla standardowych badań rezonansem magnetycznym, takie jak: rozruszniki serca, metalowe protezy czy chociażby nawet brak współpracy pacjenta z lekarzem przeprowadzającym badanie.

Istotną jest ocena parametrów wielkościowych serca – przy schorzeniach takich jak nadciśnienie tętnicze niezbędne jest cykliczne kontrolowanie parametrów lewej komory serca – masy, wymiarów. Badania takie są wykonywane na wielu płaszczyznach, przez co oprogramowanie komputera pozwala na wyliczenie parametrów danej struktury. Szczególną cechą tego typu badania jest dobra powtarzalność, która przez konieczność wykonywania takich badań co pewien czas odgrywa w tym przypadku ważną rolę. Również w ten sam sposób można wykryć inne nieprawidłowe parametry, np. masę guzów osierdziowych.

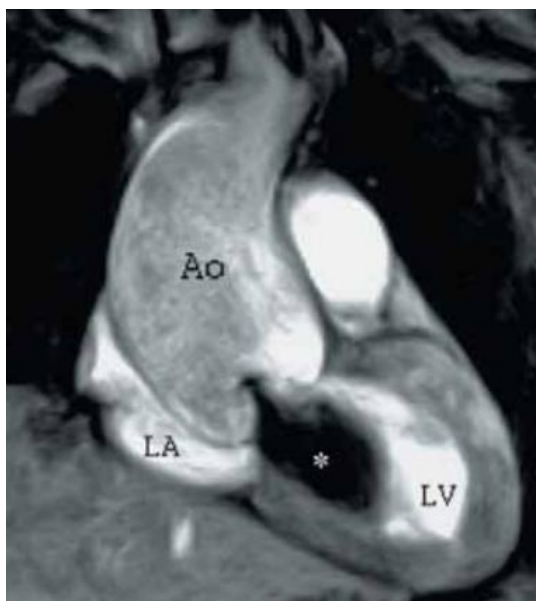
Dzięki zastosowaniu odpowiednich sekwencji pozwalających na uzyskanie wysokiej rozdzielczości czasowej możliwe jest badanie „bijącego” serca. Jest to analiza czynnościowa, za pomocą której zostaje oceniona np. objętość jam serca czy regionalna kurczliwość mięśnia lewej komory serca. Wykorzystywana technika *myocardial tagging* pozwala na podzielenie obserwowanego fragmentu na mniejsze równoległe pasma, tworząc sieć, za pomocą której wykrywano są obszary z zaburzoną kinetyką – tak jak to zaprezentowane jest na rysunku 22.

Wykorzystując sekwencję cine-GRE (rys. 23), lekarz jest w stanie zaobserwować nieprawidłowy przepływ krwi wynikający ze zwężonej lub niedomykającej się zastawki, co może prowadzić do przerostu jam serca.

Technologia cine-GRE (*gradient recaptured echo*) pozwala na obserwację wybranego wycinka obrazu w dużej ilości punktów czasowych w cyklu pracy serca. Przedrostek „cine” odnosi się do możliwości oglądania uzyskanego obrazu w „kinowej pętli”, co zwiększa możliwość funkcjonalnej oceny pracy serca.



Rysunek 22. Wykorzystanie techniki *myocardial tagging* do obserwacji patologii serca [2]



Rysunek 16. Wykorzystanie sekwencji cine-GRE, gdzie Ao – aorta, LA – lewy przeciek, LV – lewa komora, * – zaobserwowana krew, która przepływa przez niedomykalne ujście [2]

11.2. Wykorzystywanie rezonansu magnetycznego w celu zdiagnozowania padaczki [3]

Ze względu na dokładność obrazowego badania rezonansem magnetycznym możliwe jest ustalenie przyczyny pojawienia się padaczki u pacjenta. Epilepsja jest najczęściej spotykaną chorobą neurologiczną, stąd poprawna diagnoza i precyzyjna terapia jest istotną kwestią w świecie medycyny. Ze względu na padaczkę zauważalne są zaburzenia morfologiczne, a także czynnościowe obserwowane za pomocą rezonansu magnetycznego, takie jak modyfikacje w strukturze mózgu lub na podstawie jego biochemii. Gdy pacjent doświadczy ataku padaczki, należy wykonać rezonans magnetyczny w poszuki-

waniu zmian, które mogły być przyczyną tego ataku. Gdy zaobserwowane zmiany zostaną potwierdzone dodatkowymi badaniami i dokładnie zlokalizowane przy pomocy odpowiednich sekwencji, znacznie zostaje ułatwiona praca lekarzy w późniejszym planowaniu leczenia operacyjnego.

11.3. Wykorzystanie technik rezonansu magnetycznego w onkologii – badania mózgu [4]

Rezonans magnetyczny znalazł również szerokie zastosowanie w diagnozowaniu chorób nowotworowych, dodatkowo w badaniu tym pacjent nie jest narażony na promieniowanie jonizujące, tak jak ma to miejsce w innych metodach, co szczególnie jest pożądane np. w diagnostyce dzieci czy osób w ciąży. Należy jednak pamiętać, że nie jest to podstawowa metoda jaką się wykonuje w celu znalezienia procesów rozrostowych.

Dzięki temu, że tkanka mózgu jest wysoce jednorodna oraz nie generuje on artefaktów (zakłóceń obrazu) wynikających z ruchu, spektroskopia jest bardzo często wykorzystywana w badaniu tego narządu. Obrazy uzyskane za pomocą rezonansu magnetycznego porównywane są z wzorcowymi obrazami zdrowej tkanki mózgowej.

Typowymi defektami obserwowalnymi za pomocą rezonansu podczas rozwojów guzów są:

- obniżona wartość N-acetyloasparagianu, spowodowana mniejszą ilością neuronów/aksonów;
- obniżona wartość całkowitej kreatyny – traktowany jako efekt śmierci komórkowej;
- zwiększony stosunek Cho/NAA (choliny/N-acetyloasparagianu);
- zwiększona wartość mleczanów, a także lipidów, spowodowana zachodzącym procesem glikolizy w aktywnej tkance nowotworu.

Badanie rezonansem magnetycznym służy również do obserwacji tkanki poddanej leczeniu oraz operacjom, aby zapobiec postępowaniu choroby lub jej nawrotowi.

12. Wnioski

Wydaje się, że najważniejszym i najbardziej istotnym zastosowaniem pola magnetycznego w medycynie jest rezonans NMR [12, 13].

W pracy opisano spin jądra atomowego, który jest punktem wyjścia do opisu magnetycznego rezonansu jądrowego, oraz dynamikę momentu magnetycznego w polu magnetycznym. Uproszczony opis zjawisk omówionych w pracy może być cenny dla lekarzy w pracowniach diagnostycznych – w zrozumieniu istoty działania magnetycznego rezonansu jądrowego.

Magnetyczny rezonans jądrowy polega na dynamice spinów jądrowych w stałym polu magnetycznym. Dynamika spinów w polu magnetycznym jest analogicznym zjawiskiem do dynamiki bąka symetrycznego.

Dzięki spektroskopii NMR poprawia się wydajność i precyzja w diagnozowaniu chorób całego organizmu. Szczególnie przydatna jest do lokalizowania ognisk nowotworowych, zmian neurologicznych itd. Badania takie pozwalają na szybsze wykrywanie choroby, lokalizowanie ich przyczyny, a także na znacznie bardziej precyzyjne planowanie leczenia i operacji. Ze względu na rosnącą liczbę chorób cywilizacyjnych zapotrzebowanie na tego typu metody ciągle rośnie, co również skutkuje zapotrzebowaniem na wykwalifikowany personel do obsługi tego typu urządzeń.

Literatura

1. Piślewski N., Olszewski J., *Tomografia NMR, Postępy fizyki molekularnej 1*, Instytut Fizyki Molekularnej PAN, Poznań 1984.
2. Michalak J.M., Zawadzki M., Walecki J., *Rezonans magnetyczny w kardiologii*, Choroby Serca i Naczyni, 2(3), 2005, s. 142-148.
3. Kurowska K., Kimszal E., *Rezonans magnetyczny w diagnozowaniu padaczki*, Inżynier i Fizyk Medyczny, 6(5), 2017.
4. Szufliłowska B., Zastosowanie spektroskopii rezonansu magnetycznego w *diagnostyce guza mózgu*, Inżynieria Biomedyczna, 22(2), 2016.
5. Patching S., NMR-Active nuclei for biological and biomedical applications, *Journal of Diagnostic Imaging in Therapy*, 3(1), 2016.
6. Stankowski J., Hilczer W., *Wstęp do spektroskopii rezonansów magnetycznych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005.
7. Kittel C., *Wstęp do fizyki ciała stałego*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1970.
8. Hahn E.L., *Spin echoes*, *Phys. Rev.*, 80, 1950, s. 580-594.
9. Oran Brigham E., *The fast Fourier transform applications*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 1988.
10. Crocford F.S. Jr., *Fale*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1972.
11. Schweiger A., *Pulsed electron spin resonance spectroscopy: basic principles, techniques, and examples of applications*, *Angew Chem Int Eng*, 30, 1991, s. 265-292.
12. Yaqub M., Jinchao F., Arshid K., Ahmed S., Zhang W., Nawaz M.Z., Mahmood T., *Deep Learning-Based Image Reconstruction for Different Medical Imaging Modalities*, *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022.
13. Letertre Marine P.M., Giraudeau P., de Tullio Pascal, *Nuclear magnetic resonance spectroscopy in clinical metabolomics and personalized medicine: current challenges and perspectives*, *Front Mol Biosci*, 8, 2021.

Fizyczne podstawy tomografii NMR

Streszczenie

Medyczne zastosowanie jądrowego rezonansu magnetycznego (tomografia NMR) jest obecnie powszechne. Wykorzystane w tej metodzie własności magnetyczne jąder wodoru (protonów) zostały przedstawione w niniejszej pracy i porównane do własności wirującej bryły sztywnej. Pozwala to na poglądowe spojrzenie na kwantowe własności protonów. Własności te badane są metodą jądrowego rezonansu magnetycznego. W pracy przedstawiono najważniejsze problemy związane z praktycznym zastosowaniem tego złożonego zjawiska fizycznego do obrazowania tkanek lub narządów w medycynie.

Słowa kluczowe: spin w polu magnetycznym, jądrowy rezonans magnetyczny, tomografia NMR, czasy relaksacji

Physical base of NMR tomography

Abstract

The application of the nuclear magnetic resonance in medicine (tomography NMR) is wide nowadays. The magnetic properties of hydrogen nucleons were applied in this method. In this paper we describe this properties and compare them to the properties of the rotated solid body. This allows to visualize the quantum features of nucleons. Usually this features are investigated by nuclear magnetic resonance. In the paper the most important aspects of practical application of such complex phenomena, for visualization of tissue or organs in medicine, are addressed.

Keywords: spin in a magnetic field, nuclear magnetic resonance, NMR tomography, relaxation times

Indeks Autorów

Adamek E.	67
Andrzejczak-Grządko S.....	57
Boska A.....	57
Bożejewicz D.....	7
Chadryś K.	67
Cieź W.	100
Drąg M.....	179
Festinger N.....	22
Grzesik M.....	157
Janas R.	157
Jasiński T.....	179
Jońca J.	121
Kaczmar I.....	179
Karska J.....	140
Koszelska K.	22
Kowalski S.....	140
Kulbacka J.....	140
Kuzma M.	179
Laskowska B.....	110
Laskowski M.	110
Lechowicz J.	110
Lewandowska A.	110
Lewandowski T.	110
Łapińska Z.	140
Miller U.....	121
Olak-Kucharczyk M.	22
Samborska-Goik K.	39
Sensuła B.	86
Sówka I.	121
Stawiarz M.....	172
Szwedowicz U.	140
Traczyk K.....	157
Warecka M.....	67
Wiejak M.	67
Wojska A.	157
Zembrowska K.....	179