

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze

Część II



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2018

Redakcja naukowa

dr Marcin Baran, IOR - PIB

dr inż. Jędrzej Nyćkowiak, UPP

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-65677-93-8)

ISBN (wydanie online 978-83-65917-99-7)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-65917-98-0)

Ilość znaków w książce: 546 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 13.7

Data wydania: czerwiec 2018

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

Spis treści

1.	Wpływ kwasu askorbinowego na łagodzenie skutków stresu solnego u wybranych odmian pomidora (<i>Lycopersicon esculentum</i>) w kulturach <i>in vitro</i>	7
	<i>Kulik Cecylia, Bednarek Martyna, Mgłosiek Oktawia, Krupa-Mańkiewicz Marcelina</i>	
2.	Wpływ witaminy C na łagodzenie skutków stresu solnego kolcowoju pospolitego (<i>Lycium barbarum</i> L.) w kulturach <i>in vitro</i>	14
	<i>Barbara Kostusiak, Cecylia Kulik, Eryk Jaszczak, Marcelina Krupa-Mańkiewicz, Ireneusz Ochmian</i>	
3.	Wpływ zasolenia na rozwój petunii ogrodowej (<i>Petunia</i> × <i>hybrid</i>), traktowanej mutagenem chemicznym w kulturach <i>in vitro</i>	21
	<i>Barbara Kostusiak, Marzena Dymitrienko, Marcelina Krupa-Mańkiewicz</i>	
4.	Porównanie jakości owoców kilku odmian jagody kamczackiej	28
	<i>Kulik Cecylia, Kostusiak Barbara, Krupa-Mańkiewicz Marcelina, Ochmian Ireneusz</i>	
5.	Potencjalne możliwości zastosowania grzybów drożdżo-podobnych z rodzaju <i>Aureobasidium</i> wobec fitopatogennych grzybów strzępkowych	35
	<i>Bochnak Justyna, Kordowska - Wiater Monika</i>	
6.	Ocena aktywności antagonistycznej środowiskowych izolatów grzybów drożdżopodobnych z rodzaju <i>Aureobasidium</i> względem wybranych fitopatogennych grzybów strzępkowych	42
	<i>Bochnak Justyna, Kordowska - Wiater Monika</i>	
7.	Zawartość garbników w wyciągach z lawendy lekarskiej (<i>Lavandula angustifolia</i>)	51
	<i>Adaszyńska-Skwirzyńska Michalina</i>	
8.	Wpływ lawendy (<i>Lavandula angustifolia</i>) na czynność układu nerwowego	57
	<i>Adaszyńska-Skwirzyńska Michalina</i>	
9.	Zdolności adaptacyjne <i>Lactobacillus plantarum</i> na podstawie organizacji genomu	62
	<i>Gustaw Klaudia</i>	
10.	Mechanizmy adaptacyjne <i>Euryarchaeota</i> i ich potencjał biotechnologiczny	68
	<i>Gustaw Klaudia, Michalak Magdalena, Waško Adam</i>	
11.	Alkaloidy <i>Lycopodium</i>- budowa i aktywność biologiczna	74
	<i>Aleksandra Dymek, Gabriela Widelska, Dominik Straszak, Monika Drózd, Magdalena Dymek</i>	
12.	Kumaryny jako inhibitory AChE	80
	<i>Aleksandra Dymek, Gabriela Widelska, Dominik Straszak, Monika Drózd, Magdalena Dymek</i>	
13.	Biowęgiel jako alternatywne źródło materii organicznej i jego zastosowanie w rolnictwie	86
	<i>Marta Wzyńska, Marzena Mikos-Szymańska</i>	
14.	Wartość technologiczna pszenicy orkisz	92
	<i>Marta Wzyńska, Marzena Mikos-Szymańska</i>	
15.	Rynek usług agroturystycznych	99
	<i>Ewelina Surdacka</i>	
16.	Rola instytucji doradczych w funkcjonowaniu i rozwoju gospodarstw agroturystycznych	105
	<i>Krzysztof Strojny, Sylwester Walczak, Paulina Główska</i>	

17. Drób jako atrakcja w gospodarstwach agroturystycznych	112
<i>Kostiantyn Vasiukov, Kamil Drabik, Patrycja Chabroszewska, Adrian Pluta, Katarzyna Olszak, Justyna Batkowska, Antoni Brodacki</i>	
18. Rekonstrukcje paleośrodowiskowe z wykorzystaniem dewońskich palinomorf	118
<i>Kondas Marcelina</i>	
19. Fizykochemiczne właściwości nanostruktur stosowanych do transportu leków	124
<i>Ploch Anna, Pentak Danuta, Szkudlarek Agnieszka, Maciążek-Jurczyk Małgorzata</i>	
20. Piezoelektryczność w nas	131
<i>Ploch Anna, Szymczak-Mazur Lidia, Maciążek-Jurczyk Małgorzata</i>	
21. Wpływ autorytetu na posłuszeństwo i skłonności do oszustwa	139
<i>Klaudia Weronika Misiótek, Bartek Augustyn</i>	
22. Wykorzystanie leczniczych właściwości egzokannabinoidów do przywrócenia sprawności funkcjonowania procesów kognitywnych nie tylko w chorobach neurodegeneracyjnych, ale także w naturalnie starzejącym się mózgu	148
<i>Klaudia Weronika Misiótek</i>	

Przedmowa

Opracowanie przeznaczone jest dla wszystkich zainteresowanych zgłębianiem wiedzy z dość obszernego zakresu nauk przyrodniczych. Niniejsze wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” jest rezultatem współpracy w sferze naukowej, prezentujące dokonania młodych osób, które pragnęły podzielić się swoim dorobkiem naukowym z szeroką rzeszą czytelników. W serii opracowań zajmujących się dokonaniami młodych naukowców, zakres stawianych przed nimi zadań i działań ciągle rozszerza się. Nauki przyrodnicze zajmują się badaniem zachodzących zjawisk celem poznania rządzącymi nimi praw wykorzystując je dla dobra człowieka. W szybko rozwijających się naukach przyrodniczych, codziennie odkrywane są nowe zależności i powiązania z innymi obszarami nauki informujące o złożoności tej dziedziny. Obecnie utrwała się coraz bardziej i powszechniej przekonanie, że stosowanie jedynie kompleksowych badań z zakresu wszystkich dziedzin nauki, prowadzi do pełniejszego zrozumienia procesów. Konieczność znajomości zjawisk zachodzących w ówczesnym świecie wymusza na nas samych wdrożenie etapu samorozwoju poprzez zgłębienie wiedzy z wielu dziedzin nauki. Zagadnienia, którymi zajmują się badacze wymagają wykonania pewnej liczby doświadczeń. Doświadczenia te dają podstawę do wysuwania wniosków, które mogą wymagać dalszych, głębszych i wnikliwszych badań. W przyrodzie nie ma identyczności, więc uzyskane wyniki mogą być tylko pośrednimi w drodze tych badań.

Część pierwszej monografii poświęcono żywności i żywieniu, gdzie rozbito na elementy składowe, między innymi produkty mięsne, jak i drogi ich przetwarzania oraz przemian fizykochemicznych w celu wytwarzania produktów bardziej bezpiecznych i zdrowych. W drugiej części skupiono się na produkcji roślinnej, przedstawiając potencjał biotechnologiczny roślin i mechanizmy wpływu oraz ich pochodnych na życie człowieka. Wykorzystano także badania z zakresu zrównoważonego rolnictwa polepszające warunki fizykochemiczne gleby oraz roli instytucji rolniczych. W części trzeciej badania młodych naukowców ukierunkowane są w stronę zależności, roli oraz relacji grup organizmów zwierzęcych. Mowa jest tu o procesach destrukcyjnych, niedoborach oraz właściwościach struktur oraz strategiach działania jak również o stosowaniu nowych rozwiązań.

W części czwartej zgłębiane są zagadnienia nauk medycznych w oparciu o podejście do badanego procesu lub zależności ze strony genetycznej. Analizy zawierają oceny skuteczności i stabilności emulsji, olejków oraz próbek biologicznych w zastosowaniach biochemicznych przy użyciu całego spektrum metod badawczych.

Piąta z monografii zawiera rozdziały dotyczące działalności weterynaryjnej. Ukazane są tutaj zagrożenia na jakie narażeni jesteśmy ze strony zwierząt, a także całe bogactwo analiz przebiegów chorób, zaburzeń zwierząt domowych i gospodarskich. Nakreślono tu także role i genę zwierząt w symbiozie z człowiekiem.

Część szоста omawia i skupia się na oddziaływaniach wewnątrz środowiskowych. Badania zawarte w tej części opisują zależności i presję środowiska oraz powiązania składowych łańcuchów zależności biotycznych. Uwidocznione i proponowane są tutaj nowe narzędzia oceny i rozwiązania wpływające na bioróżnorodność fauny i flory.

Zespół redakcyjny ma nadzieję, że zawarte w tym opracowaniu wiadomości z zakresu nauk przyrodniczych umożliwią czytelnikom zrozumienie i zapoznanie się z wiadomościami niezbędnymi do otwarcia na wiele dyscyplin nauki oraz zjawisk zachodzących w otaczającym nas świecie. Mamy także nadzieję, że przystępność formy przypadnie Państwu do gustu i przyczyni się do propagowania dokonań młodych naukowców. Zdajemy sobie sprawę, że pełne i całkowite zrozumienie przedstawionych w zestawieniu prac o tak szerokiej tematyce jest rzeczą trudną i skomplikowaną lecz nie niemożliwą. Wszystko wymaga pewnej dyskusji wśród zainteresowanych oraz uzgodnienia własnych poglądów.

dr Marcin Baran
Instytut Ochrony Roślin - PIB

1. Wpływ kwasu askorbinowego na łagodzenie skutków stresu solnego u wybranych odmian pomidora (*Lycopersicon esculentum*) w kulturach *in vitro*

Effect of ascorbic acid to alleviate salinity stress in selected tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*) in *in vitro* cultures

Kulik Cecylia, Bednarek Martyna, Mgłosiek Oktawia, Krupa-Małkiewicz Marcelina

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

Opiekun naukowy: dr inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz

Kulik Cecylia: cyl.usia@gmail.com

Słowa kluczowe: mikrorozmnażanie, witamina C, NaCl, CaCl₂, zasolenie

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu kwasu askorbinowego (witaminy C) na łagodzenie skutków stresu solnego u wybranych odmian pomidora. Materiał badawczy stanowiły nasiona 3 odmian pomidora (*Lycopersicon esculentum*): Marzano, Ikarus i Romus. Zastosowano 9 kombinacji pożywek MS (Murashige i Skoog 1962) uzupełnionych solą NaCl i CaCl₂: w dwóch stężeniach każda (100 i 200mM) z dodatkiem/bez dodatku 1M witaminy C. Kontrolę w doświadczeniu stanowiła pożywka MS bez dodatku soli i kwasu askorbinowego. Uzyskane z nasion eksplantaty pędowe wykładano do słoików uzupełnionych 30ml pożywki i pozostawiano w fitotronie na 5 tygodni. Następnie dokonano pomiarów cech morfologicznych, tj. wysokość roślin (cm), liczba nowych pędów, długość (cm) i liczba korzeni, świeża i sucha masa (g) oraz procentowa zawartość wody. Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że dodatek 1M witaminy C do pożywki MS uzupełnionej 100mM NaCl spowodował 50% wzrost długości i liczby pędów, długości korzeni oraz świeżej i suchej masy eksplantatów odmiany Romus. U odmiany Marzano namnażanej na pożywce MS z dodatkiem 200mM soli CaCl obserwowano stymulujący wpływ witaminy C na wysokość i liczbę pędów. Kwas askorbinowy dodany do pożywki MS uzupełnionej 100mM soli CaCl₂ pozytywnie wpływał na rozwój części nadziemnych u odmiany Ikarus. Dodatek do pożywki 200mM soli CaCl₂ uniemożliwił wzrost roślin pomidora.

1. Wstęp

Pomidor jest szeroko rozpowszechnionym w uprawie warzywem jednorocznym spożywanym w większości regionów świata. Stres solny poważnie ogranicza jego wzrost i rozwój, co może przyczynić się do obniżenia ilości uzyskiwanego plonu. Pomimo jego szerokiej adaptacji do różnych warunków klimatycznych, jego produkcja skoncentrowana jest w ciepłych i raczej suchych rejonach Morze Śródziemnego i Kalifornii. W wyniku naturalnych procesów glebotwórczych w regionach tych powstają znaczne ilości soli. Zasolenie na tych terenach jest poważnym ograniczeniem. Akumulacja soli (zwłaszcza sodu) jest jednym z głównych zagrożeń fizjologicznych dla ekosystemów (Zhu 2001; Sajid i Antab 2009; Bybordi 2012; Krupa-Małkiewicz i in. 2015). Negatywny wpływ stresu solnego na swoje odzwierciedlenie w podstawowych procesach metabolicznych tj. fotosynteza, metabolizm lipidów i synteza białek. Sól w dużych ilościach kumuluje się w chloroplastach i wywiera toksyczny wpływ na fotosyntezę, destabilizując kompleksy białkowe i niszcząc barwniki fotosyntetyczne.

Roślinne kultury *in vitro* są doskonałą alternatywą metody selekcji dążącej do wytypowania genotypów tolerancyjnych w warunkach laboratoryjnych. Metody te umożliwiają otrzymanie wyników w krótkim czasie, niezależnie od warunków klimatycznych. Tolerancja roślin na stres abiotyczny w fazie siewki jest ściśle skorelowana z tolerancją rośliny dojrzałej (Rzepka-Plevneš i in. 2008)

Stąd też, celem niniejszej pracy było określenie wpływu kwas askorbinowego (witaminy C) na łagodzenie skutków stresu solnego u wybranych odmian pomidora.

2. Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono w Laboratorium Kultur Tkankowych i Komórkowych Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiałem wyjściowym do założenia doświadczenia były nasiona 3 odmian pomidora (*Lycopersicon esculentum*): Marzano, Ikarus i Romus. Pierwszą czynnością była wstępna dezynfekcja materiału nasiennego 70% roztworem alkoholu przez 30 sekund i przepłukanie dejonizowaną wodą sterylną. Następnie do dezynfekcji właściwej zastosowano 10% roztwór podchlorynu sodu (NaOCl) przez 15 minut. Po tym czasie trzykrotnie wypłukano nasiona dejonizowaną wodą sterylną.

Zastosowano 9 kombinacji pożywek MS (Murashige i Skoog 1962) uzupełnionych solą NaCl i CaCl₂: w dwóch stężeniach każda (100 i 200mM) z dodatkiem/bez dodatku 1M witaminy C. Kontrolę w doświadczeniu stanowiła pożywka MS bez dodatku soli i kwasu askorbinowego. Każdą pożywkę MS uzupełniono dodatkowo 100 mg dm⁻³ inozytoli, 8 g dm⁻³ agaru oraz 30 g dm⁻³ cukru sacharozę. Następnie słoiki z pożywkami autoklawowano przez 20 minut w 121°C i ciśnieniu 0.1 MPa.

Tab. 1. Skład pożywek

Lp.	MS	Zastosowana sól	Kwas askorbinowy
K.	+	-	-
2.	+	NaCl (100mM)	-
3.	+	NaCl (100mM)	+
4.	+	NaCl (200mM)	-
5.	+	NaCl (200mM)	+
6.	+	CaCl ₂ (100mM)	-
7.	+	CaCl ₂ (100mM)	+
8.	+	CaCl ₂ (200mM)	-
9.	+	CaCl ₂ (200mM)	+

Po uzyskaniu z nasion eksplantatów pędowych, jednowęzłowe fragmenty (1cm) pędów wykładano po 4 do słoików uzupełnionych 30ml pożywki, w 6 powtórzeniach. Kultury inkubowano w pokoju wzrostowym, w świetle białym, w temperaturze 25°C i zastosowano fotoperiod: 16 godzin światła i 8 godzin ciemności. Po 5 tygodniach dokonano pomiarów cech morfologicznych takich, jak: wysokość roślin (cm), liczba nowych pędów na roślinie, długość (cm) i liczba korzeni, świeża i sucha masa (g) oraz procentowa zawartość wody oraz dokonano dokumentacji fotograficznej.

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie z wykorzystaniem dwuczynnikowej analizy wariancji testem Tukey'a. Istotność różnic oznaczono na poziomie istotności $\alpha=0.05$.

3. Wyniki i dyskusja

Konwencjonalne strategie hodowli roślin w celu przezwyciężenia negatywnych skutków zasolenia mają ograniczoną efektywność. Jedną ze skutecznych metod łagodzenia stresu solnego u roślin jest zastosowanie nieenzymatycznego przeciwutleniacza, którym jest kwas askorbinowy (witamina C) (Bybordi 2012; Agami 2014). Kwas askorbinowy jest kumulowany w różnych częściach roślin jednak jego najwyższą koncentracją charakteryzują się liście. Oprócz właściwości antyoksydacyjnych witamina C indukuje także syntezę białek odporności na stresy i innych

komponentów obrony chemicznej. Związek ten jest szeroko stosowany do przeciwdziałania negatywnym wpływom zasolenia u roślin (Sajid and Aftab 2009; Bybordi 2012; SaeidiSaret al. 2013; Agami 2014). W niniejszych badaniach dokonano porównania reakcji 3 odmian pomidora narażonych na stres solny w interakcji z 1M kwasu askorbinowego. W trakcie badań zaobserwowano zwiększoną toksyczność soli CaCl_2 . Rośliny wyłożone na pożywkę z dodatkiem tego związku w stężeniu 200mM nie podjęły wzrostu mimo zastosowania kwasu askorbinowego, stąd też próba ta została wyeliminowana z doświadczenia na początku prowadzenia badań.

Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, że dodatek soli niezależnie od jej rodzaju jak i stężenia miał negatywny wpływ na takie cechy morfologiczne jak: wysokość roślin, liczbę nowych pędów na roślinie, długość i liczbę korzeni. W trakcie badań zaobserwowano zwiększoną toksyczność soli CaCl_2 . W doświadczeniu wykorzystano pożywki z dwoma stężeniami danej soli (100 i 200mM), z czego wyższe stężenie wykazywało zwiększoną toksyczność. Rośliny wyłożone na medium z dodatkiem tego związku w stężeniu 200mM nie podjęły wzrostu mimo zastosowania kwasu askorbinowego, stąd też próba ta została wyeliminowana z doświadczenia na początku prowadzenia badań. W przypadku stężenia 100mM najlepiej regenerowała się odmiana Romus. Średnia wysokość roślin i liczba wytworzonych nowych pędów wynosiły odpowiednio 2.71cm i 1.5. W przypadku części podziemnych wyróżniła się odmiana Marzano. Średnia liczba zregenerowanych przez pojedynki korzeni wynosiła 6.

Sól NaCl została dodana do podłoża wzrostowego również w dwóch stężeniach – 100 i 200mM. W przeciwieństwie do soli CaCl_2 we wszystkich próbach zaobserwowano procesy regeneracyjne i wzrostowe roślin. Najkorzystniejszą odpowiedź na obecność 200mM soli NaCl w podłożu wykazała odmiana Marzano. Zaobserwowano u niej najwyższe wartości wszystkich badanych cech morfologicznych (długość pędu – 2.2cm, liczba wytworzonych nowych pędów – 1.25, długość – 2.48cm i liczba korzeni – 1.13).

Wyniki pomiarów nie wykazały istotnych różnic w przypadku pomiarów części nadziemnych roślin namnażanych na pożywkach z dodatkiem 100mM NaCl . Biorąc pod uwagę części podziemne roślin znacząco wyróżniały się odmiany Marzano, w przypadku długości korzeni (9.53cm) i Romus, w przypadku liczby korzeni (9.75).

Zastosowanie kwasu askorbinowego jako elementu niwelującego skutki stresu solnego miało pozytywne odzwierciedlenie w przypadku wysokości roślin i liczby utworzonych nowych pędów. Wszystkie odmiany charakteryzowały się większą wysokością i ilością pędów, jednak wciąż wyniki te były niższe niż w przypadku próby kontrolnej. Najlepszą odpowiedź na zastosowany antyoksydant wykazała odmiana Romus. Na pożywkę z dodatkiem 100 i 200mM NaCl jej wysokość wynosiła średnio 4.56 i 1.5cm. Uzupełnienie pożywki o 1M kwasu askorbinowego spowodowało zwiększenie wyników do odpowiednio: 8.28 i 2.21cm, natomiast liczba pędów wzrosła średnio z 1.88 do 4.88 co stanowi 260% liczby pędów uzyskanych na podłożu bez dodatku witaminy C.

W większości przypadków dodatek kwasu askorbinowego do podłoża miał istotny wpływ na rozwój części podziemnej pomidorów. Regenerowane korzenie były dłuższe, jednak ich liczba była znacznie mniejsza. U odmiany Romus, w wyniku zastosowania witaminy C, regenerowane korzenie były dłuższe o ponad połowę zarówno od próby hodowanej na podłożu z dodatkiem 100mM NaCl jak i kontroli, jednak ich ilość spadła o połowę. Najlepszy wzrost na podłożu z dodatkiem 200mM CaCl_2 i 1M kwasu askorbinowego zaobserwowano u odmiany Ikarus. Średnia wysokość tych roślin wzrosła z 1.94cm do 3.15, po zastosowaniu związku łagodzącego skutki stresu solnego natomiast liczba pędów zwiększyła się o około 1.

Dodatek kwasu askorbinowego w większości prób wpłynął hamująco na liczbę regenerowanych korzeni, natomiast stymulująco na ich długość. Może to być wynikiem dążenia rośliny do głębszych warstw podłoża w celu odnalezienia niszy wykazującej mniejsze zasolenie, stąd długie, ale mało rozbudowane korzenie. Najdłuższe korzenie w relacji z witaminą C wykształciła odmiana Romus (100mM NaCl – 16.94cm, 100mM CaCl_2 - 6cm). Największą redukcję ilości korzeni zaobserwowano u odmiany Marzano. W przypadku 100mM soli NaCl ich liczba spadła z 4.13 do 3.5, w przypadku 200mM NaCl z 1.13 do 1 a na podłożu z dodatkiem 100mM CaCl_2 z 6 do 2.75.

Tab. 2. Wpływ kwasu askorbinowego na łagodzenie skutków stresu solnego u wybranych odmian pomidora.

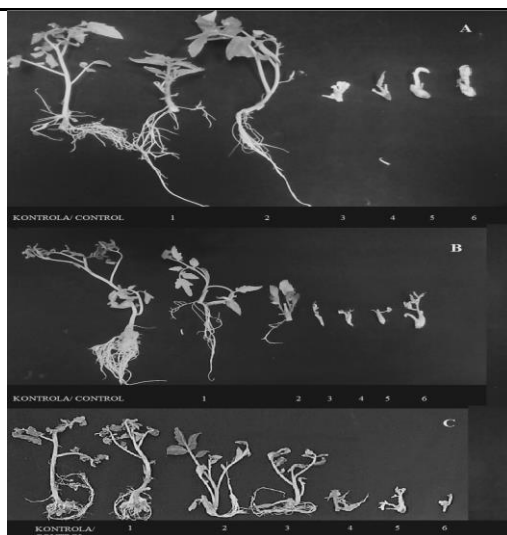
ODMIANA / CULTIVAR	POŻYWKA / MEDIUM							ŚREDNIA / AVERAGE
	MS	MS+ 100m M NaCl	MS + 100mM NaCl + kwas askorbi- nowy	MS + 200m M NaCl	MS + 200mM NaCl + kwas as- korbi- nowy	MS + 100m M CaCl ₂	MS + 100mM CaCl ₂ + kwas askorbi-nowy	
	DŁUGOŚĆ PĘDU (cm) / SHOOT LENGTH (cm)							
IKARUS	11.74	4.93	5.15	2.08	2.04	1.94	3.15	4.43
ROMUS	11.94	4.56	8.28	1.5	2.21	2.71	3.41	4.94
MARZANO	11.03	4.72	4.93	2.2	3.94	2.3	2.6	4.53
ŚREDNIA / AVERAGE	11.57	4.74	6.12	1.93	2.73	2.32	3.05	
NIR α 0.05/ LSD α 0.05	NIRI=3.30, NIRII=39.36, NIRI/II=6.89							
	LICZBA PĘDÓW / SHOOT NUMBER							ŚREDNIA / AVERAGE
IKARUS	3.25	1.88	2.63	1.25	1.38	1.25	1.88	1.93
ROMUS	4.75	1.88	4.88	1.13	1.13	1.5	1.75	2.43
MARZANO	1.88	1.63	2.00	1.25	1.88	1.5	1.5	1.61
ŚREDNIA / AVERAGE	3.29	1.79	3.76	1.21	1.46	1.42	1.71	
NIR α 0.05 /LSD α 0.05	NIRI=4.72, NIRII=9.95, NIRI/II=5.89							

Zasolenie zmniejsza ilość wchłanianej przez korzenie wody poprzez osmozę, a następnie wywołuje stres wodny. Pobór wody przez roślinę jest zmniejszony wraz ze zwiększonym zasoleniem (Romero-Aranda i wsp. 2001). Al-Harbi i wsp. (2009) i Al-Omran i wsp. (2012) stwierdzili, że niekorzystny wpływ nawadniania rośliny zasoloną wodą na całkowitą suchą masę i całkowity plon świeżych pomidorów wynika z ograniczenia efektywności wykorzystania wody przez roślinę do wzrostu. Al-Karaki (2000) stwierdził spadek suchej masy pomidorów w przypadku wykorzystaniu wody o zwiększonym stężeniu soli. Jednak efektywność wykorzystania wody jest stała w zakresie zasolenia pomiędzy 4.7 do 9.1 dS m⁻¹ (Van Os, 2001; Reina i in., 2005). Ta różnica, oprócz typu użytego pomidora, może być przypisana innym czynnikom, w tym warunkom klimatycznym.

W badaniach własnych zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia soli w podłożu stopniowo spadała procentowa zawartość wody w roślinach pomidora odmiany Ikarus oraz Marzano, w porównaniu do kontroli (Tab. 3). Przy czym, u roślin odmiany Marzano na pożywce z dodatkiem 100 mM soli CaCl₂ obserwowano najwyższy spadek zawartości wody (o 8.66% w porównaniu do roślin z pożywki kontrolnej). Natomiast u odmiany Romus wraz ze wzrostem stężenia soli w podłożu wzrosła również zawartość wody. Najwyższą zawartość procentową wody u tej odmiany obserwowano na pożywce MS uzupełnionej 100 mM soli NaCl (11.63%). Można zatem przypuszczać, że rośliny odmiany Romus wykazują podwyższoną tolerancję na zastosowany stres solny. Podobne do badań własnych obserwacje opisali El-Tayeb (2005), Agami (2014) oraz Krupa-Malkiewicz i in. (2015), którzy w swoich badaniach również zaobserwowali, że działanie stresu solnego powoduje znaczną redukcję świeżej i suchej masy pędów i korzeni u badanych roślin.

Tab. 3. Wpływ kwasu askorbinowego na łagodzenie skutków stresu solnego u wybranych odmian pomidora.

ODMIANA / CULTIVAR	POŻYWKA / MEDIUM							ŚREDNIA / AVERAGE
	MS	MS+ 100mM NaCl	MS + 100mM NaCl + kwas askorbinowy	MS + 200mM NaCl	MS + 200mM NaCl + kwas askorbinowy	MS + 100mM CaCl ₂	MS + 100mM CaCl ₂ + kwas askorbinowy	
	DŁUGOŚĆ KORZENI (cm) / ROOTS LENGTH (cm)							
IKARUS	8.26	2.66	5.76	0	0	0	0	2.38
ROMUS	7.23	5.75	16.94	0	0	5	6	5.85
MARZANO	11.44	9.53	6.1	2.48	1.38	3.91	4.19	5.58
ŚREDNIA / AVERAGE	8.98	5.98	9.6	0.83	0.46	2.97	3.39	
NIR α 0.05/LSD α 0.05	NIRI=23.27, NIRII=47.76, NIRI/II=22.25							
	LICZBA KORZENI / ROOTS NUMBER							ŚREDNIA / AVERAGE
IKARUS	19.63	2.25	2.13	0	0	0	0	3.43
ROMUS	13.63	9.75	5.63	0	0	0.38	2	4.48
MARZANO	12.13	4.13	3.5	1.13	1	6	2.75	4.38
ŚREDNIA / AVERAGE	15.13	5.38	3.75	0.38	0.33	2.13	1.58	
NIR α 0.05/LSD α 0.05	NIRI=7.01, NIRII=60.18, NIRI/II=21.25							



Ryc. 1. Wpływ kwasu askorbinowego na łagodzenie skutków stresu solnego u wybranych odmian pomidora: A - Romus; B - Ikarus; C - Marzano; 1 – 100mM NaCl, 2 – 100mM NaCl + 1M kwasu askorbinowego, 3 – 200mM NaCl, 4 – 200mM NaCl + 1M kwasu askorbinowego, 5 – 100mM CaCl₂, 6 – 100mM CaCl₂ + 1M kwasu askorbinowego.

Fig. 1. The influence ascorbic acid on morphological trait of selected cultivars of tomato. A - Romus; B - Ikarus; C - Marzano, 1 – 100mM NaCl, 2 – 100mM NaCl + 1M ascorbic acid, 3 – 200mM NaCl, 4 – 200mM NaCl + 1M ascorbic acid, 5 – 100mM CaCl₂, 6 – 100mM CaCl₂ + 1M ascorbic acid.

Dodatek kwasu askorbinowego do podłoża nie wpłynął znacząco na zawartość procentową wody w roślinach poddanych działaniu stresu solnego. U roślin odmiany Romus zaobserwowano spadek procentowej zawartości wody w porównaniu do roślin z pożywki bez dodatku witaminy C. Największy spadek zawartości wody zaobserwowano na pożywce z dodatkiem 200mM NaCl i 1M kwasu askorbinowego (22,16%). Wzrost zawartości wody w roślinach zaobserwowano u odmian Ikarus i Marzano. Najwyższą zawartość procentową wody u tych odmian obserwowano na pożywce MS uzupełnionej o 200mM CaCl₂ i 1M kwasu askorbinowego. Wynosiła ona kolejno: 90.53 i 83.65%.

Tab. 4. Wpływ soli NaCl, CaCl₂ i kwasu askorbinowego na świeżą i suchą masę (g) oraz zawartość wody (%) w roślinach wybranych odmian pomidora.

ODMIANA/ CYLTIVAR	PODŁOŻE/ MEDIUM						
	MS	MS+ 100mM NaCl	MS + 100mM NaCl + kwas askorbi- nowy	MS + 200m M NaCl	MS + 200mM NaCl + kwas askorbin owy	MS + 100mM CaCl ₂	MS + 100mM CaCl ₂ + kwas askorbino wy
ŚWIEŻA MASA (g)/ FRESH WEIGHT (g)							
IKARUS	1.321	0.422	0.358	0.206	0.154	0.616	0.391
ROMUS	0.864	0.663	1.226	0.155	0.252	0.613	0.590
MARZANO	0.782	0.446	0.465	0.143	0.205	0.221	0.177
NIR _α 0.05/LSD _α 0.05	NIRI=1.66, NIRII=3.29, NIRI/II=1.69						
SUCHA MASA (g)/ DRY WEIGHT (g)							
IKARUS	0.099	0.048	0.035	0.021	0.021	0.076	0.037
ROMUS	0.177	0.059	0.119	0.021	0.089	0.079	0.077
MARZANO	0.122	0.080	0.087	0.022	0.029	0.054	0.029
NIR _α 0.05/LSD _α 0.05	NIRI=0,25, NIRII=0,41, NIRI/II=0,17						
PROCENTOWA KONCENTRACJA WODY (%)/ PERCENTAGE WATER CONCENTRATION (%)							
IKARUS	92.50	88.64	90.14	89.79	86.24	87.64	90.53
ROMUS	79.51	91.14	90.27	86.74	64.58	87.15	86.97
MARZANO	84.40	82.01	81.35	84.78	86.01	75.74	83.65

4. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że dodatek 1M witaminy C do pożywki MS uzupełnionej 100mM NaCl spowodował 50% wzrost długości i liczby pędów, długości korzeni oraz świeżej i suchej masy eksplantatów odmiany Romus. U odmiany Marzano namnażanej na pożywce MS z dodatkiem 200mM soli NaCl obserwowano stymulujący wpływ witaminy C na wysokość i liczbę pędów. Kwas askorbinowy dodany do pożywki MS uzupełnionej 100mM soli CaCl₂ pozytywnie wpływał na rozwój części nadziemnych u odmiany Ikarus. Ponadto, dodatek do pożywki 200mM soli CaCl₂ całkowicie zahamował wzrost roślin pomidora namnażanych w kulturach *in vitro*.

5. Literatura

- Agami RA (2014) Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. *Biologia Plantarum*, 58, 2: 341-347
- Al-Harbi AR, Wahb-Allah MA and Al-Omran AM (2009) Effects of salinity and irrigation management on growth and yield of tomato grown under greenhouse conditions. *Acta Hort.* 807: 201-206.
- Al-Karaki GN (2000) Growth, sodium, and potassium uptake and translocation in salt stressed tomato. *J. Plant Nutr.* 23: 369-379.
- Al-Omran AM, Al-Harbi AR, Wahb-Allah MA Alwabel MA, Nadeem M and Eleter A (2012) Management of Irrigation water salinity in greenhouse tomato production under calcareous sandy soil and drip Irrigation. *J. Agric. Sci. Technol.* 14: 939-950.
- Bybordi A (2012) Effect of ascorbic acid and silicium on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and fatty acid contents in Canola exposure to salt stress. *Journal of Integrative Agriculture* 11(10):1610-1620.
- El-Tayeb MA (2005) Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation* 45:215-224.
- Krupa-Mańkiewicz M, Smolik B, Ostojski D i in. (2015) Effect of ascorbic acid on morphological and biochemical parameters in tomato seedling exposure to salt stress. *Environmental, Protection and Natural Resources* 26(2):1-5
- Reina SA, Romero-Aranda R and Cuartero J (2005) Plant water uptake and water use efficiency of greenhouse tomato cultivars irrigated with saline water. *Agri. Water Management* 78: 54-66.
- Rengel Z (1992) The role of calcium in salt toxicity. *Plant Cell Environ.* 15: 625-632.
- Romero-Aranda R, Soria T and Cuartero J (2001) Tomato plant water uptake and plant water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci.* 160 (2): 265-272.
- Rzepka-Plevneš D, Krupa-Mańkiewicz M, Twardowska M i in. (2008) Variability of rye varieties and breeding strains tested for tolerance to drought in vitro cultures. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 6(2):256-271.
- Saeidi-Sar S, Abbaspour H, Afshari H, Yaghoobi SR (2013) Effects of ascorbic acid and gibberellin GA3 on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 667-677.
- Sajid ZA, Aftab F (2009) Amelioration of salinity tolerance in *Solanum tuberosum* L. by exogenous application of ascorbic acid. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 45:540-549.
- Smolik M, Kram P, Krupa-Mańkiewicz M i in. (2011) Response of tomato genotypes to salinity stress assessed at the seedling stage. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 14:17.
- Van Os E (2001) Diffusion and environmental aspects of soilless growing systems. *Italus Hortus*, 8: 9-15.
- Zhu J-K (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6(2):66-71.

2. Wpływ witaminy C na łagodzenie skutków stresu solnego kolcowoju pospolitego (*Lycium barbarum L.*) w kulturach *in vitro*

Effect of ascorbic acid to alleviate salinity stress in *Lycium barbarum L. in vitro* culture

Barbara Kostusiak⁽¹⁾, Cecylia Kulik⁽¹⁾, Eryk Jaszczak⁽¹⁾, Marcelina Krupa-Małkiewicz⁽¹⁾, Ireneusz Ochmian⁽²⁾

⁽¹⁾Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁽²⁾Katedra Ogrodnictwa, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Opiekun naukowy: dr inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz

Barbara Kostusiak: barbara.kostusiak@onet.eu

Słowa kluczowe: kwas askorbinowy, sól NaCl, goji

Key words: ascorbic acid, NaCl salt, goji

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu witaminy C na łagodzenie skutków stresu solnego kolcowoju pospolitego w kulturach *in vitro*.

Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe kolcowoju pospolitego otrzymane z ustabilizowanej kultury *in vitro*. Goji namnożono na pożywce o składzie makro- i mikroelementów według Murashige i Skoog (1962), bez dodatków roślinnych regulatorów wzrostu. Po uzyskaniu odpowiedniej do założenia doświadczenia liczby roślin, pasażowano je na pożywki MS uzupełnione solą NaCl w stężeniach: 50, 100, 150 mM oraz pożywki o takich samych stężeniach soli z dodatkiem 1 mM kwasu askorbinowego.

Najwyższy przyrost masy, długości pędu oraz najdłuższy korzeń uzyskały rośliny na pożywce MS+50 mM NaCl. Może to sugerować, że goji preferuje lekko słone podłoże. Natomiast zbyt duże stężenie soli NaCl (150mM) silnie hamowało wzrost. Rośliny na tej kombinacji pożywek były żółte i skarłowaciałe.

Dodatek do pożywki MS kwasu askorbinowego nie wykazywał istotnego wpływu na złagodzenie działania stresu solnego roślin goji.

Przeprowadzone badania wykazały, że stężenie soli NaCl ma wysoce istotny wpływ na rozwój roślin *Lycium barbarum*, a dodatek kwasu askorbinowego do pożywki selekcyjnej nie przeniósł zamierzonego efektu.

Abstract

The aim of the study was to determine the effect of vitamin C to alleviate salinity stress in wolfberry in *in vitro* cultures.

The research material was explants of wolfberry obtained from a stabilized *in vitro* culture. Goji was propagated on medium with macro- and micronutrient composition according to Murashige and Skoog (1962), without the addition of plant growth regulators. After obtaining the number of plants appropriate for the experiment, they were propagated on MS mediums supplemented with NaCl salt at concentration of 50, 100, 150 mM and medium with the same concentrations of salt solution with addition of 1 mM ascorbic acid, each.

The highest fresh mass, shoot length and the longest root was obtained on MS + 50 mM NaCl. This may suggest that goji prefers slightly salty conditions. However, the highest concentration of NaCl salt (150mM) used in the experiment, strongly inhibited growth of goji explants. Plants grown on this combination of media were yellowed and stunted.

The addition of ascorbic acid to MS medium did not significantly affected the mitigation of the salt stress of goji plants.

The study showed that the concentration of NaCl salt had a highly significant impact on the development of *Lycium barbarum* plants, and the addition of ascorbic acid to the selective medium did not transfer the intended effect.

1. Wstęp

Kolcowój pospolity (*Lycium barbarum* L.) to roślina dorastająca do 3 metrów wysokości należąca do rodziny psiankowatych. Owoce tego krzewu posiadają właściwości prozdrowotne. Zazwyczaj jagody zbiera się późnym latem i jesienią. Coraz bardziej ceniona w przemyśle spożywczym ze względu na zawartość związków chemicznych wykazujących pozytywny wpływ na zdrowie człowieka. Krzew ten jest bardzo tolerancyjny na niekorzystne warunki klimatyczne. Jednak wysoka cena jagód goji zachęca do starań nad maksymalizacją plonowania poprzez wzbogacanie gleby w czynniki poprawiające wegetację.

Dużym problemem na świecie jest uprawa roślin na terenach o dużym zasoleniu gleby. Stąd też, naukowcy coraz dokładniej badają ten problem. Duża zawartość soli NaCl w glebie dla wielu gatunków roślin stanowi poważny problem w wegetacji i plonowaniu. Dlatego też, szuka się nowych możliwości uprawy roślin w niekorzystnych warunkach glebowych.

Jedną z metod, która w szybki sposób pozwala na sprawdzenie jak roślina poradzi sobie w warunkach stresu solnego są kultury *in vitro*. Pozwalają one w szybki sposób bez względu na warunki pogodowe określić zdolność namnażania roślin w niekorzystnych warunkach środowiskowych.

Powszechnie wiadomo, iż witamina C ma pozytywny wpływ na metabolizm, odporność na stresy, jak i plonowanie roślin. Bierze ona udział w adaptacji do warunków niekorzystnych tj. stresów abiotycznych. Kwas askorbinowy w zależności od gatunku roślin, warunków rozwoju, etapów hodowli oraz stężenia ma istotny wpływ na morfologię roślin.

2. Materiał, metody badawcze i przebieg doświadczeń

Doświadczenie zostało przeprowadzone w laboratorium kultur *in vitro* Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Materiałem badawczym były eksplantaty wtórne kolcowoju pospolitego (*Lycium barbarum* L.). Zainicjowane do wzrostu eksplantaty trzykrotnie pasażowano na nowe pożywki MS w celu uzyskania pożądanej liczby roślin, niezbędnej do założenia doświadczenia.

Kolejnym etapem badań było przygotowanie pożywek MS + 1 mM wit. C, MS+ 150 mM NaCl, MS+ wit. C+ 50 mM NaCl, MS+ wit. C+ 100 mM NaCl, MS+ wit. C+ 150 mM NaCl. Eksplantaty pędowe o długości 10 – 20 mm wykładano po cztery do słoików uzupełnionych 30 ml pożywki. Każdą kombinację doświadczenia przeprowadzono w czterech powtórzeniach. Po sześciu tygodniach dokonano pomiarów cech morfologicznych tj.: długość pędu, długość najdłuższego korzenia, masę roślin. Na każdym etapie doświadczenia kontrolę stanowiła pożywka MS bez dodatków. Przygotowane pożywki poddano wcześniejszemu procesowi autoklawowania przez 19 minut w 121°C i ciśnieniu 0.1 MPa. Kultury inkubowano w fitotronie o temperaturze 24°C, 16 godzinnym oświetleniu (40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie z wykorzystaniem analizy wariancji jednoczynnikowej. Istotność różnic oznaczono na poziomie istotności $\alpha=0.05$.

3. Wyniki i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji stwierdzono, że rośliny kolcowoju pospolitego, namnażane na pożywkach o różnym stężeniu soli NaCl oraz z dodatkiem witaminy C różniły się wysoce istotnie statystycznie pod względem cech morfologicznych

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że badane eksplantaty jagody goji wykazywały wysoce istotną różnicę w długości pędów na różnych kombinacjach pożywki MS (Murashige i Skooge 1962). Rośliny podzielono na trzy grupy jednorodne. Najwyższą średnią wysokością cechowały się rośliny rosnące na pożywce MS + 50 mM NaCl (6.68 cm). Do drugiej

grupy jednorodnej -b zaliczono rośliny goji rosnącej na pożywce MS +100 mM NaCl (4.98 cm) oraz pożywki kontrolnej bez dodatki soli ani witaminy C (4.6 cm). Natomiast najniższą wysokością charakteryzowały się eksplantaty znajdujące się na pożywkach MS + witamina C + 150 mM NaCl, MS+ witamina C +50 mM NaCl, MS + witamina C+100 mM NaCl, MS+ witamina C +150 mM NaCl. (2.8 cm, 2.48 cm, 1.94 cm, 1.50 cm)

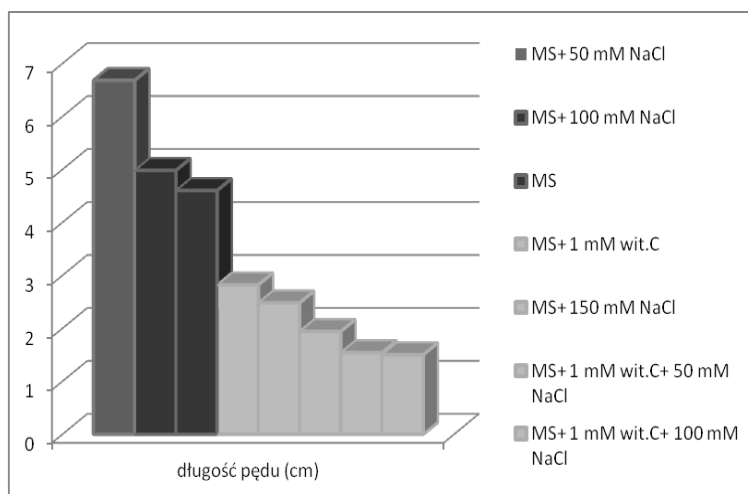
Tab. 1. Analiza wariancji dla badanych cech morfologicznych kolcowoju pospolitego namnażanego na pożywce MS w kulturach *in vitro*.

Tab. 1. Analysis of variance for studied morphological traits of common wolfberry propagated on MS medium *in vitro* cultures.

Rodzaj pożywki	Cecha morfologiczna	F empiryczne dla roślin kolcowoju pospolitego
Pożywka namnażająca	wysokość pędu	3,26**
	masa	3,30**
	długość korzenia	3,36**

* $\alpha_{0,05}$ cecha istotnie różna

** $\alpha_{0,01}$ cecha wysoce istotnie różna



Rys. 1. Średnia długość pędów eksplantatów goji (cm) na poszczególnych pożywkach MS z dodatkiem witaminy C i soli NaCl z podziałem na grupy jednorodne zaznaczone kolorami.

Fig. 1. Average length of shoots of goji explants (cm) on individual MS media with the addition of vitamin C and NaCl salt with division into homogeneous groups marked with colors.

Uzyskane wyniki badań wykazały, że długość najdłuższego korzenia eksplantatów goji była istotnie różna w zależności od zastosowanych pożywek (Tab.1, Rys.4). Średnio najdłuższymi korzeniami cechowały się rośliny rosnące na pożywce MS+50 mM NaCl (3.5 cm). W drugiej grupie jednorodnej znajdowały się rośliny z pożywek MS+ 100 mM NaCl (2.9 cm) i rośliny stanowiące kontrolę (2.74 cm). Natomiast najkrótsze korzenie wykształciły rośliny rosnące na pożywce MS+1 mM Wit.C+150 mM NaCl (0.78 cm).

Wykazano, że masa roślin istotnie różni się w zależności od rodzaju zastosowanych pożywek wzrostowych (Tab 1., Rys. 3). Średnio największą masę roślin *Lycium barbarum* obserwowano na pożywce MS+50mM NaCl i MS+100 mM NaCl (0.354 g i 0.275g, odpowiednio).W drugiej grupie jednorodnej natomiast znalazły się rośliny rosnące na pożywkach: MS, MS+150mM NaCl, MS +1

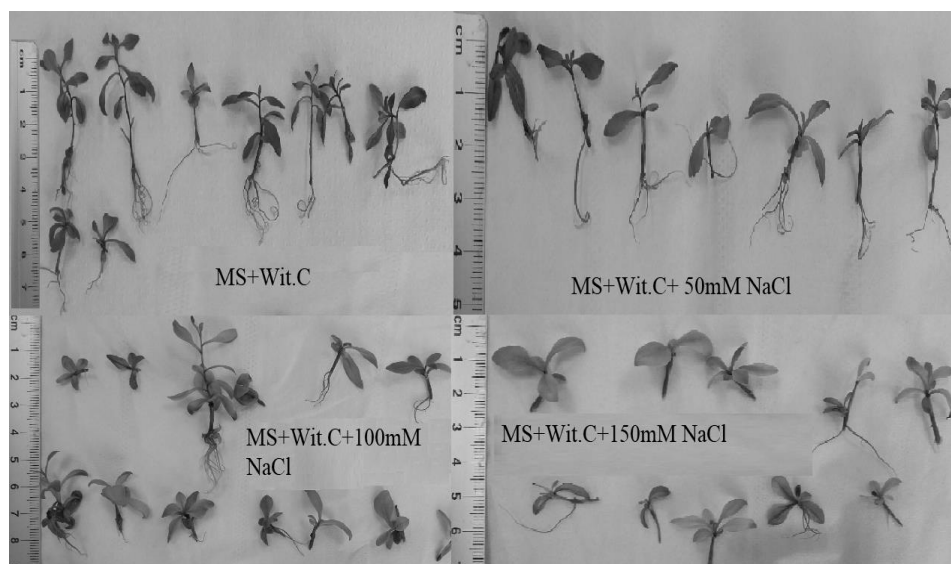
mM wit. C +150 mM NaCl, MS+1mM wit. C +100 mM NaCl, MS+1 mM wit. C, MS+ 1mM wit. C+50 mM NaCl (0.161g, 0.145g, 0.089g, 0.084g, 0.083g, 0.083g, odpowiednio).

Tab. 2. Wpływ soli NaCl z/bez dodatku witaminy C do pożywki MS na cechy morfologiczne kolcowaju pospolitego.

Table 2. Effect of NaCl salt with / without the addition of vitamin C to MS medium on morphological traits of wolfberry.

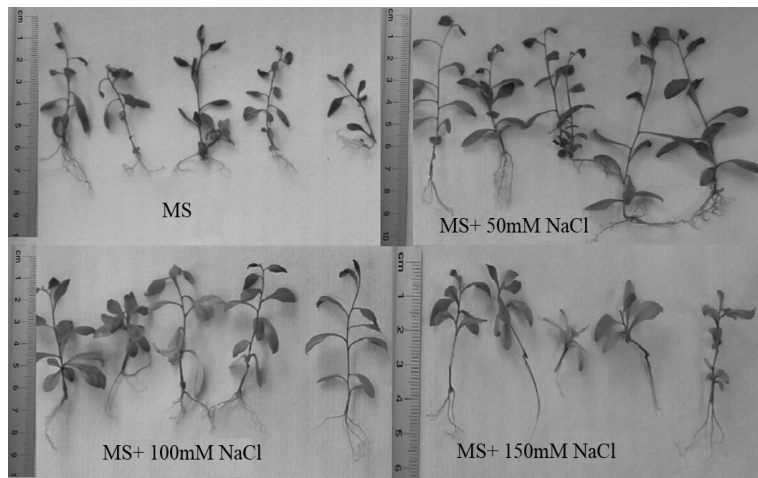
Cecha morfologiczna	Skład pożywki								Średnia
	MS	MS+1 mM Wit. C	MS+ 1 mM Wit. C+50 mM NaCl	MS+1 mM Wit. C+100 mM NaCl	MS+1m M Wit. C+150 mM NaCl	MS + 50 mM NaCl	MS+ 100m M NaCl	MS+ 150 mM NaCl	
Długość pędu (cm) (I)	6.68 b*	2.8 c	1.94 c	1.54 c	1.5 c	6.68 a	4.98 b	2.48 c	3.32
Długość najdłuższego korzenia (cm) (II)	2.74 ab	2.52 bc	2.52 bc	1.66 c	0.78 d	3.5 a	2.9 ab	2.5 bc	2.37
Masa (g) (III)	0.161 b	0.084 b	0.083 b	0.089 b	0.098 b	0.354 a	0.275 a	0.145 b	0.161
I NIR _{0.05} = 1.60 II NIR _{0.05} = 0.87 III NIR _{0.05} = 0.1									

*- średnie oznaczone tą samą literą alfabetu stanowią jedną grupę jednorodną
NIR- Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności α 0.05



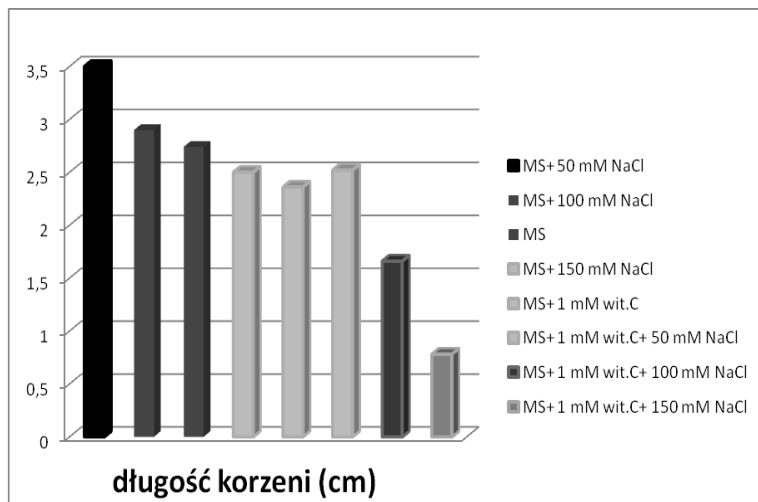
Rys. 2. Rośliny goji (*Lycium barbarum*) namnożone na pożywkach MS z dodatkiem różnych stężeń soli NaCl i 1mM witaminy C.

Fig. 2. Goji plants (*Lycium barbarum*) propagated on MS media with the addition of various concentrations of NaCl salt and 1mM vitamin C.



Rys. 3. Roślin goji (*Lycium barbarum*) namnożone na pożywkach MS z dodatkiem różnych stężeń soli NaCl.

Fig. 3. Goji plants (*Lycium barbarum*) propagated on MS media with the addition of various concentrations of NaCl salt.

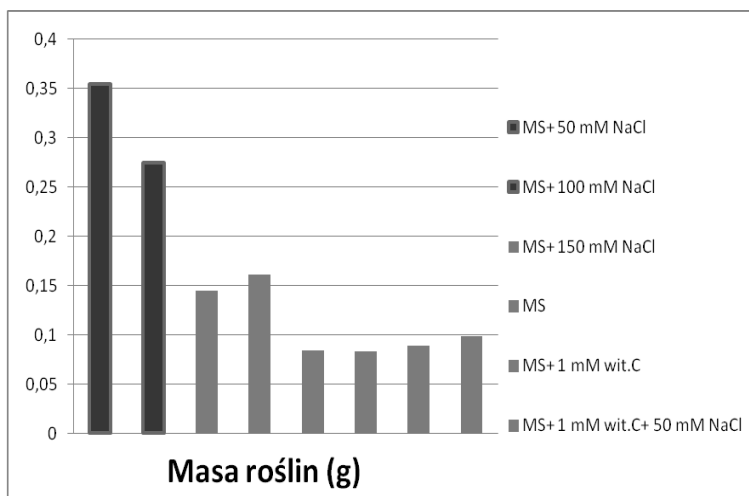


Rys. 4. Średnia długość (cm) najdłuższych korzeni roślin goji na poszczególnych pożywkach MS z podziałem na grupy jednorodne.

Fig. 4. Average length (cm) of the longest roots of goji plants on individual MS media with division into homogeneous groups.

Zasolenie jest jednym z głównych czynników stresowych w środowisku, który poważnie ogranicza wzrost i plonowanie ważnych pod względem ekonomicznym gatunków roślin (Sadak i in. 2010). Stąd też, hodowcy poszukują alternatywnych metod pozwalających na uzyskanie form o podwyższonej tolerancji na ten czynnik stresowy. Jedną z takich możliwości jest dodatek do podłoża substancji biologicznie czynnych, które mogłyby złagodzić skutki zasolenia. W literaturze przedmiotu wiele jest doniesień na temat wykorzystania witamin, jako związków mających właściwości antyoksydacyjne (Jochum i in. 2007; Agami 2014; Krupa-Mańkiewicz i in. 2015).

Witamina C jest rozpuszczalna w wodzie i może gromadzić się w różnych częściach rośliny. Jednakże, jej największe stężenie obserwuje się w liściach. Ponadto, kwas askorbinowy jest nie tylko antyoksydantem, ale również jest kofaktorem wielu reakcji enzymatycznych zachodzących na poziomie komórkowym w roślinie będącym po wpływie stresu.



Rys. 5. Średnia masa (g) roślin kolcowoju pospolitego.

Fig. 5. Average mass (g) of common wolfberry plants.

W badaniach własnych zastosowano 1 mM stężenie kwasu askorbinowego dodanego do pożywki z różną zawartością soli NaCl (0, 50, 100 i 150 mM). Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że rośliny goji wykazują pewien stopień tolerancji na zasolenie podłoża. Dodatek do pożywki MS 50 mM soli NaCl działał stymulująco na namnażanie pędów goji. Rośliny z tej kombinacji pożywek wykształciły pędy i korzenie na poziomie kontroli. Natomiast dodatek do podłoża 150 mM NaCl okazał się zbyt wysoką dawką. Rośliny wykazywały tendencję do zamierania. Natomiast dodatek kwasu askorbinowego do pożywki selekcyjnej nie wykazał istotnego wpływu na parametry morfologiczne roślin goji, namnażanych na pożywkach w warunkach stresu solnego. Można przypuszczać, że stężenie stosowanej witaminy było zbyt niskie.

Wyniki uzyskane w badaniach własnych dotyczące działania soli NaCl na eksplantaty goji są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Jones (1986). Potwierdzono w nich, że wraz ze wzrostem stężenia soli w podłożu do 100 mM maleje tolerancja roślin na ten czynnik stresowy. Badania nad reakcją roślin pomidora na stres solny prowadzili również Krupa-Małkiewicz i in. (2015). Wyniki uzyskane przez wymienionych autorów potwierdziły negatywny wpływ soli NaCl na namnażanie kultur pędowych *L. esculentum*. Natomiast dodatek kwasu askorbinowego do pożywki selekcyjnej wykazywał pozytywny wpływ na łagodzenie skutków działania stresu solnego u tych roślin. Bybordi (2012) również potwierdził skuteczność działania kwasu askorbinowego w ulepszeniu cech morfologicznych roślin *Canola* poddanych działaniu stresu solnego. Natomiast Saeidi-Sar i in. (2013) badając wpływ kwasu askorbinowego u fasoli namnażanej w warunkach o podwyższonym stężeniu soli stwierdzili, że pozytywny wpływ zastosowanej substancji biologicznie czynnej może wynikać z jej udziału w procesach związanych z namnażaniem i wydłużaniem komórek korzeni.

Podsumowując można stwierdzić, że rośliny goji charakteryzują się średnią tolerancją na zasolenie podłoża. Natomiast zastosowane stężenie kwasu askorbinowego w pożywce selekcyjnej było zbyt niskie, aby skutecznie złagodzić negatywne skutki działania soli NaCl na eksplantaty *L. barbarum* namnażane w kulturach *in vitro*.

4. Wnioski

- *Lycium barbarum* reaguje w pozytywny sposób na małe stężenie (50 mM) soli NaCl w pożywce wzrostowej. Osiąga wówczas dłuższe pędy oraz większą masę w porównaniu do kontroli (MS).
- Kwas askorbinowy nie wpłynął łagodząco na stres solny u goji. Rośliny wykazywały słabszy wzrost niż kontrola oraz rośliny z pozostałych kombinacji pożywek MS z dodatkiem soli NaCl.

5. Literatura

- Agami RA (2014) Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt in barley seedlings. *Biol Plant* 58(2):341-347.
- Altintas A, Kosar M, Kirimer N et al. (2006) Composition of the essential oils of *Lycium barbarum* and *L. ruthenicum* fruits. *Chem Nat Compd* 42:24-5.
- Amagase H, Farnsworth NR (2011) Review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Res Int* 44:1702-17.
- Bybordi A (2012) Effect of ascorbic acid and silicium on photosynthesis, antioxidant enzyme activity, and fatty acid contents in Canola exposure to salt stress. *J Int. Agric* 11:1610-1620.
- Greszta J, Gruszka A (2000) The influence of salts and hydrogen chloride on forests and urban green. *Sylwan* 3, 33–43
- Jin M, Huang Q, Zhao K et al. (2013) Biological activities and potential health benefit effects of polysaccharides isolated from *Lycium barbarum* L. *Int J Biol Macromol* 54:16-23.
- Jochum GM, Mudge KW, Thomas RB (2007) Elevated temperatures increase Leaf senescence and root secondary metabolite concentrations in the understory herb *Panax quinquefolius* (Araliaceae). *Amer. J Bot* 94:819-826.
- Kleszczewska E (2007) Biologiczne znaczenie witaminy C ze szczególnym uwzględnieniem jej znaczenia w metabolizmie skóry. *Pol Merkur Lekarski* 138 (23), 462–465.
- Kłowska K (2010) Reakcje roślin na stres solny. *Kosmos* 59:3-4:539-550.
- Krupa-Mańkiewicz M, Smolik B, Ostojski D et al. (2015) Effect of ascorbic acid on morphological and biochemical parameters in tomato seedling exposure to salt stress. *Envir. Protect. Nat. Res.* 26(2):1-5.
- Maćkowiak K, Torliński L (2007) Współczesne poglądy na rolę witaminy C w fizjologii i patologii człowieka. *Now Lek* 76 (4), 349–356
- Malepszy S (2012) *Biotechnologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 335.
- Moszczyński P, Pyć R (1999) *Biochemia witamin. Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy. Część II*. PWN, Warszawa 112–136.
- Nowak R (2004) Natura – niedoceniane źródło kwasu askorbinowego. *Post Fitoter* 1, 14–18.
- Saeidi-Sar S, Abbaspour H, Afshari H (2013) Effects of ascorbic acid and gibberellin GA3 on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Phys Plant.* 35:667677.
- Sadak M Sh, Rady MM, Badr NM et al (2010) Increasing sunflower salt tolerance using nicotinamide and tocopherol. *Int. J Academic. Res.* 2:263-270.
- Starck Z, Chołuj D, Niemyska B (1995) *Fizjologiczne reakcje roślin na niekorzystne czynniki środowiska*. Wydawnictwo SGGW.
- Tian M, Wang M (2006) Studies on extraction, isolation and composition of *Lycium barbarum* polysaccharides. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31:1603-7.
- Wang CC, Chang SC, Chen BH (2009) Chromatographic determination of polysaccharides in *Lycium barbarum* Linnaeus. *Food Chem* 116:595-603.
- Wrochna M, Gawrońska H, Gawroński S (2006) Wytwarzanie biomasy i akumulacja jonów Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻ w warunkach stresu solnego, przez wybrane gatunki roślin ozdobnych. *Acta Agrophys.* 7, 775–785.

3. Wpływ zasolenia na rozwój petunii ogrodowej (*Petunia × hybrid*), traktowanej mutagenem chemicznym w kulturach *in vitro*

Influence of salinity on the development of petunia (*Petunia × hybrid*), treated with chemical mutagen in *in vitro* cultures

Barbara Kostusiak, Marzena Dymitrienko, Marcelina Krupa-Małkiewicz

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Zachodniopomorski Uniwersytet Techniczny w Szczecinie
Opiekun naukowy: dr inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz

Barbara Kostusiak: barbara.kostusiak@onet.eu

Słowa kluczowe: EMS, *Petunia × atkinsina*, NaCl, mutageneza
Key words: EMS, *Petunia × atkinsina*, NaCl, mutagenesis

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu mutagenu chemicznego EMS na namnażanie i podwyższenie tolerancji na stres solny petunii ogrodowej 'Prism Ruby' w warunkach *in vitro*. Materiał badawczy stanowiły eksplantaty pędowe petunii otrzymane z ustabilizowanej kultury *in vitro*. Petunię namnażano na pożywce MS bez dodatków roślinnych regulatorów wzrostu. Po uzyskaniu odpowiedniej do założenia doświadczenia liczby roślin, pasażowano je na pożywki MS uzupełnione roztworem EMS w stężeniach 0.5 mM i 5.0mM. Następnie eksplantaty testowano na pożywce MS z solą NaCl w stężeniach: 25, 50, 75, 100, 150, 200 mM.

Dodatek mutagenu chemicznego EMS wpłynął w negatywny sposób na cechy morfologiczne takie jak, długość pędów i korzeni oraz liczbę pąków kwiatowych petunii 'Prism Ruby'.

Natomiast zastosowane dawki roztworu soli NaCl w stężeniach 25-75 mM nie miały wpływu na cechy morfologiczne petunii. Wyjątek stanowiło 100 mM stężenie soli NaCl, które zahamowało wzrost eksplantatów. Natomiast stężenie 200 mM NaCl działało w sposób letalny.

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of chemical mutagen EMS on the propagation and increase of tolerance to salt stress of the petunia 'Prism Ruby' *in vitro*. The research material were explants of petunia derived from a stabilized *in vitro* culture. Petunia was grown on MS medium without the addition of plant growth regulators. After obtaining the number of plants appropriate for the experiment, they were passaged on MS media supplemented with EMS at concentrations of 0.5 mM and 5.0mM. The explants were then tested on MS medium with NaCl salt at concentrations of: 25, 50, 75, 100, 150, 200 mM.

The addition of the EMS adversely affected the morphological characteristics such as the length of shoots and roots and the number of flower buds of the petunia 'Prism Ruby'.

The applied doses of NaCl salt solution in concentrations of 25-75 mM did not affect the morphological characteristics of petunia. The exception was the 100 mM concentration of NaCl salt that inhibited the growth of explants. On the other hand, the concentration of 200 mM NaCl worked in a lethal manner.

1. Wstęp

Petunia × atkinsina D. Don 'Prism Prism' określana jest jako jedna z wartościowszych odmian petunii ogrodowej. Roślina ta wyróżnia się pięknymi, okazałymi kwiatami, szeroką gamą kolorystyczną, a także dużą łatwością w uprawie. Petunię uprawia się powszechnie i wykorzystuje do dekoracji balkonów, pergoli czy werand.

Uzyskiwanie nowych odmian petunii możliwe jest między innymi dzięki zastosowaniu hodowli mutacyjnej. Pozwala ona otrzymywać kwiaty o różnych barwach, kształtach, pokrojach czy

sile wzrostu. W hodowli roślin do indukowania mutacji wykorzystuje się czynniki chemiczne oraz fizyczne. W badaniach nad indukowaną mutagenezą najczęściej stosuje się siarczan etylowo-metylowy (EMS). Jest to mutagen, charakteryzujący się wysoką efektywnością wywoływania mutacji genowych poprzez substancję nukleotydów, przy czym nie powodujący aberracji chromosomowych.

W ostatnim czasie wzrasta zainteresowanie naukowców i rolników problemem zasolenia gleb. Spowodowane jest to nasilającym się niedoborem wody słodkiej, stosowaniem słonej wody do zabiegów irygacyjnych, a także działalnością człowieka. Dlatego też na szeroką skalę prowadzi się badania, mające na celu analizę odpowiedzi roślin na stres. Wygenerowanie tolerancji na zasolenie jest fundamentalną i kluczową kwestią pod kątem produktywności rolnictwa oraz zachowania równowagi w prawidłowym funkcjonowaniu ekosystemów. Wrażliwość na zasolenie jest silnie zróżnicowana i zależna głównie od gatunku oraz miejsca bytowania roślin. Prawdziwe wyzwanie dla nauki stanowi zatem uzyskanie odmian odpornych na zasolenie dzięki transformacji na poziomie inżynierii genetycznej.

Celem badań było określenie wpływu wywołanej zmienności mutacyjnej na tolerancję roślin petunii na stres solnych w kulturach *in vitro*.

2. Materiał, metody badawcze i przebieg doświadczeń

Materiałem badawczym były eksplantaty pędowe petunii ogrodowej (*Petunia × atkinsina* D. Don.) ‘Prism Ruby’ otrzymane ze stabilnej kultury *in vitro*.

Pierwszym etapem doświadczenia było indukowanie mutacji w kulturach pędowych petunii z wykorzystaniem środka chemicznego EMS. W tym celu fragmenty pędów o długości 2 cm wykładano na pożywki według składu mikro- i makroelementów Murashige i Skoog (1962) z dodatkiem mutagenu chemicznego EMS w dwóch stężeniach 0.5 oraz 5.0 mM. Roztwory mutagenów doprowadzono wcześniej do pH 4,0 przez dodanie 0,025 Mm buforu kwasu ortofosforanowego H_3PO_4 .

Pożywki MS bez dodatku mutagenu chemicznego autoklawowano w temperaturze 121°C przy ciśnieniu 0,1 MPa przez 19 minut. Roztwór mutagenu dodawano do sterylnych pożywek MS, pod wyciągiem laminarnym zaraz po autoklawowaniu, jeszcze przed zestaleniem pożywki. Kontrolę stanowiła pożywka MS bez dodatku mutagenu chemicznego.

Doświadczenie założono w 8 powtórzeniach, wkładając po 5 roślin do słoików z odpowiednimi stężeniami mutagenu EMS. Po 6 tygodniach przeprowadzono pomiary biometryczne, oceniając: długość pędu (cm), długość korzeni (cm), liczbę korzeni, liczbę międzywęźli, liczbę pąków, liczbę liści.

Kolejnym etapem doświadczenia było pasażowanie eksplantatów pędowych petunii na pożywki MS z dodatkiem soli NaCl. Tolerancję na zasolenie określano stosując pięć stężeń soli NaCl: 25, 50, 75, 100, 200 mM. Kontrolę stanowiła pożywka MS bez dodatku soli NaCl. Doświadczenie założono w 6 powtórzeniach po 6 roślin w każdym słoiku. Po 6 tygodniach dokonano pomiarów cech biometrycznych oceniając % regeneracji roślin, liczbę pędów na roślinie, długość pędów, długość i liczbę korzeni oraz masę roślin.

Na każdym etapie doświadczenia kultury inkubowano w fitotronie o temperaturze 21 °C, 16 godzinnym oświetleniu ($40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Uzyskane wyniki badań opracowano statystycznie z wykorzystaniem analizy wariancji jednoczynnikowej. Istotność różnic oznaczono na poziomie istotności $\alpha=0.05$.

3. Wyniki

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że rośliny petunii odmiany ‘Prism Ruby’ namnożone w kulturach *in vitro* na pożywkach z dodatkiem mutagenu chemicznego EMS różniły się wysoce istotnie statystycznie pod względem badanych cech morfologicznych (Tab. 1.)

Zastosowany mutagen chemiczny wpływał istotnie na wysokość roślin petunii odmiany ‘Prism Ruby’ (Tab. 1.). Najwyższe rośliny (15.93 cm) obserwowano na pożywce MS z dodatkiem 5.0 mM EMS. Natomiast po zastosowaniu roztworu EMS w stężeniu 0.5 mM średnia długość pędu

petunii wyniosła 13.0 cm. Przy czym rośliny z pożywki kontrolnej, bez dodatku mutagenu charakteryzowały się znacznie krótszym pędem (8.2 cm) w porównaniu do pozostałych (Tab. 2)

Tab. 1. Analiza wariancji dla badanych cech petunii ‘Prism Ruby’ w kulturach *in vitro*.

Tab. 1. Analysis of variance for morphological traits of ‘Prism Ruby’ petunia in *in vitro* cultures.

CECHA TRAIT	F _{empiryczne dla petunii ‘Prism Ruby’} F _{empiric for petunia ‘Prism Ruby’}
Długość pędu Shoot length	45.80 **
Długość korzeni Root length	118.36**
Liczba międzywęźli No of internodes	9.97**
Liczba pąków No of buds	51.68**

* $\alpha_{0,05}$ - istotne różnice/ significantly different

** $\alpha_{0,01}$ - wysoce istotne różnice/ highly significantly different

Tab. 2. Wpływ mutagenu chemicznego na namnażanie petunii ‘Prism Ruby’ *in vitro*.

Tab. 2. Effect of chemical mutagen on propagation of 'Prism Ruby' petunias *in vitro*.

POŻYWKA MEDIUM	Długość pędu Shoot length [cm]	Długość korzeni Root length [cm]	Liczba międzywęźli No of internodes	Liczba pąków No of buds
MS	8.2 c*	4.05 c	6.6 b	0.8 c
MS+0.5 mM EMS	13.0 b	8.45 b	8.3 a	2.98 a
MS+5.0 mM EMS	15.93 c	9.63 a	8.25 a	1.5 b
NIR _{0.05} /LSD _{0.05}	2.49	0.30	1.30	0.67

*- średnie oznaczone tą samą literą alfabetu stanowią jedną grupę jednorodną

NIR- Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności $\alpha_{0,05}$

LSD- Least significant difference $\alpha_{0,05}$

Zastosowany mutagen chemiczny miał istotny wpływ na długość korzeni roślin petunii odmiany ‘Prism Ruby’ (Tab. 1) Najdłuższą średnią długością korzeni (9.63 cm) charakteryzowały się rośliny obserwowane na pożywce MS z dodatkiem 5.0 mM EMS. Natomiast po zastosowaniu roztworu EMS w stężeniu 0.5 mM średnia długość korzeni petunii wynosiła 8.45 cm. Przy czym, petunie z pożywki kontrolnej, bez dodatku mutagenu chemicznego EMS, charakteryzowały się znacznie krótszym korzeniem (4.05 cm) w porównaniu do pozostałych (Tab. 2).

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że EMS istotnie wpłynął na liczbę międzywęźli u roślin petunii. Największą średnią liczbą międzywęźli (8.30) cechowały się rośliny na pożywce MS z dodatkiem 0.5 mM EMS. Natomiast po zastosowaniu roztworu EMS w stężeniu 5.0 mM, średnia liczba międzywęźli roślin petunii wyniosła 8.25. Przy czym, petunie z pożywki kontrolnej charakteryzowały się mniejszą liczbą międzywęźli (6.6) w porównaniu do pozostałych (Tab. 2).

Największą średnią liczbą pąków (2.98) charakteryzowały się rośliny na pożywce MS z dodatkiem 0.5 mM EMS. Natomiast po zastosowaniu roztworu o stężeniu 0.5 mM średnia liczba pąków wynosiła 1.50. Natomiast petunie z pożywki kontrolnej wyróżniały się znacznie mniejszą liczbą pąków (0.8) w porównaniu do pozostałych (Tab. 2).

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że zastosowane stężenia soli NaCl miały statystycznie istotny wpływ na wzrost roślin petunii w kulturach *in vitro* (Tab. 1). Średnio najwyższe rośliny (6.17 cm) obserwowano na pożywce kontrolnej, bez dodatku soli. Natomiast po zastosowaniu NaCl, długość pędów petunii znacznie się różniła. Najkrótszym pędem (1.33 cm), w porównaniu do pozostałych, charakteryzowały się rośliny z pożywki MS uzupełnionej 200 mM NaCl. Dla petunii traktowanej 5.0 mM EMS zastosowana sól miała istotny wpływ na długość pędów (Tab. 4). Średnio najwyższą długością pędu cechowały się rośliny rosnące na pożywce kontrolnej (6.25 cm), najniższą zaś z dodatkiem 100 mM i 200 mM (1.50 cm).

Tab. 3. Wpływ zasolenia na cechy morfologiczne petunii 'Prism Ruby' z pożywki MS z dodatkiem 0.5 mM EMS.

Tab. 3. Influence of salinity on morphological traits of petunia 'Prism Ruby' from MS with the addition of 0.5 mM EMS.

POŻYWK A MEDIUM	Długość pędów Shoot length [cm]	Liczba pędów No of shoots	Długość korzeni Root length [cm]	Liczba korzeni No of roots	Masa rośliny Plant weight [g]	Liczba liści No of leaves	Liczba pąków No of buds
MS	6.17 a*	2.92 ab	5.25 a	2.92 a	0.63 abc	27.75 a	0.67 a
MS+25mM NaCl	2.58 b	3.17 a	4.5 b	2.33 ab	0.68 ab	23.42 abc	0.25 b
MS+50mM NaCl	2.08 c	3.17 a	4.5 c	2.0 ab	0.94 a	27.58 ab	0.17 c
MS+75mM NaCl	1.58 d	2.92 ab	0 c	0 c	0.38 bcd	18.50 cd	0.17 c
MS+100m M NaCl	1.58 d	2.83 ab	0 c	0 c	0.15 d	9.42 e	0 d
MS+200m M NaCl	1.33 d	1.67 b	0 c	0 c	0.07 d	3.61 e	0 d
NIR _{0.05} /LSD 0.05	0.49	1.43	6.0	2.58	0.31	8.65	0.74

*- średnie oznaczone tą samą literą alfabetu stanowią jedną grupę jednorodną

NIR- Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności $\alpha_{0.05}$

LSD- Least significant difference $\alpha_{0.05}$

Dodatek soli NaCl do pożywki MS miał wpływ na liczbę pędów petunii namnażanych na pożywce MS z dodatkiem 0.5 mM EMS (Tab. 4). Największą liczbę pędów (3.17) zaobserwowano na pożywce MS z dodatkiem 25 mM i 50 mM NaCl. Najmniejszą liczbę pędów (1.67), charakteryzowały się rośliny rosnące na pożywce MS z dodatkiem 200 mM roztworu soli. Dodatek soli NaCl do pożywki MS miał wpływ na długość korzeni eksplantatów petunii (Tab. 4). Największą długość korzeni (5.25 cm) obserwowano u eksplantatów na pożywce MS bez dodatku soli. Natomiast po dodaniu soli NaCl do podłoża, w stężeniu 75 mM, 100 mM i 200 mM rośliny petunii nie zawiązały korzeni. Największą liczbę korzeni petunii (2.92) zaobserwowano na pożywce kontrolnej, bez dodatku soli. Spośród zastosowanych stężeń soli, największą liczbę korzeni zaobserwowano u petunii na pożywce MS wzbogaconej w 25 mM NaCl (2.33).

Zastosowana sól NaCl wywarła wpływ na masę petunii. Największą masę (0.94 g) zaobserwowano na pożywce z dodatkiem 0.5 mM EMS (Tab. 3). Na pożywce kontrolnej masa korzeni wynosiła 0.64 g. Natomiast najniższą masę (0.07 g) cechowały się rośliny petunii rosnące na pożywce MS z dodatkiem 200 mM NaCl. Największą liczbę liści (27.75) zaobserwowano na pożywce kontrolnej, bez dodatku soli. Natomiast przy zastosowaniu NaCl, w stężeniu 200 mM średnia liczba liści była najniższa i wynosiła 3.61. Spośród stosowanych stężeń soli, najlepszym okazała się pożywka wzbogacona 50 mM roztworem soli (27.85).

Tab. 4. Wpływ zasolenia na cechy morfologiczne petunii 'Prism Ruby' z pożywki MS z dodatkiem 5,0 mM EMS.

Tab. 4. Influence of salinity on morphological traits of petunia 'Prism Ruby' from MS with the addition of 5.0 mM EMS.

POŻY WKA MEDIU M	Długość pędów Shoot length [cm]	Liczba pędów No of shoots	Długość korzeni Root length [cm]	Liczba korzeni No of roots	Masa rośliny Plant weight [g]	Liczba liści No of leaves	Liczba pąków No of buds
MS	6.25 a*	2.25 a	10.5 a	8.75 a	0.78 ab	27.62 a	0
MS+25 mM NaCl	4.25 ab	1.75 a	10.25 ab	6.00 ab	1.03 a	23.15 ab	0
MS+50 mM NaCl	1.67 b	2.00 a	3.00 bc	1.37 bc	0.57 ab	18.62 abc	0
MS+75 mM NaCl	2.00 bc	2.50 a	0.06 c	0.12 c	0.35 b	14.25 bcd	0
MS+100 mM NaCl	1.50 c	1.75 a	0 c	0 c	0.17 b	12.75 cde	0
MS+200 mM NaCl	1.50 c	1.50 a	0 c	0 c	0.09 c	2.5 f	0
NIR _{0.05} / LSD _{0.05}	2.71	1.09	6.45	5.6	0.61	9.46	0

*- średnie oznaczone tą samą literą alfabetu stanowią jedną grupę jednorodną

NIR- Najmniejsza Istotna Różnica na poziomie istotności $\alpha_{0.05}$

LSD- Least significant difference $\alpha_{0.05}$

Zastosowana sól NaCl wpływała istotnie na liczbę pąków u petunii 'Prism Ruby' namnażane na pożywce MS z dodatkiem 0.5 mM EMS (Tab. 3). Największą liczbę pąków (0.67) zaobserwowano u roślin na pożywce kontrolnej, bez dodatku soli. Natomiast dodatek soli NaCl w stężeniu 100 mM i 200 mM do pożywki zahamował rozwój pąków na roślinie. Spośród stosowanych stężeń soli, najlepszy wpływ na liczbę pąków okazała się pożywka MS wzbogacona 25 mM roztworem soli (0.25).

Wśród roślin petunii namnażane na pożywce MS z dodatkiem 5.0 mM EMS, średnio największą liczbą pędów (2.50) cechowały się rośliny rosnące na pożywce MS z dodatkiem 75 mM soli NaCl. Zaś na pożywce kontrolnej ich liczba wynosiła 2.25 (Tab. 4). U tej grupy roślin najniższą liczbą pędów (1.50) cechowały się petunie z pożywki MS z dodatkiem 200 mM NaCl. Średnio najdłuższymi korzeniami cechowały się rośliny rosnące na pożywce kontrolnej (10.50 cm). Natomiast po zastosowaniu pożywki MS z 25 mM stężeniem soli, długość korzeni była niewiele niższa i wynosiła 10.25 cm. Brak korzeni zaobserwowano u roślin na pożywce MS z dodatkiem 100 mM i 200 mM NaCl. Największą liczbą korzeni cechowały się rośliny petunii rosnące na pożywce kontrolnej (8.75). Natomiast po zastosowaniu pożywki MS z dodatkiem 25 mM soli, liczba korzeni wynosiła 6.

W przypadku masy roślin, największą wartością badanej cechy obserwowano u roślin rosnących na pożywce MS z dodatkiem 25 mM soli (1.03 g). Zaś na kontrolnej pożywce średnia masa rośliny była równa 0.78 g. Najmniejszą masę rośliny odnotowano dla petunii na pożywce MS z dodatkiem 200 mM NaCl (0.09g). Największą liczbę liści cechowały się rośliny petunii rosnące na pożywce kontrolnej (27.62). Natomiast po zastosowaniu pożywki MS z dodatkiem 25 mM soli, liczba

liści wynosiła 23.15 i była u tych roślin najwyższa. Najmniejszą liczbę liści zaobserwowano u roślin rosnących na pożywce MS z dodatkiem 200 mM NaCl (2.5). Odnotowano brak występowania pąków zarówno na pożywce kontrolnej, jak i na pożywkach MS wzbogaconych solą NaCl w różnych stężeniach.

4. Dyskusja

Petunia uznawana jest za modelowy materiał do badań, mających na celu poszerzenie zakresu jej zmienności genetycznej (Gerats i Vindenbussche 2005). Jest rośliną uprawianą, wyróżniająca się znacznymi walorami dekoracyjnymi oraz łatwością w hodowli. Prace badawcze z zakresu transformacji DNA (Hess 1969), rozwoju kwiatów (Levan 1937), a także regeneracji tkanek przeprowadzone na petunii, mają na celu poszerzenie zmienności i poszukiwanie coraz to nowszych, interesujących form. Pierwsze genetyczne i biochemiczne doświadczenia, których obiektem była petunia przeprowadzono w 1950 roku.

Jedną z dróg pozwalających poszerzyć zakres zmienności jest indukowana mutageneza. Technika ta pozwala w krótkim czasie uzyskać zmienność genetyczną, wprowadzoną następnie do nowych wariantów roślin uprawnych i ozdobnych. W literaturze przedmiotu można spotkać wiele prac dotyczących regulowania częstotliwości i intensyfikacji mutacji poprzez optymalizację dawki mutagenu (Jander i in. 2003; Menda i in. 2004).

Według Jain i Spencer (2006) stosowanie chemicznych mutagenów do generowania zmienności genetycznej, realizowane jest najczęściej, gdy przedmiot badań stanowią rośliny ozdobne. W badaniach własnych warianty otrzymano poprzez indukowanie mutacji roztworem EMS w stężeniach 0.5 mM i 5.0 mM. Mutagen ten jest bardzo popularnie wykorzystywany w badaniach naukowych (Latado i in. 2004; Berenschot i in. 2008; Wetanabe i in. 2007).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono ujemny wpływ zastosowanego mutagenu chemicznego na wysokość pędów petunii odmiany Prism Ruby. Jest to zgodne z badaniami Berenschot i in. (2008), którzy stosując roztwór EMS również otrzymali rośliny petunii o krótszych pędach.

Podobne do badań własnych dawki mutagenu EMS zastosowała Krupa-Małkiewicz (2009) u petunii. Z przeprowadzonych obserwacji wynikało, że częstotliwość zmian zależała od użytego mutagenu, jak i jego stężenia. W pokoleniu M1 największą częstotliwość zmian otrzymano stosując do indukowania mutacji EMS i MMS w stężeniach 1.5 mM i 2.0 mM, w pokoleniu M2-MMS o stężeniu 2.0 mM.

W badaniach Krupy-Małkiewicz (2009) inaczej, niż w badaniach własnych, użyty w doświadczeniu mutagen chemiczny, niezależnie od zastosowanej dawki wpłynął stymulująco na rozwój pędów, korzeni i liczby zawiązanych pąków. Natomiast w przypadku zawiązanych kwiatów, wyniki badań własnych potwierdzają opisany przez Krupę-Małkiewicz (2009), hamujący wpływ EMS na rozwój tej cechy morfologicznej.

Analizując wyniki przeprowadzonych badań własnych, dotyczących liczby pąków kwiatowych zawiązanych przez rośliny petunii, na które działało EMS w dwóch stężeniach stwierdzono, że mutagen ten może działać hamująco na rozwój pąków kwiatowych. Ponadto, biorąc pod uwagę zastosowany czynnik zasolenia, przeprowadzono analizę odpowiedzi roślin petunii na stres, w celu określenia wpływu indukowanej zmienności mutacyjnej.

Van Zandt i Mopper (2002) w pracy opisującej opóźnienia kwitnienia *Iris Hexagona* na skutek efektu zasolenia, stwierdzili silnie opóźniony rozwój pąków kwiatowych. Wysokie dawki soli NaCl jakimi były traktowane rośliny, spowolniły także szybkość otwierania się pąków kwiatowych.

Luan i in. (2006) badali wpływ mutacji indukowanej przez EMS na słodkie ziemniaki *Ipomea batatas* L. na podłożu wzbogaconym o różne stężenia soli NaCl. Określili przy tym, że stężenie soli NaCl równe 200 mM jest górną granicą selekcji, dawką letalną. Wyniki badań własnych wskazują na zamieranie roślin petunii przy stężeniu soli 200 mM, co zgodne jest z rezultatem doświadczeń Luana i in. (2006).

Stres solny do badań nad nasionami pomidora *Solanum lycopersicum* wykorzystali w badaniach Smolik i in. (2011). Stosując stężenia 50, 75, 100 i 125 mM NaCl. Stwierdzono istotny wpływ stosowanego roztworu chlorku sodu na długość korzeni, przy czym stres solny wpłynął

negatywnie na rozwój tej cechy. W przeprowadzonych badaniach własnych uzyskano podobne wyniki.

5. Podsumowanie

- Zastosowany mutagen chemiczny EMS miał negatywny wpływ na cechy morfologiczne, takie, jak: długość pędu i korzeni oraz liczbę pąków kwiatowych, u petunii 'Prism Ruby' namnażanej w kulturach *in vitro*.
- Zastosowane 200 mM stężenie soli NaCl wykazywało działanie letalne.

6. Literatura

- Berenschot AS et.al (2008). *Mutagenesis in Petunia* hibrida Vilm and isolation of novel morphological mutant. *Braz J Plant Physiol* 20:95-103.
- Jain S, Spencer MM (2006) Biotechnology and mutagenesis in improving ornamental plants. In: Teixeira da Silva, JA, Floriculture and Ornamental Viotechnology: Advances and Tropical Issues, Global Science Books 1749-2036
- Jander G, Baerson SR, Hudak JA et.al (2003) Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiol* 131: 138-146.
- Gerats T, Strommer J (2009) *Petunia: evolutionary, developmental and physiological genetics*. 2 nd ed. Springer. New York.
- Hess D (1969) Versuche zur Transformation an hohen Pflanzen. *Z. Pflanzenphysiol* 60: 348-358.
- Krupa-Małkiewicz M (2007) Zmiany fenotypowe i genotypowe u kalanchoe (*Kalanchoe hybrida*) i petunii (*Petunia × atkinsina*) wywołane mutagenami chemicznymi. Praca doktorska. Akademia Rolnicza w Szczecinie.
- Latado RR, Adames AH, Nato AT (2004) *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthem grandiflora* Tzvelv) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 103-106.
- Levan A (1937) Eine erbliche Anomalie der Samenanlage bei *Petunia* Botaniska Notiser 1: 35-55.
- Luan et.al (2006) Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomea batatas* L). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 88:77-81.
- Menda N et.al (2004) *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. *Plant J* 38:861-872.
- Smolik M et.al (2011) Response of tomato genotypes to salinity stress assessed at the seedling stage. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. Volume 14, Issue 4, Topic biology.
- Van Zadt P, Mopper S (2002) Delayed and carry effects of salinity on flowering in *Iris hexagona* (Iridaceae). *American Journal of Botany* 89:364-383.

4. Porównanie jakości owoców kilku odmian jagody kamczackiej

Comparison of the quality of fruits of several varieties of Kamchatka berries

Kulik Cecylia ⁽¹⁾, Kostusiak Barbara ⁽¹⁾, Krupa-Małkiewicz Marcelina ⁽¹⁾, Ochmian Ireneusz⁽²⁾

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

⁽²⁾Katedra Ogrodnictwa

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Opiekun naukowy: dr inż. Marcelina Krupa-Małkiewicz

Kulik Cecylia: ochir@go2.pl; cyl.usia@gmail.com

Słowa kluczowe: suchodrzew jadalny, suchodrzew siny, wzrost wegetatywny, plon

Streszczenie

Celem pracy była ocena wzrostu wegetatywnego, wielkości i jakości owoców oraz zawartości składników mineralnych w liściach i owocach ośmiu odmian jagody kamczackiej. Zbadano również wpływ stosowania zróżnicowanych nawozów azotowych na wzrost wegetatywny, plon i jakość owoców jagody kamczackiej odmiany Zielona. Oczekiwany rezultatami badań było wskazanie najlepszej odmiany pod względem plonowania i parametrów jakościowych owoców oraz ustalenie najodpowiedniejszego sposobu nawożenia roślin z tego gatunku.

1. Wstęp

W ostatnim czasie wzrasta zainteresowanie gatunkami roślin sadowniczych o działaniu prozdrowotnym. Gatunki takie są słabo znane i rzadko uprawiane na większą skalę. Jednym z takich gatunków jest jagoda kamczacka. Gatunek jagoda kamczacka uprawiany jest na skalę komercyjną w północnych, często zimnych, regionach Rosji i Japonii (Svarcova i in. 2007). Ośrodki naukowo-badawcze w Rosji, Japonii i Kanadzie zajmują się hodowlą i rozpowszechnianiem tego gatunku. Wyniki prowadzonych badań są nowe odmiany uprawne. Jagoda kamczacka znana jest w Polsce pod innymi nazwami m.in. suchodrzew jadalny, suchodrzew siny.

Gatunek ten jest odporny na niskie temperatury, które występują w polskich warunkach klimatycznych. Odporność na mrozy dotyczy zarówno części wegetatywnych jak i generatywnych roślin. Kwiaty i zawiązki są odporne na przymrozki wiosenne. Nawet spadek temperatury do -50°C nie powoduje uszkodzeń mrozowych krzewów w okresie pełnego spoczynku zimowego. Jak podaje literatura gatunek ten znosi niskie temperatury zimy sięgające do -40°C (Ochmian i in. 2010). Natomiast Kawecki i in. (2007) wskazują, że krzewy rosnące w Syberii znoszą temperaturę nawet do -50° C. Jest to także roślina, która nie jest narażona na choroby i szkodniki, co pozwala na zmniejszenie chemicznej ochrony, dzięki czemu owoce mogą być wolne od pestycydów. Krzewy tego gatunku mają niskie wymagania glebowe oraz dorastają do 2 m wysokości (Bożek i Wieniarska 2006b). Obcopolne kwiaty gatunku jagoda kamczacka są barwy żółtej lub zielonobiałej. Występują w kątach najniższych liści na pędzie, gdzie na krótkiej szypułce są dwa zwisające kwiaty długości 1,5 cm (Pierzga 2001).

Ogromnym plusem jest wczesna pora dojrzewania tej rośliny, gdyż owoce świeże są dostępne na rynku już w drugiej połowie maja. Jagody te dojrzewają znacznie wcześniej niż truskawki czy maliny. Do odmian wczesnych, dojrzewających w połowie czerwca należą: Kapel, Gołuboję Wereneto, Tomiczka, Załuszka, Łazurnaja. Odmianami o średniej porze dojrzewania są: Wasiuganskaja, Bokczrskaja, Siniaja Ptica, Pawłowska, Załuszka, Łazurnaja, natomiast odmianami późnymi są: Desertnaja, Kamczadałka (Kawecki i in. 2007). Krzewy rosyjskiej selekcji charakteryzują się dużą zmiennością. Wyróżnić można odmiany o średniej sile wzrostu takie jak: Dlinnopłodna, Czelabinka, Signoglazka, Wołoszebica (Pierzga 2001). Natomiast do odmian polskiej hodowli należą: Jolanta, Atut, Wojtek, Czarna, Zielona (Smolik i in. 2010; Werner 2005). Masa jednego owocu polskich odmian waha się między 0.88-1.03 g (Ochmian i Grajkowski 2007).

Równie ważnymi cechami dla tego gatunku są: owocowanie w pierwszym roku po posadzeniu oraz dobre plonowanie, szeroki zakres wykorzystania owoców do konsumpcji i przetwórstwa, możliwość zamrażania i suszenia owoców, wysoki stopień przyjmowania się sadzonek i łatwość namnażania sadzonek z pędów półzdrewniałych i zdrewniałych.

Owoce jagody kamczackiej zawierają substancje biologicznie czynne mające pozytywne działanie na organizmy żywe m.in. witaminę C i polifenole. Związki te mają działanie prozdrowotne. Ponadto owoce jagody kamczackiej zawierają wiele innych substancji takich jak: witamina A, żelazo, jod i miedź. Jagody charakteryzują się oryginalnym smakiem, który określany jest jako słodko-kwaśny.

Celem pracy była ocena wzrostu wegetatywnego, wielkości i jakości plonu owoców i zawartości składników mineralnych w liściach i owocach ośmiu odmian jagody kamczackiej.

2. Materiał i metody

Materiał

W roku 2010 w Sadowniczej Stacji Badawczej, posadzono krzewy kilku polskich odmian oraz dwóch odmian rosyjskiej jagody kamczackiej (*Lonicera sp.*) w glebie brunatnej właściwej zasobnej w składniki pokarmowe. Gleba została sklasyfikowana do rzędu gleb brunatnych właściwych; rodzaju pył piaszczysty (tab. 1).

Jednoczynnikowe doświadczenie założono w układzie bloków losowych. Rośliny posadzono w rozstawie 3 x 1 m w trzech powtórzeniach, po cztery krzewy na poletku. Porównano dziewięć genotypów i odmian: klon N własnej selekcji; dwie odmiany selekcji rosyjskiej - Dlinnopłodna i Wołszebnica oraz sześć polskiej hodowli - Wojtek, Atut, Duet, Zielona i Czarna, Klon 44.

W rzędach utrzymywano czarny ugór mechaniczny, a w międzyrzędziach murawę z gatunków traw szlachetnych. Krzewy jagody kamczackiej wykazują dużą na choroby i szkodniki, w związku z tym nie stosowano chemicznej ochrony roślin. Cięcie krzewów ograniczano do minimum, usuwając jedynie pędy pokładające się oraz uszkodzone mechanicznie. W okresie dojrzewania owoców plantację zabezpieczano przed ptakami siatką. Owoce zbierano sukcesywnie, w miarę dojrzewania w zależności od odmiany zbierano, od maja do czerwca.

Wszystkie rośliny użyte w badaniach były nawożone jedynie nawozem azotowym (saletrą amonową), ze względu na wysoką zawartość pozostałych składników w glebie. W miarę potrzeby, określanej za pomocą tensometrów glebowych, krzewy nawadniano za pomocą linii kroplującej.

Tab. 1. Skład granulometryczny oraz klasyfikacja gleby zakwalifikowanej jako pył piaszczysty.
Tab. 1. The granulometric composition and soil classification classified as sandy dust.

Frakcje i podfrakcje granulometryczne (mm) Fractions and granulometric subfractions (mm)						
piasek - sand				suma - total	pył - dust	ił - loam
1.0-0.5	0.5-0.25	0.25-0.10	0.10-0.05	1.0-0.05	0.05-0.002	<0.002
zawartość - content (%)						
3.9	14.6	11.2	14.6	44.2	51.2	4.6

Klasyfikacja gleby według normy BN-78/9180-11

Charakterystyka odmian

Klon N - charakteryzuje się znacznym wzrostem i dużą plennością. Krzewy wytwarzają owoce średniej wielkości o gorzkim posmaku. Odmiana ta nie ma ustalonego pochodzenia.

Dlinnopłodna - odmiana syberyjska o charakteryzująca się średnim wzrostem, uprawiana na dużą skalę w Rosji. Rośliny te są plenne i mrozoodporne. Owoce są wydłużone i nierówne o barwie

jasnogrnatowej z delikatnym woskowym nalotem, a gdy osiągną dojrzałość zbiorczą są stosunkowo duże i smaczne.

Wolszebnica - jest pochodzącą z Syberii średniowczesną odmianą o dużej plenności, średniej sile wzrostu oraz pełnej mrozoodporności. Krzewy tej odmiany uprawiane są na dużą skalę w Rosji.

Wojtek - odmiana wczesna wyselekcjonowana w Polsce. Owoce są duże, gruszkowate, smaczne z lekkim posmakiem goryczy. Krzewy tej odmiany są pełne i osiągają około 2 m wysokości.

Atut - odmiana wyhodowana w Polsce o średniej sile wzrostu, dość dużej plenności oraz wczesnej porze dojrzewania. Krzewy tej odmiany produkują średniej wielkości owoce o wydłużonym kształcie. Smak owoców określa się jako słodko-kwaśny.

Duet - jest średniowczesną odmianą hodowli polskiej, która jest bardzo wytrzymała na mróz. Krzewy o średniej sile wzrostu i bardzo pełne. Owoce duże, smaczne o walcowatym kształcie, dojrzewające równomiernie.

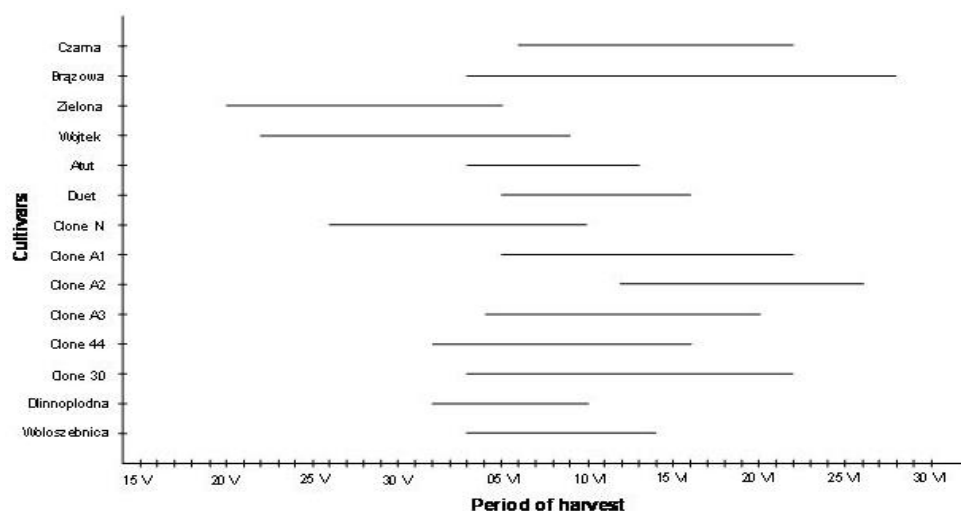
Zielona - polska odmiana wczesna, dojrzewająca na koniec maja. Krzewy produkują duże, owalne owoce z nalotem.

Czarna - jest późną odmianą polskiej hodowli. Owoce są smaczne, duże, kształtu beczułkowatego, z woskowym nalotem, nie opadają przedwcześnie.

Tab. 2. Skład chemiczny gleby.

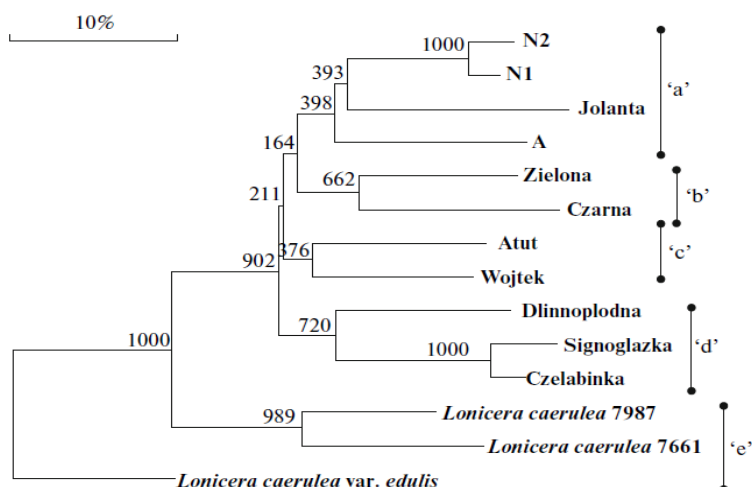
Tab. 2. Chemical composition of soil.

P		K		Ca		Mg	
mg 100 g ⁻¹							
13.4		26.5		47.7		6.0	
Fe	Mn	Zn	Cu	Cd	Pb		
mg 1000 g ⁻¹							
94.1	69.5	13.4	2.2	0.28	25.9		



Rys. 1. Okres zbioru owoców poszczególnych odmian jagody kameczackiej (Ochmian i in. 2013).

Fig.1. Harvest period of individual varieties of Kamchatka berries (Ochmian et al. 2013).



Rys. 2. Drzewo podobieństwa genetycznego badanych odmian jagody kamczackiej wykreślone za pomocą algorytmu skupień UPGMA dla macierzy ISSR. 'a'-'e' grupy jednorodne (Smolik i in. 2010).

Fig. 2. Tree of genetic similarity of the examined varieties of Kamchatka berries, plotted using the UPGMA cluster algorithm for the ISSR matrix. 'A' - 'e' homogeneous groups (Smolik et al. 2010).

Metody badawcze

Bezpośrednio po zbiorze określono plon z każdego krzewu z każdej kombinacji, masę 100 owoców zebranych losowo z każdego powtórzenia oraz kwasowość, zawartość ekstraktu i kwasu L-askorbinowego.

Kwasowość ogólną moszczu (wyrażoną w gramach na litr moszczu) oznaczono metodą miareczkowania w przeliczeniu na kwas winowy. Oznaczenie wykonano miareczkując moszcz 1N NaOH do punktu końcowego przy pH = 8,1 (Pehametr Elmetron Polska).

Zawartość ekstraktu ogólnego zmierzono przy pomocy refraktometru elektronicznego PAL-1 (Atago Japonia).

Zawartość kwasu L-askorbinowego i zawartość azotanów zmierzono za pomocą reflektometru RQflex 10.

Analizując wyniki przeprowadzono analizę wariancji, a następnie wykonano ocenę istotności różnic przy użyciu testu Tukey'a. Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą oprogramowania STATISTICA 12.5.

3. Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowane plonowanie oraz wielkość owoców badanych odmian jagody kamczackiej (Tab. 3). Zdecydowanie najlepiej plonowały krzewy klonu 44. Z tych krzewów zebrano również owoce o największej masie jednostkowej. Na dobrym poziomie plonowały również krzewy odmian Czarna i klon N. Jednak owoce tego klonu były małe. Najsłabiej plonowała odmiana Wołoszewnica. Niskim plonem charakteryzowały się również krzewy odmian Atut i Dlinnoplodna. Z tych krzewów średnia masa 100 owoców była również na niskim poziomie. Według Kaweckiego (1996) pięcioletni krzew jagody kamczackiej wytwarza 1000 g owoców. Bożek i Wieniarska (2006 b) podają, że plon z jednego w pełni owocującego krzewu tego gatunku może wahać się od 2 do 5 kg. Potwierdzają to Małodobry i in. (2008) wskazując, że plon z krzewów odmiany Atut i Duet wyniósł odpowiednio 1040 i 1350 g i może wzrosnąć u starszych roślin nawet czterokrotnie. Ochmian i in. (2012) twierdzą, że średnia masa plonu z krzewów odmiany Wojtek wynosiła 1565 g, natomiast odmiany Brązowa 1941 g. Król i in. (2009) podają, że masa 1 owocu dla gatunku jagoda kamczacka wahała się między 0.6 a 1.5 g, a Ancu i in. (2011) wykazali, że 1 owoc

z tej rośliny w zależności od odmiany ważył od 0.56 g (odmiana Loni) do 1.44 g (odmiana SL 65), natomiast według Bieniek i in. (2005) maksymalna masa jednego owocu wynosi 1.3 g, co potwierdzają wyniki badań własnych (tab. 9). Wiszniewska (1994) twierdzi, że jagody mogą osiągnąć nawet masę 2 g. Analizując wyniki średniej masy 100 owoców odmian w badaniach własnych udowodniono różnice pomiędzy nimi (tab. 9). Owoce o najmniejszej masie zebrano z krzewów odmian Dlinnopłodna i Wołoszebnica, a największe z krzewów odmian Czarna i Duet (tab. 9). Podobne wyniki uzyskali Ochmian i Grajkowski (2007). Zdaniem tych autorów krzewy odmian polskiej hodowli wytwarzają owoce o masie powyżej 1 g. Natomiast Hummer (2006) podaje, że owoce zbierane z rosyjskich odmian uprawianych w stanie Oregon były o masie od 1 do 2 g. Badania Szot i Lipy (2012) wykazały, że średnia masa 100 owoców odmiany Duet była o 50% większa w porównaniu z owocami odmiany Atut.

Tab. 3. Plon oraz średnia masa 100 owoców badanych odmian jagody kamczackiej *L. caerulea*.

Tab. 3. Yield and average weight of 100 fruits of the Kamchatka berries cultivars tested *L. caerulea*.

Odmiana/Cultivar	Suma plonu/Yield (g)	Masa 100 owoców/100 fruits weight (g)
Atut	830	79.5
Czarna	2218	135.9
Dlinnopłodna	998	54.6
Duet	1595	139.1
Klon 44	2916	163.7
klon N	2561	70.6
Wojtek	2007	75.2
Wołoszebnica	549	65.7
Zielona	1377	72.4
NIR/LSD_{0.05}	244	11.5

Tab. 4. Kwasowość, zawartość ekstraktu i kwasu *L*-askorbinowego w owocach badanych odmian jagody kamczackiej *L. caerulea*.

Tab. 4. Acidity, content of extract and *L*-ascorbic acid in the fruits of the studied Kamchatka berries *L. caerulea*.

Odmiana/Cultivar	Kwasowość/Acidity (g kwasu cytrynowego 100g ⁻¹ św.m.)	Ekstrakt/Extract (% św.m.)	Kwas <i>L</i> -askorbinowy L-ascorbic (mg 100 g ⁻¹ św.m.)
Atut	3.53	16.6	92
Czarna	3.08	12.6	71
Dlinnopłodna	3.61	15.4	52
Duet	3.67	14.1	62
klon 44	3.27	15.7	86
klon N	3.54	15.5	120
Wojtek	3.59	14.9	114
Wołoszebnica	3.99	15.2	101
Zielona	3.67	16.0	130
NIR/LSD_{0.05}	0.27	0.25	17

Jagoda kamczacka jest gatunkiem o dużej zawartości kwasów organicznych w owocach. Kwasowość, a zwłaszcza stosunek kwasów do cukrów decyduje o smaku owoców. Przeprowadzone badania potwierdziły dużą zawartość kwasów organicznych w owocach (tab. 4). Stwierdzono również istotne różnice w kwasowości owoców z krzewów poszczególnych odmian. Najmniej kwasów

organicznych stwierdzono w owocach odmiany Czarna, a najczęściej w owocach odmiany Wołoszewnica. Również według Ochmiana i in. (2008) owoce z krzewów odmian Czarna ($2.74 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$), ale również odmian Wojtek $3.48 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ i klon N ($3.22 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) charakteryzowały się niską kwasowością. Owoce jagody kamczackiej charakteryzują się kilkukrotnie większą zawartością kwasów organicznych, np. w porównaniu do aroni $-0.53 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (Ochmian i in. 2013 a) i czereśni $0.5 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (Chelpiński 2007). W badaniach przeprowadzonych w Czechach kwasowość owoców jagody kamczackiej wynosiła nawet $5.22 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (Pokorna-Jurikova i Matuskovic 2007). Zawartość kwasów organicznych w owocach jest uzależniona od terminu zbioru (Skupień i in. 2009; Ochmian i in. 2012). Zdaniem wielu autorów poziom kwasowości w owocach jagody kamczackiej uprawianej w warunkach Polski mieścił się w zakresie od 1.5 do $3.9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (Małodobry i in. 2008; Król i in. 2009; Ochmian i in. 2013 b). Natomiast krzewy tego gatunku uprawiane w Azji zawierały w swych owocach $2.92 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ kwasów organicznych (Tanaka i Tanaka 1998).

Najmniej ekstraktu zawierały owoce odmiany Czarna, charakteryzowały się one również małą zawartością kwasów organicznych. Istotnie najczęściej ekstraktu, który z znacznym stopniem składa się z cukrów, było w owocach odmian Atut i Zielona. Również Małodobry i in. (2008) potwierdzili wysoką zawartość ekstraktu w owocach odmiany Atut, natomiast Ochmian i in. (2008) wykazali niską zawartość ekstraktu w owocach odmiany Czarna. Ponadto Ochmian i in. (2013 b) zaobserwowali, że owoce jagody kamczackiej zbierane w pełni dojrzałe zawierały więcej ekstraktu w porównaniu do owoców pochodzących z wczesnych zbiorów. Według Król i in. (2009) zawartość ekstraktu w owocach jagody kamczackiej waha się pomiędzy 11.1 a 16.7% świeżej masy. Również Ochmian i in. (2013 b) określili poziom ekstraktu w owocach w granicach od 11.3% do 16.7% świeżej masy.

W przeprowadzonym doświadczeniu własnym określona zawartość kwasu *L*-askorbinowego w owocach jagody kamczackiej była istotnie zróżnicowana w poszczególnych odmianach. Najniższą zawartość kwasu *L*-askorbinowego, stwierdzono w owocach odmian: Dlinnopłodna, Duet oraz Czarna. Są to odmiany które wykazują duże podobieństwo genetyczne (Smolik i in. 2010). Najwięcej kwasu *L*-askorbinowego miały owoce klonu N oraz odmian Zielona i Wojtek. Według Trajkovskiego i Hjalmarsson (2007) oraz Tanaka i Tanaka (1998) zawartość kwasu *L*-askorbinowego w owocach jagody kamczackiej mieści się w zakresie od 30.5 do $186.6 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, co potwierdzają wyniki uzyskane w doświadczeniu własnym. Natomiast Szot i Lipa (2012) stwierdzili, że w zależności od odmiany i sezonu badań zawartość witaminy C w owocach jagody kamczackiej wahała się od 48.4 do $66.1 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$. Owoce tego gatunku charakteryzują się większą zawartością witaminy C od owoców: maliny – $16.8-37.7$ (Pantelidis i in. 2007); jeżyny – $14.3-17.5$ (Szajdek i Borowska 2008) czy truskawki – $23.8-51.0 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ (Roberts i Gordon 2003).

Według Kamzolovej i in. (2006) owoce odmian pochodzących z Białorusi zawierają od 24.3 do $48 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ witaminy C, natomiast Pierzga (2001) podaje, że odmiany czelabińskie mogą zawierać jedynie $25 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ witaminy C. Szot i Wieniarska (2012) wykazały, że owoce krzewów odmiany Duet ($43.25 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) w porównaniu do owoców odmiany Atut ($63.44 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) charakteryzowały się mniejszą zawartością witaminy C. Podobne wyniki uzyskano również w doświadczeniu w Ostoi. Poziom kwasu *L*-askorbinowego uzależniony jest również od terminu zbiorów owoców; owoce zbierane najpóźniej posiadały mniej tego związku (Ochmian i in. 2012).

4. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowano następujące wnioski:

- Jagoda kamczacka jest gatunkiem o bardzo wczesnej porze dojrzewania owoców.
- Spośród badanych genotypów i odmian klonu 44 i N oraz odmiana Czarna, polskiej hodowli, charakteryzowały się wysokim plonem.
- Największymi owocami charakteryzowały się krzewy klonu 44.
- Krzewy jagody kamczackiej rosyjskich odmian wytwarzają mniejsze owoce i słabiej plonują w porównaniu z odmianami hodowli polskiej.
- Owoce odmian Atut i Zielona miały największą zawartość ekstraktu.

5. Literatura

- Ancu I, Mladin G, Mladin P, Ancu S I (2011) Resurse genetice, ameliorarea speciilor pomicole. Genetic resources, breeding of deciduous fruit trees species. Evaluation of fruit quality at fruit selections valuable of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* var. *kamtschatica*). Scientific Papers of Research Institute for Fruit Growing, Pitesti, Romania, XXVII.
- Bieniek A, Kawecki Z, Łojko R, Stanys V (2005) Owocodajne drzewa i krzewy chłodniejszych stref klimatycznych. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrańskińsko- Mazurskiego w Olsztynie: 80-86.
- Bożek M, Wieniarska J (2006a) Biologia kwitnienia i wydajność cukrowa kwiatów dwóch odmian *Lonicera kamtschatica* (Sevast.) Pojark. Acta Agrobotanica, 59(1): 177-182.
- Chełpiński P (2007) Wpływ wybranych podkładek na wzrost i plonowanie oraz skład chemiczny liści i owoców czereśni na Pomorzu Zachodnim. Szczecin. Wydawnictwo Akademii Rolniczej. Rozprawa habilitacyjna, 43-44.
- Hummer E K (2006) Blue honeysuckle: a new berry crop for North America. Journal of The American Pomological Society, 30(1): 3-8.
- Kamzolova O I, Pigul M L, Lipskaia S L (2006) Biochemická ocena sortov zimolosti siniei v usloviach Belarusi. Plodovodstvo 18(1): 110-114.
- Kawecki Z (1996) Nowe rośliny w uprawie sadowniczej. w: 2 Ogrodnicze Sympozjum. Nowe Rośliny i Technologie w Ogrodnictwie. Poznań. 2: 30-33.
- Król K, Orzeł A, Świdorski A (2009) Wartość użytkowa wybranych odmian suchodrzewu błękitnego, maliny czarnej, jeżyny oraz świdośliwy. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 536: 121-127.
- Małodobry M, Bieniasz M, Dziedzic E (2008) Ocena plonowania oraz zawartości niektórych składników w owocach dwóch odmian suchodrzewu siniego (*Lonicera caerulea* var. *Edulis* Turcz. Freyn) XLV Ogólnopolska Naukowa Konferencja Sadownicza. Skierniewice, 94-96.
- Ochmian I, Smolik M, Dobrowolska A, Rozwarski R, Kozos K, Chełpiński P, & Ostrowska K (2013) The influence of harvest date on fruit quality of several cultivars of blue honeysuckle berries. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 16(1), 1.
- Pantelidis G E, Vasilakakis M, Manganaris G A, Diamantidis G (2007) Antioxidant
- Pierzga K (2001) Suchodrzew jadalny. Szkółkarstwo, 5: 14-15.
- Pokorna-Jurikova T, Matuskovic J (2007) The study of irrigation influence on nutritional value of *Lonicera kamtschatica* - Cultivar Gerda 25 and *Lonicera edulis* berries under the Nitra conditions during 2001-2003. Horticultural Science, 34: 11-16. capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. Food Chemistry, 102(3): 777-783.
- Roberts W G, Gordon M H (2003) Determination of the total antioxidant activity of fruits and vegetables by a liposome assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(5): 1486-1493.
- Szajdek A, Borowska E J (2008) Bioactive compounds and healthpromoting properties of berry fruits: a review. Plant Foods for Human Nutrition, 63(4): 147-156.
- Skupień K, Ochmian I, Grajkowski J (2009) Influence of ripening time on fruit chemical composition of two blue honeysuckle cultivars. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 17(1): 101-111.
- Smolik M, Ochmian I, Grajkowski J (2010) Genetic Variability of Polish and Russian Accessions of Cultivated Blue Honeysuckle (*Lonicera caerulea*). Genetika 46(8): 1079-1085.
- Szot I, Lipa T (2012) Influence of Betokson Super and fertilizers on chemical composition of fruits and leaves of blue honeysuckle. Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus, 11(5): 113-125.
- Tanaka T, Tanaka A (1998) Chemical composition and characteristics of Hasukappu berries in various cultivar and strains. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 45(2): 129-133.
- Trajkovski V, Hjalmarsson I (2007) The value of national fruit gene banks. Zemes Ukio Mokslai, 14(4): 28-32.
- Wiszniewska E (1994) Suchodrzew i wiciokrzew w ziołolecznictwie. Wiadomości Zielarskie, 4: 14.

5. Potencjalne możliwości zastosowania grzybów drożdzo-podobnych z rodzaju *Aureobasidium* wobec fitopatogennych grzybów strzępkowych

Potential use of yeast-like fungi *Aureobasidium spp.* against pathogenic fungi

Bochnak Justyna⁽¹⁾, Kordowska - Wiater Monika⁽²⁾

⁽¹⁾ Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾ Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr Monika Kordowska - Wiater

Bochnak Justyna: just.bochnak@gmail.com

Słowa kluczowe: biokontrola, antagonizm, drożdże

Streszczenie

Aureobasidium pullulans to jeden z obiecujących mikroorganizmów w procesach biologicznej ochrony roślin. Temu gatunkowi grzybów drożdżopodobnych przypisuje się silne działanie antagonistyczne wobec innych mikroorganizmów. Antagonizm w stosunku do fitopatogenów przejawia się między innymi konkurencją o przestrzeń życiową i składniki pokarmowe, wydzielaniem substancji o aktywności przeciwgrzybiczej, indukcją odporności, a ponadto zdolnością do produkcji związków lotnych. Wzrost świadomości w sektorze rolnictwa prowadzi do ograniczenia stosowania w zabiegach agrotechnicznych chemicznych środków ochrony roślin, a ponadto podejmowane są próby wykorzystania mniej inwazyjnej, biologicznej ochrony roślin.

1. Wstęp

Rośliny uprawne narażone są na choroby powodowane przez szkodniki oraz mikroorganizmy zarówno w czasie wzrostu, jak i podczas magazynowania. Efektem chorób są duże straty ekonomiczne, między innymi obniżenie jakości oraz ilości zbiorów. Zmniejszenie rocznego poziomu produkcji żywności, generowane przez wyżej wymienione czynniki, waha się pomiędzy 25-50% w zależności od źródła. U podłoża jednej trzeciej tych strat leżą choroby grzybowe. Aktualnie do zwalczania fitopatogennych grzybów strzępkowych stosuje się fungicydy - chemiczne środki ochrony roślin. Preparaty te odznaczają się wysoką skutecznością, aczkolwiek należy mieć na uwadze prawdopodobieństwo zanieczyszczenia produktów pozostałościami wykorzystanych substancji grzybobójczych, co skłania do poszukiwania alternatywnych, bezpieczniejszych metod ochrony roślin. Nadmierne zużycie w rolnictwie intensywnym środków chemicznych, monokultura oraz inne negatywne trendy, prowadzą do pogorszenia jakości płodów rolnych, zubożenia gleby, a także zachwiania równowagi w zbiorowisku drobnoustrojów wpływających na prawidłowe działanie ekosystemu. Szansą na polepszenie tych warunków jest kontrola biologiczna, gdzie na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie mikroorganizmów antagonistycznych (Sharma i in. 2009).

A. pullulans zaliczany jest do gromady *Ascomycota*, klasy *Dothideomycetes*, zazwyczaj jest przedstawiany jako „czarny grzyb drożdżopodobny”. Zbudowany jest z wydłużonych, rozgałęzionych strzępek oraz małych eliptycznych komórek drożdżopodobnych. W początkowej hodowli kolonie są gładkie, kremowe, blade różowe, oliwkowozielone lub jasnobrązowe, lecz pod wpływem wytwarzania zarodników przetrwalnych - chlamydospor, zmieniają barwę na czarną. Tworzenie ciemnych chlamydospor jest cechą bardzo charakterystyczną dla *A. pullulans* (Chi i in. 2009). Z czasem kolonie nie tylko ciemnieją, uwidacznia się również śluz, a powierzchnia staje się sucha i "skórzasta" (Chlebowska-Śmigiel 2013). Grzyb ten wyróżnia się dużym zróżnicowaniem właściwości fizjologicznych i morfologicznych, dlatego też wyodrębniono jego cztery odmiany: *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *namibiae*, *A. pullulans* var. *melanogenum* oraz *A. pullulans* var. *subglaciale* (Gostinčar i in. 2014).

Grzyby drożdżopodobne *A. pullulans* powszechnie występują w środowisku naturalnym. Można je znaleźć zarówno w strefie umiarkowanej, tropikalnej jak również polarnej. Na drodze

ewolucji *A. pullulans* nabył nadzwyczajną tolerancję bytowania w różnych warunkach otoczenia i cechuje się dobrą odpornością na stres. Mikroorganizm ten jest często powiązany z różnymi roślinami jako epifit, endofit lub też występuje w fylosferze. Niemniej jednak, poszczególne szczepy cechują się innymi wymaganiami niszy, w jakiej się rozwijają. *A. pullulans* var. *pullulans* bytuje zazwyczaj w środowiskach lekko osmotycznych, niejednokrotnie jest związany z roślinami i toleruje 17 % stężenie NaCl, w przeciwieństwie do pozostałych odmian, które nie wykazują tolerancji na tak wysokie stężenie soli. Z kolei *A. pullulans* var. *melanogenum* wyodrębniono przede wszystkim z oligotroficznych, wodnych środowisk, a najlepiej rozwija się w temperaturze 37 °C. Natomiast *A. pullulans* var. *subglaciale* ze względu na swoją naturę psychrotolerancyjną, rośnie w 4°C, występuje w siedliskach lodowcowych w Svalbard (Norwegia). Odmiana *A. pullulans* var. *namibiae* została nazwana od miejsca pozyskania izolatu z marmuru na Pustyni Namib (Gostinčar i in. 2014).

2. Przegląd literatury

2.1. Charakterystyka *Aureobasidium pullulans*

Mikroorganizmy wykorzystywane w biopreparatach muszą wykazywać szereg pożądanych cech, a przede wszystkim powinny być bezpieczne dla zdrowia człowieka i stabilne genetycznie. Powinny cechować się szybkim wzrostem oraz umiarkowanymi wymaganiami pokarmowymi, namnażać się na możliwe tanich pożywkach oraz nie powinny wywoływać negatywnego wpływu na rośliny. Powinny natomiast cechować się wyższą niż patogen zdolnością do przetrwania w ciężkich warunkach (Droby i in. 2009).

A. pullulans spełnia kryteria dobrego mikroorganizmu do biologicznej ochrony. Cechuje się między innymi skutecznością w szerokim zakresie temperatur (10-45°C), przy czym optymalna dla jego rozwoju temperatura to 28 °C, oraz w szerokim zakresie pH 2,0-8,9 (optymalne pH 5,4-6,3). Jest zdolny do rozwoju w warunkach tlenowych jak i beztlenowych. Grzyb ten posiada niską patogenność, choć zaobserwowano nieliczne przypadki zakażeń. Niewielkie wymagania pokarmowe pozwalają *A. pullulans* czerpać energię z różnych substratów (np. D-glukozy, D-ksylozy, α -laktazy, sacharozy, rafinozy, glicerolu, o-krezolu, formaldehydu, aldehydu propionowego czy fenolu). Niektóre szczepy posiadają tolerancję na obecność 10 % NaCl i 10 % MgCl₂, co pozwala im na bytowanie w wodach morskich. Dodatkowo posiadają zdolność do wytwarzania ciemnych barwników melaninowych, co znacznie potęguje zdolność do przetrwania i konkurencji w różnych środowiskach (Chlebowska-Śmigiel 2013).

Na przestrzeni ostatnich lat *A. pullulans* zyskał bardzo ważne miejsce w przemyśle, stwierdzono bowiem, że jest zdolny do wytwarzania różnych substancji m. in. pullulanu, zewnątrzkomórkowych enzymów (amylaz, proteaz, lipaz), białek (SCP), antybiotyków i sideroforów (Chi i in. 2009). Ponadto *A. pullulans* wykazał potencjał w kontrolowaniu i monitorowaniu zanieczyszczeń środowiska. Ze względu na wszechobecność występowania tego grzyba, może być on wskaźnikiem zakłóceń równowagi środowiska, generowanych przez szkodliwe chemikalia bądź metabolity wytwarzane przez inne mikroorganizmy (Gostinčar i in. 2014).

Niektóre izolaty *A. pullulans* wykazują działanie antagonistyczne wobec wielu fitopatogennych grzybów i są uznawane za czynniki biokontroli. Ich skuteczność oceniono na podstawie zdolności do konkurencji o składniki odżywcze i produkcję enzymów litycznych. Szczep L47 *A. pullulans* wyizolowany w południowych Włoszech z winogron był z powodzeniem stosowany do zwalczania chorób różnych owoców i warzyw po zbiorze. Szczep ten zapewniał wysoki poziom ochrony przed *Penicillium digitatum* na owocach grejpfruta, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* i *Rhizopus stolonifer* na owocach winogron, a także *B. cinerea* i *R. stolonifer* na pomidorach koktajlowych oraz *B. cinerea* na owocach kiwi, wiśni, jabłek, truskawek i pomidorów (Scheda i in. 2002).

Natomiast *A. pullulans* R106 może produkować antybiotyk przeciwgrzybowy aureobazydynę A, która należy do grupy cyklicznych lipofilowych depsipeptydów. Związki peptydowe pochodzenia grzybowego charakteryzują się wyższą aktywnością przeciw-grzybową niż peptydy pochodzenia bakteryjnego czy roślinnego. Mechanizm działania opiera się na inhibicji procesu tworzenia aktyny i chityny, a także uniemożliwieniu syntezy sfingolipidów. Antybiotyk ten

jest inhibitorem jednego z kluczowych enzymów szlaku biosyntezy sfingolipidów grzybów, wskutek czego efektem jego działania na komórki grzyba docelowego są wielorakie zmiany morfologiczne grzybni oraz zaburzenia procesu dojrzewania konidiów (Bencheqroun i in. 2007).

2.2. Ryzyko oraz szkody generowane przez grzyby strzępkowe

Grzyby strzępkowe są przyczyną licznych chorób roślin, które z kolei przekładają się na znaczące straty na światowym rynku produkcji żywności (Grzegorzczuk i in. 2015). Tab. 1 przedstawia zestawienie najczęściej spotykanych grzybów strzępkowych, gospodarzy (atakowane rośliny) oraz ponoszonych strat. Jak wynika z danych literaturowych, mykozy, czyli choroby powodowane przez grzyby są źródłem jednej trzeciej ponoszonych strat w sektorze żywnościowym. Jest to spowodowane w dużej mierze tym, iż patogeny mają szerokie grono gospodarzy, jak również w wielu przypadkach charakteryzują się znaczną odpornością na zmieniające się warunki środowiska, a w niektórych sytuacjach wywołują infekcje utajone. Starty są odnotowywane zarówno przed zbiorami, jak i w trakcie przechowywania (Dean i in. 2012).

Tab. 1. Najpopularniejsze grzyby strzępkowe powodujące największe straty w rolnictwie i przemyśle (Dean i in. 2012).

Patogen	Atakowane rośliny	Ponoszone straty
<i>Alternaria alternata</i>	Liczne gatunki roślin	Obniżenie plonów
<i>Botrytis cinerea</i>	Ponad 200 gatunków roślin	Ze względu na obecność genów oporności na fungicydy, koszty zwalczania wynoszą ponad 1 mld Euro rocznie, infekują w sposób latentny, objawy choroby widoczne w trakcie składowania i transportu
<i>Blumeria graminis</i>	Zboża, a zwłaszcza jęczmień i pszenica	Obniżenie plonów
<i>Colletotrichum spp.</i>	Szczególnie szeroki zakres gospodarzy	Głównie podczas transportu i magazynowania, utajone infekcje
<i>Fusarium culmorum</i>	Wiele gatunków roślin, zboża	Obniżenie plonów, zanieczyszczenie mykotoksynami
<i>Fusarium graminearum</i>	Wszystkie zboża	Obniżenie jakości ziarna, zanieczyszczenie mykotoksynami
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ponad 100 gatunków roślin	Zmniejszenie plonów, straty w produkcji roślin ozdobnych, zanieczyszczenie mykotoksynami
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Ryż, proso, pszenica, jęczmień	Najbardziej destrukcyjna choroba ryżu na świecie, 10 - 30 % strat w produkcji ryżu
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Pszenica	Obniżenie plonów
<i>Puccinia spp.</i>	Pszenica, jęczmień	Obniżenie plonów, łatwość nabywania genów kodujących nowe czynniki wirulencji

2.3. Przebieg ochronnego wpływu drobnoustrojów antagonistycznych na rośliny

Do najistotniejszych mechanizmów biokontroli zaliczamy konkurencję o przestrzeń życiową oraz składniki pokarmowe. Jest to zjawisko, które obserwuje się u wszystkich mikroorganizmów. Polega ono na wykazaniu się antagonisty lepszymi zdolnościami przystosowania się i namnażania, przy niskich stężeniach składników pokarmowych, niż patogen. Mikroorganizmy konkurencyjne wykazują wysoki potencjał reprodukcyjny, ponadto mają uzdolnienia do szybkiego zasiedlania powierzchni roślin uprawnych, w szczególności w miejscach przzerwania ciągłości ich tkanek wywołanych urazami mechanicznymi podczas uprawy bądź zbiorów. W tych miejscach roślina jest najbardziej podatna na infekcje patogenem. Mikroorganizm będący antagonistą namnażając się

w okolicach rany, zubaża pulę łatwo dostępnych składników pokarmowych oraz wpływa na ograniczenie potencjalnej przestrzeni życiowej, co w konsekwencji prowadzi do utrudnienia rozwoju patogenów na powierzchni rośliny i zmniejsza intensywność ich zarodnikowania (Grzegorzczak i in. 2015). Mechanizmy takie zaobserwowano u grzybów drożdżopodobnych z gatunku *A. pullulans* (Bencheqroun i in. 2007).

Równie istotnym mechanizmem biokontroli jest mykopasożytnictwo. Zjawisko to polega na rozkładzie ścian komórkowych mikroorganizmu wrażliwego przez antagonistę, doprowadza do deformacji morfologii grzybni oraz obniżenia jej turgoru, a w rezultacie prowadzi do całkowitego rozkładu i zahamowania rozwoju patogenu. W procesie tym biorą udział glukanazy, chitynazy i proteiny. Efektywność tego zjawiska w dużej mierze połączona jest ze zdolnością mikroorganizmów antagonistycznych do ścisłej adhezji do ścian komórkowych fitopatogenicznych grzybów strzępkowych, która skutkuje zmniejszeniem powierzchni wchłaniania składników pokarmowych. Działanie enzymów litycznych prowadzi do rozkładu ściany komórkowej grzybów strzępkowych, a przede wszystkim powstrzymuje rozrost grzybni oraz penetrację komórek roślinnych. *A. pullulans* cechuje zdolność do syntezy chitynaz i glukanaz, które degradują ścianę komórkową grzybowych patogenów roślin, co świadczy o ich potencjale biokontrolnym (Grzegorzczak i in. 2015).

Kolejną cechą szczególną wielu mikroorganizmów jest zdolność do produkcji i wydzielania aktywnych substancji mających hamujący wpływ na rozwój patogenów. Metabolity wtórne, nazywane antybiotykami poprzez działanie na ścianę i błonę komórkową prowadzą do przerwania ich ciągłości oraz niekontrolowanego wypływu składników komórkowych, co w następstwie prowadzi do śmierci patogenów. Zdolność mikroorganizmów do produkcji antybiotyków, ich rodzaj i efektywność działania jest cechą gatunkową, często rozpatrywaną w obrębie szczepu. *A. pullulans* syntetyzuje aureobazydynę, która działa hamująco m.in. na wzrost komórek *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *P. expansum*, *P. digitatum*, *P. italicum* oraz *B. cinerea* (Bencheqroun i in. 2007).

Innym ważnym mechanizmem zaliczanym do antybiozy jest sekrecja lotnych metabolitów przeciugrzybowych. Przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych analizy wykazały, że w hodowlach bezkontaktowych grzybów z rodzaju *Trichoderma* i patogenów roślin takich jak *Fusarium graminearum*, *Penicillium ultimum* i *Rhizoctonia solanii*, dzielenie wyłącznie wspólnej przestrzeni powietrznej prowadzi do znaczącego, często nawet całkowitego, zahamowania wzrostu grzybów patogenicznych (Raut i in. 2014). Podobne efekty uzyskano w bezkontaktowych hodowlach drożdży z gatunków *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Williopsis nomalis* z patogenem winorośli – *B. cinerea* (Parafati i in. 2015).

Indukcja odporności jest naturalnym zjawiskiem, które następuje w trakcie oddziaływania fitopatogenicznych grzybów z tkankami roślinnymi, aczkolwiek obecność antagonistycznego drobnoustroju może w istotnym stopniu przyczynić się do wzmocnienia reakcji obronnej rośliny. Zjawisko to polega na włączeniu, wzmocnieniu i/lub ukierunkowaniu szlaków metabolicznych roślin do syntetyzowania związków mających hamujący bądź bójczy wpływ na patogeny. Do takich związków zaliczyć można zarówno substancje niebiałkowe, takie jak np. fitoaleksyny (umbeliferon, skoparon, skopoletyna) czy reaktywne formy tlenu oraz etylen, jak również białkowe, np. enzymy glukanazy bądź chitynazy (Herskovitz i in. 2012).

Ippolito i Nigro opisali rolę drożdżaka *A. pullulans* w uruchamianiu mechanizmów odporności roślin w odpowiedzi na atak grzybów patogenicznych (Ippolito i Nigro 2000). Aplikacja zawiesiny komórek *A. pullulans* wiązała się ze wzrostem aktywności β -1,3-glukanazy, chitynazy oraz peroksydazy, co przełożyło się na ochronę jabłek przed skażeniem *P. expansum*. Szereg zmian zachodzących w strukturze komórkowej roślin, powodujących wzmocnienie i wywołanie odporności na penetrację przez strzępki grzybni przypisywane jest peroksydazie.

Drożdże antagonistyczne zdolne są również do tworzenia otoczki śluzowej wokół komórek gospodarza, tworzącej swego rodzaju barierę ochronną. Zawarte w niej substancje ułatwiają roślinie prawidłowe rozpoznanie patogenu. Takie cechy charakteryzują także fragmenty polisacharydów ściany komórkowej drożdży (Sharma i in. 2009).

Szereg badań donosi o zdolnościach drobnoustrojów antagonistycznych do hamowania wzrostu i rozwoju patogenów roślin w warunkach laboratoryjnych, mimo to wiele z czynników biokontroli nie przekłada się na równie wysokie wyniki podczas prób wykorzystania ich na większą skalę. Dotychczasowe szanse na wykorzystanie mikroorganizmów w warunkach naturalnych niosą ze sobą ograniczenia ze względu na brak powtarzalności wyników badań w różnych środowiskach (Grzegorzczak i in. 2015).

2.4. Podniesienie efektywności działania drobnoustrojów jako elementów biokontroli

W celu podwyższenia efektywności działania czynników biokontroli stosuje się je równocześnie z metodami fizycznymi, chemicznymi (zazwyczaj obejmują ochronę po zbiorze) bądź agronomicznymi (obejmuje ochronę przed zbiorem) jak również istnieje możliwość łączenia powyższych elementów.

Jednym z rozwiązań mających na celu zwiększenie skuteczności ochrony biologicznej jest wykorzystanie mikroorganizmów w połączeniu z czynnikami fizycznymi. Obecnie w przemyśle wykorzystuje się modyfikowane warunki atmosferyczne, promieniowanie UV oraz podwyższoną temperaturę, co pozytywnie wpływa na efektywność czynników biokontroli w trakcie przechowywania plonów. Połączenie obróbki cieplnej i *Pichia guilliermondii* jest jedną z najskuteczniejszych technik zwalczania grzybów po zbiorze na pomidorach koktajlowych. Eksperymenty *in vitro* wykazały, że obróbka cieplna w temperaturze 38 °C, po której następowało zastosowanie *P. guilliermondii* zapewniała najlepszą skuteczność i hamowała rozwój trzech szczepów patogennych: *B. cinerea*, *A. alternata* i *R. stolonifer* (Zhao i in. 2010).

Innym sposobem podniesienia efektywności biopreparatów jest uzupełnienie ich substancjami chemicznymi. W tym celu najczęściej wykorzystywane są sole nieorganiczne (np. chlorek wapnia, kwaśny węgiel sodu) lub związki organiczne (np. kwas salicylowy), jak również antyoksydanty i polisacharydy (Qin i in. 2015).

Preparaty biologiczne łączące w swoim składzie kilka gatunków pożytecznych mikroorganizmów często charakteryzują się znacznie szerszym spektrum działania wobec fitopatogenów grzybowych, a ponadto cechuje je wyższa trwałość w środowisku. W przypadku dwuskładnikowych biopreparatów grzybobójczych w skład wchodzi dwa mikroorganizmy antagonistyczne zazwyczaj należące do odrębnych grup drobnoustrojów. Jest to stosunkowo innowacyjne podejście w ochronie roślin. Według danych literaturowych coraz częściej podejmowane są próby wykorzystania preparatów zawierających grzyby strzępkowe, drożdże lub sinice z komórkami bakterii. Sposób działania takich biopreparatów opiera się na tworzeniu biofilmu przez bakterie, w skład którego wchodzi dane drobnoustroje antagonistyczne, co przekłada się na lepszą adaptację i większą wydajność w różnych środowiskach. Z wstępnych badań wynika, że zastosowanie takich biopreparatów korzystnie oddziałuje na odporność roślin wobec fitopatogenów. Dobrym przykładem pozytywnego działania takich biopreparatów na rośliny jest wykorzystanie w przechowywaniu plonów wspólnej kultury drożdży z gatunku *Tilletiopsis pallescens* i bakterii *Brevibacillus brevis*, w efekcie czego odnotowano redukcję porażenia mączniakiem prawdziwym (Grzegorzczak i in. 2015).

2.5. Możliwości wykorzystania mikroorganizmów antagonistycznych

Wprowadzenie na rynek preparatu zawierającego mikroorganizmy jako biologiczne czynniki ochrony (ang. BCA – Biological Control Agent) zobligowane jest do przeprowadzenia wieloletnich badań zarówno w warunkach *in vitro* i *in vivo* (w laboratorium) jak również w warunkach terenowych (poletka eksperymentalne) (Nunes 2012). Przebieg rejestracji preparatów BCA podlega szczegółowej kontroli prawnej, jest to proces dosyć trudny, czasochłonny, a ponadto kosztowny.

W całym procesie bardzo istotnym aspektem jest fakt umieszczenia na rynku preparatu bezpiecznego dla człowieka oraz środowiska. Znaczna część drobnoustrojów wykorzystywana w tym celu była uprzednio izolowana z produktów rolniczych, obecnych w codziennej diecie ludzi. Ulokowanie antagonistów na powierzchni organów roślinnych choćby w większej liczbie nie powinno być szkodliwe, gdyż mikroorganizmy te zwykle rozwijają się w specyficznych miejscach

(zranieniach), a na nienaruszonej powierzchni ich populacja spada do poziomu naturalnej mikroflory (Droby i in. 2009).

Komercyjne wykorzystanie szczepów drożdży jako preparatów przeznaczonych do ochrony roślin stanowi wyjątkowe wyzwania pod względem produkcji i stabilności produktu. W większości wstępnych badań z użyciem tych środków wykorzystywano wysokiej jakości pożywki, które nie są ekonomicznie opłacalne na większą skalę. Stworzenie produktu o długiej trwałości i utrzymującej się skuteczności stanowi również istotne wyzwanie. Pomimo, że wpływ warunków zewnętrznych na fizjologię oraz tolerancja na stres w modelowych drożdżach została obszernie przeanalizowana, konieczne jest wykonanie znacznie więcej ilości badań, aby ocenić, ile aktualnie dostępnych informacji ma zastosowanie do produkcji preparatów opartych na dzikich, naturalnie bytujących w ekosystemie szczepach. Uzyskanie takich informacji wymaga indywidualnego przeanalizowania parametrów dla każdego przypadku. W ciągu ostatnich trzydziestu lat obserwuje się wzrost liczby gatunków drobnoustrojów, które zostały określone jako potencjalne środki biokontroli (Sui i in. 2015).

3. Podsumowanie

Biologiczne metody ochrony roślin na przestrzeni lat wzbudzają coraz większe zainteresowanie, o czym świadczy szereg badań na temat zrozumienia i zoptymalizowania kontroli biologicznej, aby uniknąć nadmiernego stosowania syntetycznych substancji chemicznych, szkodliwych zarówno dla środowiska jak i ludzi. Zgłębienie procesów działania antagonistycznych mikroorganizmów przyczyni się do udoskonalenia ich aktywności i efektywności, a ponadto umożliwi rozwój kryteriów do szybkiego skringu czynników ochrony biologicznej. Wykorzystanie mikroorganizmów antagonistycznych w ochronie roślin pozwoli na pozyskiwanie znacznie wyższych plonów, a ponadto warto nadmienić, że jest to ekologiczna i bezpieczna alternatywa w walce z patogenami roślin. Zrozumienie proekologicznej przydatności potencjalnych środków kontroli biologicznej grzybów drożdżopodobnych oraz opracowanie strategii zwiększających ich tolerancję na stres mają kluczowe znaczenie dla ich skuteczności i komercyjnego zastosowania.

Na efektywność antagonizmu drobnoustrojów wpływają takie czynniki jak: rodzaj rośliny uprawnej i rodzaj patogenu, stopień porażenia rośliny patogenem, parametry środowiska (pH, temperatura, wilgotność), rodzaj oraz odpowiednio dobrana dawka biopreparatu, jak również czas i miejsce zastosowania.

4. Literatura

- Bencheqroun SK, Bajji M, Massart S, i in. (2007) In vitro and in situ study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Postharvest Biology and Technology* 46: 128-135.
- Chi Z, Wang F, Chi Z, i in. (2009) Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 793-804.
- Chlebowska-Śmigiel A (2013) Wykorzystanie pleśni *Aureobasidium pullulans* do otrzymywania pullulanu, w: *Zastosowanie wybranych drobnoustrojów w biotechnologii żywności*, (red. Gniewosz M., Lipińska E.), Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 71-87.
- Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA i in. (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(4): 414-430.
- Droby S, Wisniewski M, Macarasin D (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology* 52: 137-145.
- Gostinčar C, Ohm RA, Kogej T i in. (2014) Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics* 15 (1): 549.
- Grzegorzczak M, Szalewicz A, Żarowska B, i in. (2015) Drobnoustroje w biologicznej ochronie roślin przed chorobami grzybowymi. *Acta Scientiarum Polonorum Biotechnology* 14 (2): 19-42.

- HersHKovitz V, Ben-DayAn C, Raphael G, i in. (2012) Global changes in gene expression of grapefruit peel tissue in response to the yeast biocontrol agent *Metschnikowia fructicola*. *Molecular Plant Pathology* 13 (4): 338-349.
- Ippolito A, Nigro F (2000) Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* 19: 715-723.
- Nunes C (2012) Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology* 133: 181-196.
- Parafati L, Vitale A, Restuccia C, i in. (2015) Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology* 47: 85-92.
- Qin X, Xiao H, Hue C, i in. (2015) Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology* 100: 160-167.
- Raut I, Badea-Doni M, Calin M (2014) Effect of volatile and non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. against important phytopathogens. *Revista de Chimie* 65 (11): 1285-1288.
- Schena L, Sialer MF, Gallantly D (2002) Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease Journal* 86: 54-60.
- Sharma RR, Singh D, Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control* 50: 205-220.
- Sui Y, Wiśniewski M, Droby S, i in. (2015) Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress, *Applied and Environmental Microbiology* 81 (9): 2968-2975.
- Zhang D, Spadaro D, Garibaldi A, i in. (2012) Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches. *Postharvest Biology and Technology* 55: 174-181.
- Zhao Y, Tu K, Tu S, i in. (2010) A combination of heat treatment and *Pichia guilliermondii* prevents cherry tomato spoilage by fungi. *International Journal of Food Microbiology* 137 (1): 106-110.

6. Ocena aktywności antagonisticznej środowiskowych izolatów grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Aureobasidium* względem wybranych fitopatogennych grzybów strzępkowych

Evaluation of the antagonistic activity of yeast-like fungi *Aureobasidium* sp. against selected phytopathogenic fungi

Bochnak Justyna⁽¹⁾, Kordowska - Wiater Monika⁽²⁾

⁽¹⁾ Katedra Biochemii i Chemii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁽²⁾ Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr Monika Kordowska - Wiater

Bochnak Justyna: just.bochnak@gmail.com

Słowa kluczowe: biokontrola, antagonizm, *Aureobasidium pullulans*

Streszczenie

W poniższym badaniu *in vitro* określano zdolność antagonistyczną 25 izolatów grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Aureobasidium* (wyizolowanych z roślin) wobec fitopatogennych grzybów strzępkowych: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* i *Fusarium oxysporum*. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano potencjał biokontrolny *Aureobasidium* względem pleśni z gatunków *A. alternata* oraz *B. cinerea*, natomiast patogeny z gatunków *F. culmorum* i *F. oxysporum* w przeprowadzonym eksperymencie były całkowicie odporne. Głównym mechanizmem oddziaływania badanych szczepów była antybioza oraz konkurencja o składniki odżywcze oraz zajmowaną przestrzeń.

1. Wstęp

Aureobasidium pullulans zazwyczaj jest przedstawiany jako „czarny grzyb drożdżopodobny”, który jest szczególnie znany ze swojego biotechnologicznego wykorzystania jako producent pullulanu. Jego potencjał biotechnologiczny widoczny jest również w produkcji różnych enzymów hydrolitycznych (Zalar i in. 2008). Niektóre izolaty *A. pullulans* przejawiają działanie antagonisticzne wobec licznych fitopatogennych grzybów i są uznawane jako elementy biokontroli. Ich efektywność szacowano na podstawie współzawodnictwa o składniki odżywcze i produkcję enzymów litycznych (Mounir i in. 2007, Wagner i in. 2013).

Generalnie do ochrony roślin przed fitopatogennymi grzybami strzępkowymi stosuje się fungicydy. Te chemiczne środki ochrony roślin odznaczają się wysoką skutecznością, ale trzeba mieć na uwadze możliwość zanieczyszczenia płodów rolnych pozostałościami stosowanych substancji grzybobójczych. Obserwowany w ostatnich latach wzrost świadomości proekologicznej skłania do poszukiwania innych, bezpieczniejszych metod ochrony roślin. Biokontrola cieszy się coraz większym zainteresowaniem, o czym świadczy szereg prowadzonych badań na temat zrozumienia i zoptymalizowania metod biologicznej ochrony roślin, w celu zminimalizowania nadmiernego wykorzystania syntetycznych substancji chemicznych, które prowadzą do zubożenia gleby, a także zachwiania równowagi mikrobiologicznej wpływającej na prawidłowe działanie ekosystemu (Castoria i in. 2001, Schena i in. 2002, Zalar i in. 2008, Sharma i in. 2009).

Zrozumienie procesów działania antagonisticznych mikroorganizmów pozwoli na udoskonalenie ich efektywności, a ponadto starannie wyselekcjonowane szczepy mogą stanowić podstawę preparatów stosowanych w biologicznej ochronie roślin. Wykorzystanie *A. pullulans* może mieć istotne znaczenie w biokontroli, ponieważ przypisuje się mu silne działanie antagonisticzne wobec innych mikroorganizmów (Chi i in. 2009).

2. Materiał i metody

2.1. Grzyby strzępkowe i izolaty grzybów drożdżopodobnych

Fitopatogenne grzyby strzępkowe z gatunków *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum* i *Fusarium oxysporum* zdeponowane w kolekcji Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywnienia Człowieka Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie były przechowywane na skosach z agaru brzezczkowego w temperaturze 4°C.

Materiał do badań stanowiło 25 izolatów grzybów drożdżopodobnych, pozyskanych ze środowiska naturalnego (izolaty pobrano m.in. z liści czereśni, moreli, orzecha włoskiego, gruszy, kwiatu jabłoni, kłosów i ziarna pszenicy oraz liści i kwiatów winogron), przechowywanych w temperaturze 4°C na skosach z agaru brzezczkowego.

2.2. Selekcja grzybów drożdżopodobnych zdolnych do inhibicji rozwoju pleśni

W celu oceny zdolności środowiskowych izolatów *Aureobasidium* sp. do hamowania rozwoju wybranych gatunków grzybów strzępkowych (*A. alternata*, *B. cinerea*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*) przeprowadzono eksperyment *in vitro* na płytkach Petriego. W tym celu wykorzystano zawiesinę grzyba drożdżopodobnego w 0,8 % roztworze soli fizjologicznej, doprowadzoną do 5° gęstości optycznej zgodnie ze skalą McFarlanda.

Na zestalony agar brzezczkowy, w dwóch równoległych punktach, nakropiono po 40 µl zawiesiny drobnoustroju i pozostawiono na 30 minut do wchłonięcia. Po upływie określonego czasu w tych samych punktach umieszczano fragmenty grzybni. W przypadku próby kontrolnej, na płytki nanoszono płyn fizjologiczny.

Następnie płytki inkubowano w temperaturze 27°C przez 6 dni. Drugiego, trzeciego i szóstego dnia inkubacji przeprowadzano kontrolny pomiar dwóch prostopadłych średnic grzybni. W dalszym etapie obliczano stopień inhibicji grzybni ze wzoru:

$$\left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100 \%$$

gdzie: A- średnica grzybni w próbie badanej, B- średnica grzybni w próbie kontrolnej.

Do dalszych analiz wybrano izolaty odznaczające się najszerszym spektrum działania na fitopatogeny.

2.3. Oznaczenie zewnątrzkomórkowych enzymów litycznych

Wytypowane izolaty przeszczepiano ze skosów brzezczkowych za pomocą ezy do wcześniej przygotowanej pożywki płynnej. Skład pożywki (g/dm³): ekstrakt drożdżowy 3,00; (NH₄)₂SO₄ 5,00; KH₂PO₄ 5,00; glukoza lub chityna 5,00.

Kolby przeniesiono na wytrząsarkę Minitron (Infors AG) i inkubowano przez 7 dni w temperaturze 28 °C przy 200 obr./min. W celu określenia aktywności β-1,3-glukanazy i chitynazy oraz stężenia białka pobierano próbki hodowli w drugim, piątym i siódmym dniu. Próbkę wirowano przez 15 min przy 10000 obr./min po czym supernatant przeznaczono do dalszych oznaczeń.

Oznaczanie aktywności β-1,3-glukanazy

W badaniu jako substrat dla enzymu wykorzystano laminarynę (Sigma-Aldrich) w postaci 1 % roztworu (procent masowy) w 0,1- molowym buforze octanowym o pH= 4,8. Do 180 µl roztworu laminaryny dodawano 20 µl odwirowanego płynu pohodowlanego. Mieszaninę następnie inkubowano w temperaturze 50 °C przez 50 min. Ilość uwolnionych cukrów redukujących oznaczano kolorymetrycznie metodą Millera. W celu eliminacji wpływu tła na wartość absorbancji próby badanej, przygotowano również próbę zawierającą 20 µl supernatantu i 180 µl buforu octanowego oraz próbę złożoną ze 180 µl roztworu 1 % laminaryny i 20 µl buforu, które poddano inkubacji w takich samych warunkach jak próbę badaną.

Oznaczanie aktywności chitynazy

Substratem dla oznaczanego enzymu był 0,25 % koloidalny roztwór chityny. Do 5 ml stężonego kwasu ortofosforowego dodano 0,25 g chityny natywnej (Sigma-Aldrich) i pozostawiono na 1 h w temperaturze pokojowej do napełnienia. Po dodaniu 100 ml wody destylowanej ustalono pH = 5,0 i dodano 0,1 g azydku sodu. Następnie mieszaninę odwirowano przy 1400 obr./min przez

15 min, a osad zawieszono w 50 ml 0,1 M buforu octanowego (pH = 4,8) i zhomogenizowano. W tym celu wykorzystano homogenizator CAT Unidrive x 1000 (15 min, 15000/min). Do 100 µl odwirowanej cieczy pohodowlanej dodawano 100 µl roztworu koloidalnego chityny, następnie mieszaninę inkubowano w 50 °C przez 1h. Ilość uwolnionych w reakcji cukrów redukujących oznaczano metodą Millera. Przygotowano również próby zawierające 100 µl roztworu chityny i 100 µl buforu octanowego oraz 100 µl supernatantu i 100 µl buforu octanowego, które inkubowano w takich samych warunkach.

Pomiar stężenia białka metodą Bradforda

Metoda ta opiera się na zjawisku tworzenia kompleksu białka z barwnikiem Coomassie Brilliant Blue G-250, którego maksimum absorpcji przypada na falę o długości 595 nm. Wartość absorpcji zależy wprost proporcjonalnie od stężenia białka w badanym roztworze. Stężenie białka w badanych próbach obliczano na podstawie krzywej wzorcowej dla przygotowanych roztworów albuminy o stężeniach: 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 mg/ml (Bio-Rad). Do 20 µl roztworu albuminy lub filtratu pohodowlanego dodawano 1 ml odczynnika Bradforda (Bio-Rad). Po upływie 5 minut dokonywano pomiaru absorpcji. Próbę zerową stanowiła woda.

Interpretacja wyników oznaczeń

Dla obu enzymów obliczano aktywność ogólną i specyficzną. Za jednostkę aktywności ogólnej przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia 1 µmol glukozy w ciągu 1 min w warunkach reakcji. Obliczano ją ze wzoru: $\frac{S}{0,18 \times T}$, gdzie:

S - stężenie glukozy odczytowane z krzywej wzorcowej, T - czas inkubacji (min).

Aktywność specyficzną enzymu obliczano jako iloraz aktywności ogólnej (U) i stężenia białka w badanym roztworze.

2.4. Oszacowanie produkcji związków lotnych

Zdolność grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Aureobasidium* do syntezy lotnych metabolitów hamujących namnażanie patogenów badano *in vitro* na płytkach Petriego. Agar brzezkowy wylewano zarówno na dno, jak i wieczko płytki. Po zestaleniu na spodnią warstwę szalki nakładano centralnie fragment grzybni, natomiast warstwę wierzchnią zaszczepiono za pomocą ezy grzybami drożdżopodobnymi w postaci biegnącej przez środek rysy. Próbę kontrolną stanowiły płytki, których wieczka nie zostały zaszczepione drożdżakami. Następnie płytki inkubowano 6 dni w temperaturze 28 °C.

Po dwóch, trzech i sześciu dniach inkubacji dokonywano pomiaru dwóch prostopadłych średnic grzybni. Stopień zahamowania wzrostu grzybni obliczano ze wzoru:

$$\left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100 \%$$

gdzie: A- średnica grzybni w próbie badanej, B- średnica grzybni w próbie kontrolnej

2.5. Identyfikacja wyselekcjonowanych izolatów

Identyfikację szczepów przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Gene MATRIX Bacterial&Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx) według instrukcji producenta. Materiał do izolacji DNA stanowiła hodowla na skosie brzezkowym.

Wyizolowane DNA stanowiło matrycę w reakcji ITS-PCR, której zamierzeniem była amplifikacja gatunkowo wysoce zmiennych niekodujących sekwencji ITS1 i ITS2 położonych pomiędzy sekwencjami kodującymi podjednostki rybosomów (Martin i Rygiewicz 2005). W tym celu użyto specyficznych dla drożdży i grzybów starterów ITS1 oraz ITS4 o sekwencji: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGGGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Reakcję przeprowadzono w termocyklerze T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) zgodnie z poniższym schematem: Denaturacja wstępna 95°C, 3 min > (Denaturacja 95°C, 3 min > Przyłączenie starterów 60°C, 30 sekund > Elongacja 72°C, 30 sekund) x 40 cykli > Wydłużanie końcowe 72°C, 8 min.

Produkty reakcji PCR zostały zsekwencjonowane w laboratorium Nexbio Sp. z o. o. (Lublin). Na każde oznaczenie użyto po 20 µl produktu PCR i 10 µl odpowiedniego startera.

Otrzymane chromatogramy przeanalizowano za pomocą programu Finch TV. Dla otrzymanych sekwencji następnie poszukiwano odpowiadających rekordów w bazie GeneBank wykorzystując wyszukiwarke BLAST.

3. Wyniki

3.1. Selekcja grzybów drożdżopodobnych zdolnych do inhbicji rozwoju pleśni

Pomiaru średnicy grzybni patogenów dokonywano po dwóch, trzech oraz sześciu dniach inkubacji. Poniżej przedstawiono wyłącznie wyniki z szóstego dnia hodowli, ponieważ wiele izolatów wykazywało wysoki potencjał biokontrolny wyłącznie do trzeciego dnia obserwacji, co z kolei wynikać mogło z potrzebnego pleśniom czasu do adaptacji do warunków środowiska, a nie ochronnego wpływu drożdży.

Izolaty uznano za antagonistyczne jeżeli stopień inhbicji wzrostu danego patogenu był równy co najmniej 50 %. Spośród 25 izolatów 17 (68 %) hamowało wzrost grzybni *B. cinerea* (maksymalna wartość hamowania równa 100 %). W przypadku *A. alternata* nie uzyskano wyników przekraczających 50 %, dlatego wyszczególniono najlepsze z nich, wykazujące około 40 % stopień inhbicji.

Grzyb drożdżopodobny z rodzaju *Aureobasidium* nie wykazał inhbicji patogenów z rodzaju *Fusarium*. Patogeny te całkowicie przeraślały szalki, dlatego pominięto je w poniższym zestawieniu tabelarycznym.

Tab. 1. Średnice grzybni patogenów i stopień hamowania ich wzrostu przez badane izolaty *Aureobasidium*.

Nazwa izolatu	Średnica grzybni <i>Alternaria alternata</i>	Stopień inhbicji (%)	Średnica grzybni <i>Botrytis cinerea</i>	Stopień inhbicji (%)
Kontrola	70	-	28	-
23-3	41	41,43	10	64,29
24-2	41	41,43	5	82,14
24-3	60	14,29	10	64,29
24-4	48	31,43	22	21,43
25-1	48	31,43	8	71,43
26-5	55	21,43	20	28,57
26-G7	51	27,14	11	60,71
30-J2	46	34,29	11	60,71
30-J3	54	22,86	6	78,57
31-2	52	25,71	11	60,71
55	60	14,29	12	57,14
58	60	14,29	20	28,57
66	51	27,14	9	67,86
69	55	21,43	8	71,43
W1B	58	17,14	5	82,14
W1F5	55	21,43	5	82,14
W1F7	39	44,29	7	75,00
W2F2	52	25,71	5	82,14
W2F5	42	40,00	8	95,43
W2F6	56	20,00	0	100,00
W3F1	50	28,57	12	57,14
W3F2	55	21,43	20	28,57
W3F4	48	31,43	10	74,29
W3F5	58	17,14	16	42,86
W3F7	51	27,14	11	70,71

Spośród izolatów wykazujących największe zdolności do inhibicji wzrostu patogenów wyselekcjonowano pięć o najszerszym spektrum działania, a następnie zostały one poddane dalszym analizom.

3.2. Oznaczanie aktywności enzymów litycznych

Aktywność ogólną β -1,3-glukanazy i chitynazy obliczano w oparciu o krzywą wzorcową dla glukozy, której równanie było następujące $y = 1,2405 x - 0,0153$. Natomiast stężenie białka niezbędne do oznaczenia aktywności specyficznej enzymów określano na podstawie równania: $y = 1,0756 x + 0,6404$.

Aktywność ogólna β -1,3-glukanazy niezależnie od źródła węgla zmieniała się w czasie, w większości przypadków najwyższą odnotowano 7. dnia. W przypadku użycia chityny jako induktora syntezy enzymu zaobserwowano niewielki spadek aktywności. Posługując się glukozą jako źródłem węgla zaobserwowano wyższą aktywność ogólną i specyficzną β -1,3-glukanazy w odniesieniu do wariantów, w których do pożywki dodawano chitynę. Izolat 66 odznaczał się najwyższą aktywnością ogólną i specyficzną w pożywce z glukozą w próbie pobranej 2 dnia hodowli. W przypadku wykorzystania chityny jako źródła węgla izolat W2F5 wykazywał najwyższą aktywność ogólną oraz specyficzną w drugim dniu hodowli. Większość izolatów przejawiała tendencję wzrostową aktywności ogólnej, jednak nie można stwierdzić jednoznacznej zależności. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Aktywność ogólna i specyficzna β -1,3-glukanazy syntetyzowanej przez wybrane szczepy *Aureobasidium* w czasie trwania (2, 5 i 7 dzień hodowli) w odniesieniu do wybranego induktora syntezy enzymu.

Źródło węgla – glukoza						
Nazwa izolatu	Aktywność ogólna ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$)			Aktywność specyficzna (U^*/mg białka)		
	2 dni	5 dni	7 dni	2 dni	5 dni	7 dni
23-3	11,71	17,09	26,36	495,93	723,51	1116,08
66	29,63	24,92	18,74	1455,01	1224,06	920,52
W1F7	15,52	20,67	40,24	598,25	796,80	1551,30
W2F5	8,58	22,24	28,74	394,22	1022,08	861,51
W3F4	11,26	21,12	24,12	842,32	1579,14	1803,53
Źródło węgla – chityna						
23-3	5,67	17,09	29,04	340,42	1026,65	1745,17
66	10,82	18,21	24,12	709,34	1193,98	1581,70
W1F7	13,05	20,89	16,73	2379,95	3808,74	3049,44
W2F5	15,07	26,27	36,88	1087,88	1896,11	2662,31
W3F4	10,59	20,67	21,21	764,59	1491,99	1530,79

* aktywność ogólna

Aktywność ogólna chitynazy niezależnie od źródła węgla zmieniała się w czasie, dla większości szczepów najwyższą odnotowano w próbach z 2. dnia hodowli (tabela 3). W przypadku użycia chityny jako induktora syntezy enzymu zaobserwowano niewielki wzrost aktywności. Dla aktywności specyficznej nie można zdefiniować stałej zależności. Najwyższą aktywnością ogólną i specyficzną w pożywce z glukozą odznaczał się izolat 66. Natomiast najwyższą aktywnością ogólną

i specyficzną w pożywce z chityną odznaczał się szczep W3F4. Podsumowując, glukoza okazała się lepszym induktorem syntezy chitynaz niż chityna.

Tab. 3. Aktywność ogólna i specyficzna chitynazy produkowanej przez wybrane szczepy *Aureobasidium* podczas trwania eksperymentu (2, 5 i 7 dzień hodowli) w zależności od wybranego induktora syntezy enzymu.

Źródło węgla – glukoza						
Nazwa izolatu	Aktywność ogólna ($\mu\text{mol}/\text{cm}^3 \times \text{min}$)			Aktywność specyficzna (U/ mg białka)		
	2 dni	5 dni	7 dni	2 dni	5 dni	7 dni
23-3	19,97	23,19	40,79	845,45	982,00	1727,13
66	93,05	68,06	50,23	4570,26	3342,90	2466,78
W1F7	44,69	25,34	22,23	1722,74	976,88	857,09
W2F5	54,36	44,95	23,86	2498,69	2066,39	1096,72
W3F4	23,73	21,85	20,93	2531,72	2331,02	2233,27
Źródło węgla – chityna						
23-3	53,02	46,03	19,30	3185,71	2765,90	1159,87
66	48,99	29,37	21,91	3212,74	1926,23	1436,74
W1F7	41,46	28,83	14,75	2791,46	1941,17	992,75
W2F5	16,20	18,89	36,88	1169,67	1363,65	2662,27
W3F4	56,78	49,25	16,37	4098,70	3555,57	1181,93

3.3. Określenie wpływu lotnych metabolitów grzybów drożdżopodobnych na fitopatogeny grzybowe

Wpływ lotnych metabolitów wyselekcjonowanych izolatów grzybów drożdżopodobnych oceniano w drugim, trzecim i szóstym dniu hodowli. Poniżej przedstawiono wyniki pomiarów średnic grzybni wykonanych 6. dnia hodowli, ponieważ uznano je za najbardziej miarodajne i najlepiej ukazujące potencjał biokontrolny badanych drożdży (największe różnice pomiędzy średnicą grzybni w próbie badanej i kontrolnej), w związku z tym pozostałe dane pominięto w podsumowaniu tabelarycznym.

Tab. 4. Ocena hamującego wpływu lotnych metabolitów wybranych izolatów grzybów drożdżopodobnych wobec *A. alternata* oraz *B. cinerea*.

Nazwa izolatu	Średnica grzybni (mm) <i>Alternaria alternata</i>	Stopień inhibicji [%]	Nazwa izolatu	Średnica grzybni (mm) <i>Botrytis cinerea</i>	Stopień inhibicji [%]
KONTROLA	60	-	KONTROLA	22	-
23 - 3	43,5	27,5	23 – 3	5	80
66	10	83,3	66	5	80
W1F7	10	83,3	W1F7	5	80
W2F5	22,5	62,5	W2F5	5	80
W3F4	26,5	55,8	W3F4	5	80

Stopień inhibicji wzrostu grzybnia *A. alternata* wyniósł do 83,3 %. Najwyższe aktywności odnotowano dla izolatów 66 i W1F7. W przypadku *B. cinerea* bardzo dobry hamujący efekt wykazały wszystkie wybrane izolaty. Odnotowano 80 % stopień inhibicji.

3.4 Identyfikacja gatunkowa izolatów grzybów drożdżopodobnych

Reakcja ITS-PCR pozwoliła na zamplifikowanie wysoce zmiennych niekodujących sekwencji ITS1 oraz ITS2 położonych pomiędzy sekwencjami kodującymi podjednostki rybosomów. Produkty reakcji PCR poddano sekwencjonowaniu z użyciem startera ITS4. Otrzymane sekwencje zostały poddane analizie bioinformatycznej.

Wyszukiwanie identycznych sekwencji w bazie danych GeneBank za pomocą narzędzia BLAST wykazało, że wybrane izolaty szczepów należą do gatunku *Aureobasidium pullulans*. Stopień pokrewieństwa oscylował w granicach 99% (dla izolatów 23-3, W1F7, W2F2) - 100% (dla izolatów 66 oraz W3F4).

4. Dyskusja

Skuteczność *A. pullulans* do zapobiegania występowania chorób grzybiczych na różnych owocach została już udokumentowana przez wielu autorów. Antagonistyczna aktywność obejmuje głównie konkurencję o składniki odżywcze, wytwarzanie lotnych związków organicznych, a także glukaz, chitynaz i proteaz (Zhang in. 2012).

Pierwszym etapem eksperymentu w tejsze pracy było wyłonienie spośród 25 izolatów *Aureobasidium* szczepów charakteryzujących się najwyższym potencjałem biokontroli. Zdolności te oceniano na podstawie stopnia inhibicji wzrostu grzybnia patogenu. W powyższym badaniu odnotowano 95 % stopień inhibicji (dla izolatu W2F5) wobec *B. cinerea* oraz 44 % stopień inhibicji (dla izolatu W1F7) wobec *A. alternata*.

Aktywność antagonistyczną względem fitopatogennych grzybów, takich jak *B. cinerea* badali między innymi Ippolito i Nigro (2000) i stwierdzili, że *A. pullulans* stosowany po zbiorze zmniejszył częstość występowania szarej pleśni na jabłkach o 89 %. Natomiast Schena i in. (2002) w ciągu dwuletniego eksperymentu aplikując *A. pullulans* po zbiorze osiągnęli redukcję *B. cinerea* w zakresie z 32 do 80 % (owoce czereśni) i z 59 do 64 % (owoce winogron).

W badaniach własnych wstępna selekcja *in vitro* wykluczyła zdolności antagonistyczne grzybów drożdżopodobnych wobec *F. culmorum* oraz *F. oxysporum*, patogeny te okazały się całkowicie odporne. Zbieżne wyniki uzyskała w swoich badaniach Jamiołkowska i Thanoon (2016). Badany mikroorganizm nie hamował na szalkach wzrostu *F. culmorum* oraz *F. oxysporum*. Wyniki uzyskane w doświadczeniu świadczyły, że patogeny te są silnymi konkurentami.

Inne badania dowodzą, że *A. pullulans* wykazuje zdolność do syntezy enzymów hydrolizujących ścianę komórkową grzybów strzępkowych, przede wszystkim glukaz i chitynaz. Jest to powszechna cecha u wielu efektywnych czynników kontroli biologicznej. W związku z tym kolejnym etapem niniejszej pracy była ocena aktywności enzymów hydrolitycznych produkowanych przez badany drobnoustrój. W tym celu z płynnych podłoży hodowlanych pobierano próbki w drugim, piątym oraz siódmym dniu hodowli w celu oceny aktywności ogólnej enzymów hydrolitycznych (β -1,3-glukanazy oraz chitynazy).

Badania własne pokazują, że aktywność ogólna β -1,3-glukanazy była znacznie wyższa niż chitynazy, jednak ciężko jest określić specyficzną zależność w obrębie badanych izolatów. Aktywność ta w zależności od izolatu rosła bądź malała w miarę upływu czasu. W przypadku aktywności chitynaz zależność ta również była niespecyficzna.

W badaniach przeprowadzonych przez Sharma i in. (2009) aplikacja zawiesiny komórek *A. pullulans* wiązała się ze wzrostem aktywności β -1,3-glukanazy, chitynazy oraz peroksydazy, co przełożyło się na ochronę jabłek przed skażeniem *P. expansum*. Zdolność *A. pullulans* do wytwarzania chitynazy opisywali też inni autorzy (Rajulu i in. 2011).

W niniejszej pracy oceniano również wpływ związków lotnych wydzielanych przez grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Aureobasidium sp.* na wzrost grzybnia *A. alternata* oraz *B. cinerea*. Lotne metabolity izolatu 66 oraz W1F7 ograniczały rozwój grzybnia *A. alternata* w 83,3 %, natomiast izolaty 23-3, 66, W1F7, W2F5 oraz W3F4 w 80 % hamowały wzrost *B. cinerea*. Wyniki te mogą świadczyć

o tym, że wydzielanie substancji lotnych jest głównym mechanizmem oddziaływania tych drobnoustrojów na patogen.

Według Mari i in. (2012) w bezkontaktowych hodowlach *in vitro* przeciwgrzybicze mechanizmy działania *A. pullulans* szczepów L1 i L8 na wzrost grzybni patogennych można przypisać wytwarzaniu lotnych związków organicznych. Dane szczepy znacząco hamowały wzrost *B. cinerea* w porównaniu z próbą kontrolną. Również w badaniach prowadzonych *in vivo* przez Di Francesco i in. (2015) metabolity wtórne wytwarzane przez antagonistów hamowały istotnie kiełkowanie *B. cinerea*. Stopień inhibicji dla *A. pullulans* szczepu L1 i L8 wynosił kolejno 88,9 % i 94,4 %.

W czasie prowadzenia badań własnych mających na celu określenie mechanizmu oddziaływania wyselekcjonowanych grzybów drożdżopodobnych na fitopatogeny grzybowe zaobserwowano, że część z kolonii grzybów drożdżopodobnych tworzyła śluzowatą otoczkę wokół kolonii grzyba. Takie zjawisko opisał Sharma i in. (2009) w swoich badaniach, przedstawiając to zjawisko jako swego rodzaju tworzącą się barierę ochronną drożdży.

W celu identyfikacji gatunkowej wyselekcjonowanych grzybów drożdżopodobnych wykorzystano metodę ITS-PCR. Technikę tę do określenia gatunkowej przynależności wykorzystali również Martin i Rygiewicz (2005). Badania własne wykazują jednak, że analiza sekwencji produktów uzyskanych w reakcji ITS-PCR nie zawsze pozwala na jednoznaczne przyporządkowanie odmiany do gatunków. Spośród siedmiu izolatów, dwa (66 oraz W3F4) wykazywały 100- procentowe podobieństwo z sekwencją umieszczoną w bazie GenBank, dla pozostałych stopień pokrewieństwa wynosił 99 %. Wszystkie izolaty zostały zidentyfikowane jako *Aureobasidium pullulans*, obserwacje ich morfologii pozwalają wnioskować, że są to *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans*. W celu uzyskania dokładniejszych wyników identyfikację można wykonać w oparciu o powielanie sekwencji regionu D1/D2 podjednostki 26 rDNA. Tą metodą Zalar i in. (2008) wyróżnili dwie odmiany *A. pullulans* var. *pullulans* oraz *A. pullulans* var. *melanogenum*.

Podsumowując, niniejsze wyniki własne jak i przytoczonych naukowców wskazują, że *A. pullulans* ma potencjał jako środek wykorzystywany w biokontroli do zwalczania *B. cinerea* oraz *A. alternata*. Zdolności antagonistyczne grzybów drożdżopodobnych z gatunku *A. pullulans* wobec patogenów przejawiają się głównie w rywalizacji o składniki odżywcze i zajmowaną przestrzeń, wydzielanie lotnych metabolitów oraz sekrecję enzymów hydrolitycznych.

5. Wnioski

1. Najskuteczniejszym spośród izolatów w zwalczaniu *A. alternata* okazał się izolat W1F7, natomiast wobec patogenu *B. cinerea* najskuteczniejszy był izolat W2F5.
2. Wstępna selekcja wykluczyła zdolności antagonistyczne grzybów drożdżopodobnych wobec *F. culmorum* oraz *F. oxysporum*.
3. Zaobserwowano dużą wrażliwość grzyba *A. alternata* na lotne metabolity produkowane zwłaszcza przez izolaty 66 oraz W1F7- stopień inhibicji w obu przypadkach wynosił 83,3 %.
4. Wszystkie izolaty zostały zidentyfikowane jako *Aureobasidium pullulans*.
5. Głównym, zaobserwowanym mechanizmem oddziaływania badanych szczepów była antybioza oraz konkurencja o składniki odżywcze oraz zajmowaną przestrzeń.

6. Literatura

- Castoria R., De Curtis F, Lima G, i in. (2001) *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology* 22: 7-17.
- Chi Z, Wang F, Chi Z, i in. (2009) Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82: 793-804.
- Di Francesco A, Ugolini L, Lazzeri L, Mari M (2015) Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control* 81: 8-14.

- Ippolito A, Nigro F (2000) Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* 19: 715-723.
- Jamiołkowska A, Thanoon AH (2016) Diversity and biotic activity of fungi colonizing pumpkin plants (*cucurbita pepo* l.) grown in the field. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 19 (4).
- Mari M, Martini C, Spadoni A, i in. (2012) Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology* 73: 56-62.
- Martin K, Rygiewicz P (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5: 28.
- Mounir R, Durieux A, Bodo C, i in. (2007) Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnology Letters* 29: 553-559.
- Rajulu MBG, Thirunavukkarasu N, Suryanarayanan TS, i in. (2011) Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. *Fungal Divers* 47: 43-53.
- Schena L, Sialer MF, Gallantly D (2002) Molecular detection of strain L47 of *Aureobasidium pullulans*, a biocontrol agent of postharvest diseases. *Plant Disease Journal* 86: 54-60.
- Sharma RR, Singh D, Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control* 50: 205-220.
- Wagner A, Hetman B, Kopacki M, i in. (2013) Laboratory effect of Boni Protect containing *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnoud in the control of some fungal diseases of apple fruit. *Acta Agrobotanica* 66 (1): 77-88.
- Zalar P, Gostinčar C, De Hoog GS, i in. (2008) Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* 61: 21-38.
- Zhang D, Spadaro D, Garibaldi A, i in. (2012) Selection and evaluation of new antagonists for their efficacy against postharvest brown rot of peaches. *Postharvest Biology and Technology* 55: 174-181.

7. Zawartość garbników w wyciągach z lawendy lekarskiej (*Lavandula angustifolia*)

The content of tannins in lavender extracts (*Lavandula angustifolia*)

Adaszyńska-Skwirzyńska Michalina

Zakład Hodowli Ptaków Użytkowych i Ozdobnych, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Adaszyńska-Skwirzyńska Michalina: madaszynska@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: lawenda lekarska, garbniki, wyciągi ziołowe

Streszczenie

Celem badań było porównanie zawartości garbników w surowcach zielarskich na przykładzie lawendowych wyciągów wodnych. W badaniach wykorzystano kwiaty i ulistnione łodygi dwóch doświadczalnych odmian lawendy lekarskiej (*Lavandula angustifolia*) pochodzących z uprawy Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie oraz kwiaty lawendy pochodzenia handlowego. Zawartość garbników w wyciągach wodnych oznaczano z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej UV-VIS. Po porównaniu składu wyciągów wodnych w różnych odmian i części morfologicznych *Lavandula angustifolia* stwierdzono, że wyciągi charakteryzują się zróżnicowaną zawartością garbników. Najwyższą zawartością garbników charakteryzował się susz ulistnionych łodyg odmiany Ellagance Purple – 0,48%, natomiast najniższą 0,15% – kwiaty lawendy handlowej. W trakcie przeprowadzania eksperymentu nie stwierdzono jednoznacznej zależności pomiędzy zawartością procentową garbników a odmianą czy częścią morfologiczną surowca poddawanego badaniom. W odmianie Blue River więcej garbników oznaczono w kwiatach, natomiast w odmianie Ellagance Purple odwrotnie.

1. Wstęp

Garbniki są to bezazotowe organiczne związki chemiczne o dużej masie cząsteczkowej (500-3000), rozpuszczalne w wodzie. Pod względem budowy chemicznej wyróżniamy garbniki hydrolizujące (galotanoidy oraz elagotanoidy) oraz skondensowane (garbniki katechinowe). Związki garbnikowe mają charakter polifenoli i charakteryzują się zdolnością do tworzenia trwałych połączeń z białkami i innymi makrocząsteczkami (Chung i in. 1998). Charakteryzują się ponadto działaniem przeciwzapalnym, ściągającym, przeciwutleniającym oraz przeciwnowotworowym (Chung i in. 1998; Kohlmünzer 2003). Według danych literaturowych zawartość garbników w lawendzie może sięgać 12% (Chu i Kemper 2001). Jednakże dane literaturowe są bardzo zróżnicowane. W badaniach innych autorów stwierdzono, że zawartość garbników w kwiatach mieści się w przedziale 0,05–2,77%, w liściach 0,03–3,18%, natomiast w łodygach 0,19–1,38% (Błazeković i in. 2010; Błazeković i in. 2011; Komes i in. 2011).

Rodzaj *Lavandula* wchodzący w skład rodziny *Lamiaceae* obejmuje ponad czterdzieści gatunków oraz wiele podgatunków i odmian. Jednak najpopularniejszym gatunkiem jest lawenda wąskolistna *Lavandula angustifolia* Mill. (dawniej synonim *L. officinalis* Chaix lub *L. vera*), nazywana zwyczajowo lawendą lekarską, prawdziwą lub zwyczajną (Prusinowska i Śmigiełski 2014). Lawenda lekarska należy do najczęściej uprawianych roślin olejkowych używanych w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym oraz chemiczno-kosmetycznym (Chu i Kemper 2001; Lis-Balchin 2002; Denner 2009; Verma i in. 2010; Kara i Baydar 2013; Seidler-Łożykowska i in. 2014). Ze względu na walory ozdobne lawenda cieszy się coraz większą popularnością występowania i uprawy tego gatunku w Polsce. Często można ją znaleźć w ogrodach, gdzie uprawiana jest jako roślina ozdobna, oraz ze względu na właściwości repelentne (Nartowska 2012). Roślina dorasta do 60 cm wysokości i 70 cm szerokości. Korzeń jest wiązkowy, silnie rozgałęziony, sięgający do głębokości ponad 4 m. Liście są lancetowate, o szaro-zielonym zabarwieniu o podwiniętych brzegach. Łodyga kwiatonośna jest przeważnie nierozgałęziona o długości 10–25 cm, w dolnej części zdrewniała,

natomiast w górnej zielona, zakończona jest zwartym kłosem kwiatowym o długości 4–8 cm. Kwiaty składają się z pięciodziałowego kielicha oraz korony o charakterystycznym zabarwieniu, są małe koloru fioletowo-niebieskiego, fioletowego, różowego a nawet białego w zależności od odmiany (Lis-Balchin, 2002). Do najpopularniejszych odmian lawendy wąskolistnej *Lavandula angustifolia* Mill. zaliczamy: *Munstead*, *Munstead Strain*, *Hidcote Blue*, *Hidcote Pink*, *Dwarf Blue*, *Nana Alba*, *Rosea*, *Lavender Lady* (Lis-Balchin 2002). Lawenda może być rozmnażana wegetatywnie lub z nasion. Intensywnie rozwija się na glebach zasadowych i suchych, w łagodnym klimacie o dobrym nasłonecznieniu oraz miejscach osłoniętych od wiatru. Podczas mroźnych zim roślina przemarza, jednakże łatwo odbija, lecz ze zmniejszeniem plonu kwiatów. Roślina zaadaptowała się także w krajach Skandynawskich, gdzie przed przemarzeniem chroni ją warstwa śniegu. (Prusinowska i Śmigielski 2014). Surowiec zielarski zaczyna kwitnąć w czerwcu, a zbiór ziola następuje w pełnym okresie kwitnienia, na przełomie lipca i sierpnia. Przeznaczenie kwiatostanów jest uwarunkowane od stopnia kwitnienia. Prusinowska i Śmigielski (2014) opisują sześć stopniową skalę dojrzałości kwiatów. Jeżeli mają one być przeznaczone na bukiety idealnym terminem zbioru jest pierwsza i druga faza kwitnienia, gdyż po tym okresie lawenda jest bardziej podatna na łamanie. Najlepszym okresem na zebranie kwiatów przeznaczonych na susz jest trzeci okres kwitnienia, ponieważ odrywanie kwiatostanów od łodygi jest ułatwione. Natomiast piąta (połowa pączków, połowa kwiatków, niektóre otwarte) i szósta (kilka pączków i kilka kwiatków, większość przekwitnięta) faza kwitnienia charakteryzuje się największą zawartością olejków eterycznych (Prusinowska i Śmigielski 2014).

Skład chemiczny lawendy jest skomplikowaną mieszaniną substancji chemicznych. Z całego zespołu tych substancji, tylko niektóre charakteryzują się działaniem biologicznym – są to tzw. substancje aktywne surowca. Aktywność tych substancji daje wyraźne rezultaty, gdy surowiec cechuje ich odpowiednia zawartość (Kohlmünzer, 2003). Dlatego zasadne jest określenie zawartości substancji biologicznie aktywnych w różnych odmianach surowca farmakognostycznego, którym jest lawenda lekarska. Surowce roślinne, takie jak lawenda, są wykorzystywane do sporządzania naparów, odwarów i maceratów. Jednakże najpopularniejsze wykorzystanie w preparatach leczniczych oraz kosmetycznych mają wyciągi z suszonych ziół. Wyciągi otrzymywane są przez wytrawienie surowca określonym rozpuszczalnikiem. Najczęściej wykorzystywana jest woda i alkohol etylowy oraz ich mieszaniny, natomiast w przypadku otrzymywania wyciągów jako półproduktów stosuje się także inne rozpuszczalniki (np. glicerynę, glikole, oleje roślinne) (Janicki i in. 2008; Hans-Jörg 2011; Bone i Mills 2013). Ze względu na rosnące zapotrzebowanie przemysłu na różnorodne ekstrakty roślinne o właściwościach leczniczych i kosmetycznych, poszukuje się coraz to nowych ziół, które są przetwarzane z wykorzystaniem różnych metod ekstrakcyjnych. W celu wyodrębnienia składników aktywnych z materiału roślinnego należy przeprowadzić następujące etapy: rozdrobnienie, wyodrębnienie (ekstrakcja), filtracja, zateżnienie oraz suszenie (Handa i in. 2008). Współczesny przemysł farmaceutyczny i chemiczno-kosmetyczny charakteryzuje się swoją dynamiką i nieustannie reaguje na zmieniające się wymagania rynku. Szczególnie wyraźna jest dynamika przemysłu kosmetycznego, w którym producenci w szybkim tempie wprowadzają do obrotu artykuły, w których składzie obecne są coraz nowsze ekstrakty roślinne. Ich wykorzystanie wiąże się z wielokierunkowym działaniem (przeciwnodniekującym, stymulującym odnowę tkanek, łagodzącym, przeciwzapalnym). W związku z stale rosnącą popularnością roślinnych substancji biologicznie aktywnych wykonywane są coraz bardziej szczegółowe badania nad możliwościami wykorzystania stosowanych już oraz nowych surowców roślinnych. Celem badań było porównanie zawartości garbników w kwiatach i ulistnionych łodygach dwóch doświadczalnych odmian lawendy lekarskiej oraz kwiatach pochodzenia handlowego na przykładzie lawendowych wyciągów wodnych.

2. Materiał i metody

Materiał roślinny zastosowany do badań w niniejszej pracy został pozyskany z uprawy doświadczalnej Katedry Ogrodnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Do zbioru i dalszych badań kwalifikowano tylko rośliny kwitnące, nie wykazujące cech wyschnięcia. Zbioru lawendy dokonywano w lipcu w latach 2012–2014. Zebrane surowce zostały oczyszczone i wysuszone w temperaturze pokojowej, po czym umieszczane były w papierowych

torbach. Do momentu rozpoczęcia badań surowce były przechowywane bez dostępu światła w suchym i przewiewnym miejscu. Przed przystąpieniem do badań surowiec rozdzielano na dwie grupy: kwiaty oraz ulistnione łodygi, które następnie były rozdrabniane w moździerzach lub mielone w młynku laboratoryjnym. W eksperymentach wykorzystano następujące surowce zielarskie: kwiaty oraz ulistnione łodygi lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* L.) odmiany Blue River; kwiaty oraz ulistniona łodyga lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* L.) odmiany Ellagance Purple; kwiaty lawendy wąskolistnej (*Lavandula angustifolia* L.) pochodzenia handlowego Zakłady Zielarskie „Kawon” nieznannej odmiany. Średnie miesięczne monitorowane temperatury z poszczególnych lat trwania doświadczenia charakteryzowały się zbliżonymi wartościami i wysoką wartością odchylenia standardowego. Przeprowadzona analiza wariancji (jednoczynnikowa ANOVA) dla całego roku wykazała brak istotnych różnic (na poziomie $\alpha = 0,05$) w temperaturach: powietrza i minimalnej przy gruncie; opadach atmosferycznych czy usłonecznieniu pomiędzy latami 2012 a 2014. Porównując dane tylko z sześciu miesięcy (marzec – sierpień) w okresie wegetacji rośliny, potwierdzono powyższe obserwacje.

Surowiec (5,0 g suszu z kwiatów oraz ulistnionych łodyg) umieszczono w kolbie okrągłodennej o pojemności 250,0 ml dodano 150,0 ml wody i utrzymywano we wrzeniu przez 30 minut w łaźni wodnej. Po upływie określonego czasu mieszaninę schłodzono pod strumieniem bieżącej wody i przeniesiono do kolby miarowej, następnie uzupełniono wodą destylowaną i pozostawiono do całkowitej sedymentacji surowca. Przesącz przefiltrowano przez sączek z bibuły, odrzucono pierwsze 50,0 ml, a pozostały wyciąg użyto do dalszych oznaczeń. Zawartość garbników oznaczono za pomocą metody opisanej w FP VI (Farmakopea Polska VI 2002). Pierwszym etapem było oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli (A_1). W tym celu 5,0 ml przesączu uzupełniono wodą. Następnie do 2,0 ml powstałego roztworu dodano 1,0 ml odczynnika *Folin-Ciocaltau*, 10,0 ml wody i uzupełniono roztworem węglańku sodu. Powstałą próbkę, chroniąc przed światłem, odstawiono na 30 minut. Po upływie tego czasu zmierzono absorbancję przy długości fali 760 nm, a jako odnośnik zastosowano wodę destylowaną.

Drugi etap analizy wykonano w celu oznaczenia polifenoli nie wiążących się z proszkiem skórzanym (A_2). Do 10,0 ml wyciągu roślinnego dodano 0,10 g proszku skórzanego i silnie wytrząsano przez godzinę. Po upływie tego czasu powstały roztwór przesączono przez sączek z bibuły, odmierzone 5,0 ml i uzupełniono wodą. Następnie do 2,0 ml powstałego roztworu dodano 1,0 ml odczynnika *Folin-Ciocaltau*, 10,0 ml wody i uzupełniono roztworem węglańku sodu. Powstałą próbkę, chroniąc przed światłem, odstawiono na 30 minut. Po upływie tego czasu zmierzono absorbancję przy długości fali 760 nm, a jako odnośnik zastosowano wodę destylowaną.

Trzeci etap analizy przeprowadzono w celu pomiaru absorbancji substancji porównawczej (A_3). Bezpośrednio przed oznaczeniem, rozpuszczono 50,0 mg pirogalolu i rozcieńczano wodą destylowaną. Następnie do 2,0 ml powstałego roztworu dodano 1,0 ml odczynnika *Folin-Ciocaltau*, 10,0 ml wody destylowanej i uzupełniono roztworem węglańku sodu. Powstałą próbkę, chroniąc przed światłem, odstawiono na 30 minut. Po upływie tego czasu zmierzono absorbancję przy długości fali 760 nm, a jako odnośnik zastosowano wodę destylowaną.

Zawartość garbników w przeliczeniu na pirogalol ($C_6H_6O_3$) obliczono według wzoru:

$$X = \frac{62,5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot m_2}{A_3 \cdot m_1}$$

gdzie:

X – zawartość garbników [%],

A_1 – absorbancja polifenoli w roztworze badanym,

A_2 – absorbancja polifenoli nie wiążących się z proszkiem skórzanym w roztworze badanym,

A_3 – absorbancja roztworu porównawczego pirogalolu,

m_1 – odważka surowca [g],

m_2 – odważka pirogalolu [g].

Współczynnik zmienności RSD wynosił od 0,4–1,3%.

3. Wyniki i dyskusja

Wyniki dotyczące oznaczenia ilościowego zawartości garbników w różnych częściach lawendy lekarskiej przedstawiono w tabeli 1 wraz z odchyleniem standardowym.

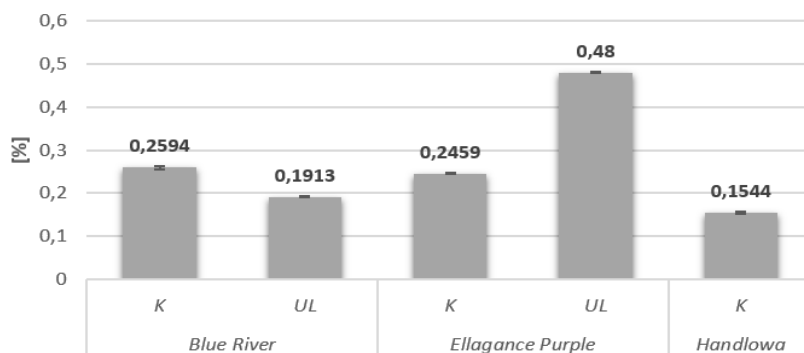
Tab. 1. Średnie wartości absorbancji (A_1 - A_3) oraz zawartość garbników w lawendzie lekarskiej w zależności od odmiany i części rośliny

	Blue River		Ellagance Purple		Handlowa
	K	UL	K	UL	K
A_1	0,72±0,011	0,72±0,004	0,85±0,004	0,97±0,009	0,96±0,003
A_2	0,53±0,003	0,59±0,001	0,68±0,0050	0,64±0,001	0,85±0,002
A_3	0,43±0,004	0,43±0,008	0,43±0,003	0,43±0,0010	0,44±0,003
Garbniki [%]	0,26±0,003	0,19±0,001	0,25±0,002	0,48±0,002	0,15±0,002

n=3; K- kwiaty; UL- ulistnione łodygi

Najwyższą zawartością garbników charakteryzował się susz ulistnionych łodyg odmiany Ellagance Purple – 0,48%, natomiast najniższą 0,15% kwiaty lawendy handlowej. Porównując części rośliny, stwierdzono, że nie odznaczają się wyraźną zależnością. Nie stwierdzono wpływu części rośliny na zawartość garbników. W odmianie Blue River więcej garbników oznaczono w kwiatach, natomiast w odmianie Ellagance Purple odwrotnie.

Rys. 1. przedstawia średnie zawartości procentowe garbników wraz z odchyleniem standardowym w analizowanych próbkach roślinnych.



Rys. 1. Porównanie zawartości garbników w badanych surowcach roślinnych.

W ostatnim czasie znacząco wzrosło zainteresowanie składnikami pokarmowymi pochodzenia roślinnego, o działaniu przeciwutleniającym. Aktywne przeciwutleniacze występują w warzywach, owocach, roślinach strączkowych oraz produktach zbożowych, jak również w dużej ilości ziół (np. w lawendzie lekarskiej). Garbniki należą do substancji aktywnych o działaniu przeciwutleniającym i są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym. Lawenda jest jedną z roślin bogatych w garbniki, o dużym znaczeniu żywieniowym i zdrowotnym. Większość obecnych w lawendzie garbników to katechiny zawierające co najmniej cztery grupy hydroksylowe. Dwie z nich w pierścieniu A (układ *m*-difenolowy) i dwie w pierścieniu B (układ *o*-difenolowy). Taka budowa powoduje, że związki te mogą występować w formach epi- ze względu na możliwość przestrzennej konfiguracji przy C-3 (Lis-Balchin 2002; Kohlmünzer 2003). Garbniki wpływają m.in.

na biologiczną dostępność witamin i związków mineralnych. Tworząc nierozpuszczalne kompleksy z żelazem, zmniejszają jego przyswajalność, co przy spożywaniu nadmiernych ilości herbaty może prowadzić do wystąpienia anemii. Garbnikom przypisuje się także liczne właściwości lecznicze, do których można zaliczyć działanie przeciwbiegunkowe w krwawych biegunkach i poważnych zatruciach pokarmowych, działanie przeciwwzapalne i przeciwkrwotoczne oraz przeciwbakteryjne (Kohlmünzer 2003). Ponadto garbniki spełniają rolę naturalnych przeciwutleniaczy, wykazują działanie przeciwmutagenne, przeciwwirusowe oraz hamują wzrost przeszczepialnych nowotworów (Kohlmünzer 2003). Odpowiedzialne są również za uszczelnianie ścianek naczyń włosowatych, hamowanie przenikania płynu przesiąkowego z kapilar do otaczających je tkanek oraz unieczynnianie histaminy, która powoduje m.in. występowanie zmian uczuleniowych. (Kohlmünzer 2003).

Z przeglądu literatury wynika, zawartość garbników jest zróżnicowana w zależności od pochodzenia lawendy oraz jej części. Zespół Komes oznaczył w ekstrakcie z lawendy od 0,2 do 2,9% garbników w przeliczeniu na suchą masę w zależności od metody ekstrakcji i części rośliny (Komes i in. 2011). Inni autorzy potwierdzają zróżnicowane gromadzenie się garbników w zależności od części lawendy. W kwiatach od 0,02–2,8%, w łodygach od 0,02-1,4% oraz w liściach od 0,03–3,2% (Błazeković i in. 2010). Dotychczasowe badania dowodzą, że liście charakteryzują się wyższą zawartością garbników (do 3,2%). Badania własne potwierdzają to jedynie w przypadku ulistnionych łodyg odmiany Ellagance Purple.

4. Wnioski

Po porównaniu składu wyciągów wodnych w różnych odmian i części morfologicznych *Lavandula angustifolia* stwierdzono, że wyciągi charakteryzują się zróżnicowaną zawartością garbników. Najwyższą zawartością garbników charakteryzował się susz ulistnionych łodyg odmiany Ellagance Purple – 0,48%, natomiast najniższą 0,15% kwiaty lawendy handlowej. W trakcie przeprowadzania eksperymentu nie stwierdzono jednoznacznej zależności pomiędzy zawartością procentową garbników a odmianą czy częścią morfologiczną surowca poddawanego badaniom. W odmianie Blue River więcej garbników oznaczono w kwiatach, natomiast w odmianie Ellagance Purple odwrotnie.

5. Literatura

- Bone K, Mills S (2013) Principles and practice of phytotherapy: modern herbal medicine. 2 edition.
- Błazeković B, Vladimir-Knezević S, Brantner A et al. (2010) Evaluation of antioxidant potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka': a comparative study with *L. angustifolia* Mill. *Molecules* 15, 9: 5971–5987.
- Błazeković B, Stanic G, Pepeljnjak S, Vladimir-Knezevic S (2011) In vitro antibacterial and antifungal activity of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. 'Budrovka'. *Molecules* 16, 5: 4241–4253.
- Carrasco A, Martinez-Gutierrez R, Tomas V et al. (2016) *Lavandula angustifolia* and *Lavandula latifolia* essential oils from Spain: aromatic profile and bioactivities. *Planta Medica* 82 (1-2): 163–170.
- Chu CJ, Kemper KJ (2001) Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force And The Center for Holistic Pediatric Education and Research.
- Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y (1998) Tannins in human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38, 6: 421–464.
- Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB et al. (2006) Natural products from plants. CRC Press, Boca Raton, 263–290.
- Denner SS (2009) *Lavandula angustifolia* Miller: English lavender. *Holistic Nursing Practice* 23, 1:57–64.
- Farmakopea Polska VI (2002) Warszawa.
- Handa SS, Singh Khanuja SP, Longo G et al. (2008) Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. *ICES UNIDO, Trieste*, 22–23.

- Hans - Jörg B (2011) Extraction of Natural Products from Plants – An Introduction. Industrial Scale Natural Products Extraction, First Edition.
- Janicki S, Fiebig A, Sznitkowska M (2008) Farmacja stosowana. Podręcznik dla studentów farmacji. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa.
- Kara N, Baydar H (2013) Determination of lavender and lavandin cultivars (*Lavandula* sp.) containing high quality essential oil in Isparta, Turkey. *Turkish Journal of Field Crops* 18, 1: 58–65.
- Kohlmünzer S (2003) Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Komes A, Belscak-Cvitaović D, Horzić G et al. (2011) Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochemistry Analysis* 22: 177–180.
- Lis-Balchin M (2002) *Lavender the genus Lavandula*, Taylor & Francis, London.
- McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT (2007) Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68: 2015–2022.
- Nartowska J (2012) Rośliny lecznicze – lawenda. *Panacea* 40, 3: 5–7.
- Prusinowska R, Śmigielski K (2014). Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. *Herba Polonica* 60, 2: 56–66.
- Saleem M, Nazir M, Shaig M et al. (2010) Antimicrobial natural products : an update on future antibiotic drug candidates. *Natural Product Reports* 27: 238–254.
- Seidel V (2012) Initial and bulk extraction of natural products isolation. *Methods in Molecular Biology* 864: 27–41.
- Seidler-Łożykowska K, Mordalski R, Kucharski W et al. (2014) Yielding in quality of lavender flowers (*Lavandula angustifolia* Mill.) from organic cultivation. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 13, 6: 173–183.
- Verma RS, Rahman LU, Chanotiya CS et al. (2010) Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttara- Khand, India. *Journal of the Serbian Chemical Society* 3: 343–348.

8. Wpływ lawendy (*Lavandula angustifolia*) na czynność układu nerwowego

The influence of lavender (*Lavandula angustifolia*) on the activity of the nervous system

Adaszyńska-Skwirzyńska Michalina

Zakład Hodowli Ptaków Użytkowych i Ozdobnych, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Adaszyńska-Skwirzyńska Michalina: madaszynska@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: lawenda, działanie sedatywne, OUN, aromaterapia

Streszczenie

W prezentowanej pracy przedstawiono zestawienie badań nad działaniem lawendy lekarskiej na ośrodkowy układ nerwowy (OUN). *Lavandula angustifolia* działa łagodnie uspokajająco oraz przeciwbólowo. Lawenda zaliczana jest do najważniejszych roślin wykorzystywanych w przemyśle farmaceutycznym - preparaty z surowca stosowane są m.in., w dolegliwościach pokarmowych o podłożu nerwicowym, w stanach niepokoju, zaburzeniach snu i trudnościach w zasypianiu. Ponadto, lawenda jest ziołem o udowodnionym działaniu ośrodkowym i może być stosowana w początkowych stadiach lękowych, jako aromaterapeutyczny środek przeciwbólowy oraz w trudnościach w zasypianiu.

1. Wstęp

W ostatnich latach na rynku pojawia się coraz więcej produktów zawierających w składzie olejek eteryczny, ekstrakt lub hydrolat lawendowy. Przykładami są leki farmaceutyczne o działaniu nasennym, uspokajającym czy przeciwbólowym. Warto podkreślić, że istotnym elementem procesu technologicznego wytwarzania tych produktów jest odpowiedni dobór surowca. Rodzaj *Lavandula* wchodzący w skład rodziny *Lamiaceae* obejmuje ponad czterdzieści gatunków oraz wiele podgatunków i odmian. Jednak najpopularniejszym gatunkiem jest lawenda wąskolistna *Lavandula angustifolia* Mill. (dawniej synonim *L. officinalis* Chaix lub *L. vera*), nazywana zwyczajowo lawendą lekarską, prawdziwą lub zwyczajną (Prusinowska i Śmigielski 2014). Lawenda lekarska należy do najczęściej uprawianych roślin olejkowych używanych w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym oraz chemiczno-kosmetycznym (Lis-Balchin 2002; Kara i Baydar 2013; Seidler-Łożykowska i in. 2014). Ze względu na walory ozdobne lawenda cieszy się coraz większą popularnością występowania i uprawy tego gatunku w Polsce. Często można ją znaleźć w ogrodach, gdzie uprawiana jest jako roślina ozdobna, oraz ze względu na właściwości repelentne (Prusinowska i Śmigielski 2014). Skład chemiczny lawendy jest skomplikowaną mieszaniną substancji chemicznych. Lawenda była kiedyś stosowana w leczeniu na podstawie empirii, bez szczególnej wiedzy na temat jej właściwości i składu chemicznego. Obecnie dzięki rozwojowi metod analitycznych oraz tendencji do poszukiwania nowych, naturalnych składników na potrzebę przemysłu farmaceutycznego możliwe jest dokładne ustalenie występowania w niej określonych substancji czynnych oraz możliwości ich zastosowania.

2. Opis zagadnienia

Lawenda lekarska zaliczana jest to ziół znanych od czasów starożytnych, jednakże zainteresowanie jej wykorzystaniem z roku na rok wzrasta. Po raz pierwszy lawendę stosowano w starożytnym Rzymie, gdzie wykorzystywano ją do aromatyzowania kąpeli oraz nacierania ciała (Prusinowska i Śmigielski 2014). Od średniowiecza lawendy używano jako środka ułatwiającego zasypianie, poprzez ułożenie jej kwiatów pod poduszką. Napar z lawendy uważany był za znakomity środek przeciw mdłościom, bólowi głowy czy dolegliwościom trawiennym. Kwiaty i olejek z lawendy znane są także z zastosowań kulinarnych, gdzie dodawane są jako naturalny aromat (Cavannah i Wilkinson 2002). W literaturze światowej pojawia się coraz więcej prac poświęconych lawendzie

lekarskiej. Lotne metabolity wtórne lawendy oraz ekstrakty z rośliny są przedmiotem eksperymentów zarówno w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Olejkom i wyciągom lawendowym przypisuje się szerokie działania: przeciwdepresyjne, uspokajające, nasenne, przeciwbólowe (Cavanagh i Wilkinson 2002, Lis-Balchin 2002, Prusinowska i Śmigielski 2014). Biorąc pod uwagę szerokie zastosowanie surowca roślinnego, jakim jest lawenda lekarska (*Lavandula angustifolia*), jak i coraz większą powszechność występowania i uprawy tego gatunku w Polsce, postanowiono scharakteryzować jej działanie na ośrodkowy układ nerwowy (OUN).

3. Przegląd literatury

Leki pochodzenia roślinnego mogą stanowić alternatywę dla środków syntetycznych działających na układ nerwowy (Kohlmünzer 2003; Nowak 2009). Lawenda lekarska należy do roślin o potencjalnych właściwościach przeciwdrgawkowych, antydepresyjnych, przeciwlękowych, nasennych oraz uspokajających (Chu i Kemper 2001; Cavanagh i Wilkinson 2002; Lis-Balchin 2002). Lawendowa aromaterapia uważana jest za skuteczną, ze względu na swoje działanie psychologiczne (związane z zapachem), oraz fizjologiczne (związane z inhalacją lotnych składników, głównie linalolu i jego octanu). Działanie na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) przypisywane jest olejkiw eterycznemu, a w szczególności związkom terpenoidowym (octanowi linalilu oraz linalolowi). Jednakże tylko w nielicznych eksperymentach określany był skład chemiczny olejków lawendowych. Błędy metodologiczne i niepełna identyfikacja składu chemicznego, utrudniają obiektywną ocenę znaczenia terapeutycznego lawendy. Niektóre badania określają skład i pochodzenie lawendy, istotne jest, aby wszystkie przyszłe badania kliniczne określały dokładną ilość użytych w badaniu preparatów lawendowych oraz ich dokładny skład chemiczny. Ponadto, kilka ważnych czynników nie zostało uwzględnionych w dotychczasowych eksperymentach, np. temperatura czy wielkość obszaru skóry pacjenta, które mogą mieć istotny wpływ na poziom i tempo wchłaniania olejku lawendowego. Olejek lawendowy (*Lavandulae aetheroleum*) jest lotną substancją o charakterystycznym zapachu. Pod względem chemicznym jest mieszaniną wieloskładnikowych związków terpenoidowych scharakteryzowanych na podstawie jednostek izoprenoidowych. Wchodzące w skład olejku związki mają charakter węglowodorów, alkoholi, aldehydów, ketonów, estrów i eterów. Olejek z lawendy lekarskiej może zawierać około 300 składników (Lis-Balchin 2002, Nartowska 2012, Hamad i in. 2013). Główną klasą związków olejku pozyskiwanego z kwiatów lawendy są składniki o charakterze monoterpenów (o ogólnym wzorze $C_{10}H_{16}$), głównie ich tlenowe pochodne (monoterpenoidy). O jakości olejku lawendy decyduje zawartość takich monoterpenoidów jak: linalol i jego octan, oraz ich wzajemne proporcje (korzystne > 1), a także stosunek sumy linalolu i octanu linalolu do 4-terpineolu (korzystne > 13). Właściwości zależą także od zawartości lawandulolu i jego octanu, które wpływają na kwiatowy zapach z różano-ziolową ostrą nutą. Natomiast na zapach niekorzystnie wpływa wysoka zawartość ocymenów, kamfory i 4-terpineolu (Prusinowska i Śmigielski 2014). Właściwości biologiczne związków monoterpenowych zostały szczegółowo opisane w kilku publikacjach. Wiele z nich jak na przykład borneol, α -terpineol oraz linalol charakteryzują się działaniem przeciwpalnym, przeciwwirusowym, przeciwdrobnoustrojowym, przeciwutleniającym oraz przeciwnowotworowym (De Cássia da Silveira i in. 2013). Stwierdzono ponadto, że linalol i octan linalolu charakteryzują się działaniem znieczulającym oraz owadobójczym (Chu i Kemper 2001). Kolejną klasą związków wchodzących w skład olejków lawendowych są seskwiterpeny (o ogólnym wzorze $C_{15}H_{24}$) i ich tlenowe pochodne. Związki o charakterze seskwiterpenów charakteryzują się działaniem przeciwpalnym (farnezen), przeciwutleniającym (bisabolen, kadinen), przeciwnowotworowym (np. kariofilen) oraz przeciwbakteryjnym (α -santalen) (Chu i Kemper 2001; Lis-Balchin 2002; Cavanagh i Wilkinson 2002). W Europie lawenda, z której izolowany jest olejek kwiatowy powinna spełniać wymogi normy ISO 3515:2002, Farmakopei Europejskiej (Ph Eur 7.0) lub farmakopei danego kraju (np. Farmakopei Polskiej, FP VIII 2008). Należy jednak pamiętać, że charakterystyczną cechą surowców roślinnych jest zmienny skład chemiczny, uzależniony od wielu czynników m.in., gleby, klimatu, stadium rozwojowego czy czynników genetycznych, które warunkują istnienie różnych chemotypów w obrębie gatunku danej rośliny (Lis-Balchin 2002, Seidler-Łożykowska 2014). W literaturze dostępne są nieliczne dane na temat badań składu różnych odmian *Lavandula angustifolia*, które mogą charakteryzować się

odmiennym składem ilościowym i jakościowym (Kara i Baydar 2013, Zagorcheva i in. 2013). Głównymi składnikami olejku kwiatowego są octan linalolu i linalol, których zawartość jest różna w zależności od miejsca uprawy lawendy (pochodzenia) (Lis-Balchin 2002; Verma i in. 2010; Kara i Baydar 2013; Prusinowska i Śmigielski 2014). Istnieją doniesienia literaturowe opisujące działanie sedatywne olejku lawendowego (Lis-Balchin 2002; Ostrowska i in. 2004; Nowak 2009; Tomi i in. 2017). Działanie to, według niektórych badaczy, przypisuje się także kwasowi rozmarynowemu i chlorogenowemu, flawonoidom oraz kwasom seskwiterpenowym, występujących głównie w kozłku lekarskim (*Valeriana officinalis*) (Ostrowska i in. 2004). Jednakże istnieją doniesienia o udziale kwasów seskwiterpenowych (walerenowego i acetoksywalerenowego) w lawendzie (Adaszyńska-Skwirzyńska i in. 2014). Doświadczenia farmakologiczne z udziałem ludzi potwierdziły działanie sedatywne olejku eterycznego z kwiatów lawendy lekarskiej oraz jego głównych składników. Badania dowiodły, że kwiat lawendy może być stosowany w zaburzeniach lękowych oraz zaburzeniach przewodu pokarmowego na tle psychicznym (Lis-Balchin 2002; Vakili i Gorji 2006; Nowak 2009). Wstępne eksperymenty przeprowadzone na zwierzętach wykazały działanie przeciwlękowe i przeciwdepresyjne. Należy jednak ostrożnie podejść do przedstawionych wyników, gdyż stwierdzono, że linalol posiada właściwości antykonwulsyjne, a w większych dawkach charakteryzuje się działaniem narkotycznym, polegającym na upośledzeniu koordynacji ruchowej (Vakili i Gorji 2006). Stwierdzono że, olejek lawendowy wywołuje potencjalny efekt terapeutyczny w konfliktach Gellera i Vogela (Umezu i in. 2006). Efekt przeciwlękowy został porównany z chlordiazepoksydem oraz diazepamem. Porównano to w eksperymencie przeprowadzonym na myszach, które udowodniło, że silny zapach olejku lawendowego ma wpływ na działanie przeciwlękowe, porównywalne z syntetycznymi lekami (Shaw i in. 2007). Inhalacje myszy roztworem linalolu charakteryzowały się działaniem uspokajającym i przeciwlękowym, zmniejszając ich agresywność (Shaw i in. 2007). Potencjalne wzmaganie działania uspokajającego olejku lawendowego zaobserwowano także w trakcie wstrzykiwania toksyny botulinowej typu A (Botox Cosmetic), stosowanej przy korekcji zmarszczek u kobiet. W trakcie zabiegu stwierdzono znaczny wzrost aktywności układu przywspółczulnego, przy jednoczesnym zastosowaniu aromaterapii olejkami lawendowym. Grunebaum i in. (2011) uważają, że wykorzystanie olejku lawendowego do aromaterapii u pacjentów poddawanych inwazyjnym zabiegom kosmetycznym, może łagodzić niepokój i stany lękowe. Zaburzenia snu są coraz częściej występującym problemem populacji krajów zachodnio-europejskich. Pilotażowe badania kliniczne wykazały, że lawenda lekarska jest może być pomocna w leczeniu bezsenności, najczęściej przez ograniczenie latencji oraz polepszenie jakości snu. Działanie nasenne wykazują wodne i alkoholowe ekstrakty z surowca lawendowego oraz olejku eterycznego. Skuteczność działania nasennego lawendy, zbadali japońscy naukowcy, którzy testowali lawendę na grupie studentów. Badania wykazały, że zapach lawendy poprawia jakość snu oraz zmniejszają senność po przebudzeniu (Hirokawa i in. 2012). Kolejnym dowodem na nasenne działanie olejku lawendowego jest test polegający na pomiarze długości snu w różnych fazach leczenia, podczas terapii olejkami lawendowym oraz konwencjonalnej terapii farmakologicznej (Hardy i in 1995). Zespół Sayorwana zbadał wpływ olejku lawendowego na OUN, wyniki wykazały, że olejek lawendowy spowodował znaczące obniżenie ciśnienia krwi, tętna i temperatury skóry. Osoby poddane inhalacjom z olejkami lawendowym były bardziej zrelaksowane, niż osoby wdychające olejek bazowy (migdałowy). W porównaniu z olejkami bazowymi, olejek lawendowy charakteryzował się zwiększoną mocą theta (4–8 Hz) i alfa (8–13 Hz) czynności mózgu, co dostarczyło dowodów na relaksujący efekt olejku lawendowego (Sayorwan i in. 2012). Inne wyniki badań sugerują, że zastosowanie aromaterapii lawendowej ma korzystny wpływ na relaksację (Nowak 2009). Z kolei, Tomi i in. (2017) zbadali efektywność inhalacji olejkami lawendowymi. Celem ich badań było określenie kluczowych składników lotnych olejku lawendowego wpływającego na działanie uspokajające u ludzi. Ich badania wykazały, że skutki inhalacji na ludzkie zachowania i emocje nie są powtarzalne, ze względu na różnorodność testowanych przez nich dwudziestu siedmiu olejków lawendowych dostępnych na rynku. Analiza spektralna mocy w odstępach R-R, aktywność amylazy śliny i test POMS wykazały, że niektóre olejki eteryczne z lawendy wykazały działanie uspokajające na ludzi. Obserwowano również olejki lawendowe o działaniu pobudzającym. Różnice składzie chemicznym olejków eterycznych o działaniu uspokajającym i stymulującym sugerowały,

że kluczowymi składnikami efektów aromachologicznych olejków *Lavandula* był octan linalilu (efekt uspokajający) i kamfora (efekt pobudzający) (Tomi i in. 2017).

Olejek lawendowy oraz jego główne komponenty (linalol oraz octan linalolu) charakteryzują się również miejscowym działaniem znieczulającym, udowodnionym w testach na zwierzętach (*in vivo* i *in vitro*) (Ghelardini i in. 1999). W przypadku testu przeprowadzanego na królikach, wyciąg olejku lawendowego, jak i roztwory linalolu i jego octanu spowodował, zależnie od stosowanej dawki, zwiększenie liczby bodźców koniecznych, aby spowodować odruch (Ghelardini i in. 1999 Shaw i in. 2007). Inhalacje lawendowe mogą być częścią multidyscyplinarnego leczenia bólu oraz depresji poporodowej (Olapour i in. 2013). Ból jest jednym z najczęściej występujących problemów pooperacyjnych, a leki stosowane, w celu jego zmniejszenia, powodują skutki uboczne. Najnowsze badania wykazują, że w leczeniu mogą znaleźć zastosowanie terapie alternatywne i uzupełniające, np. aromaterapia. W eksperymentach pod kierownictwem Olapour i in. (2013) wykazano, że ból u kobiet po cięciu cesarskim zmniejszał się po operacji, dzięki inhalacjom lawendowym. Działanie lawendy charakteryzował znaczący spadek bólu w porównaniu z placebo. Kontrola bólu po cięciu cesarskim stanowi wielkie wyzwanie dla anestezjologów oraz ginekologów, ponieważ stosowanie leków syntetycznych może spowodować działania niepożądane, takie jak, wymioty, nudności czy nadmierną sedację. Inne badania pilotażowe na grupie kobiet wykazały, że zastosowanie aromaterapii lawendą, jako terapii uzupełniającej charakteryzuje się pozytywnymi wynikami, bez ryzyka i skutków ubocznych (Conrad i Adams 2012).

4. Podsumowanie

Lawenda zawiera w swoim składzie mieszaninę substancji biologicznie aktywnych (linalolu, octanu linalolu, flawonoidów, kwasów seskwiterpenowych), wykazujących potencjał zastosowań w obrębie czynności ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Z przeglądu piśmiennictwa wynika jednakże brak istotnych informacji dotyczących szczegółowego jej dawkowania. Do pełnej oceny możliwości wykorzystania olejków eterycznych czy ekstraktów lawendowych konieczne są dalsze badania, dlatego że, lawenda zaliczana jest do najważniejszych roślin wykorzystywanych w wielu gałęziach przemysłu, m.in. farmaceutycznego. Lawenda jest ziołem o udowodnionym działaniu ośrodkowym i może być stosowana w początkowych stadiach lękowych, jako aromaterapeutyczny środek przeciwbólowy oraz w trudnościach w zasypianiu.

5. Literatura

- Adaszyńska-Skwirzyńska M, Swarczewicz M, Dobrowolska A (2014) The potential of use lavender from vegetable waste as effective antibacterial and sedative agents. *Medicinal Chemistry* 4: 734–737.
- Cavanagh HMA, Wilkinson JM (2002) Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research* 16 (4): 301–3308.
- Conrad P, Adams C (2012) The effects of clinical aromatherapy for anxiety and depression in the high risk postpartum woman - a pilot study. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 3: 164-168.
- Chu CJ, Kemper KJ (2001) Lavender (*Lavandula* spp.). Longwood Herbal Task Force And The Center for Holistic Pediatric Education and Research.
- Denner SS (2009) *Lavandula angustifolia* Miller: English lavender. *Holistic Nursing Practice* 1: 57–364.
- De Cássia da Silveira R, Andrade LN, de Sousa DP (2013) A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules* 8 (1): 1227–31254.
- Hamad K, Al-Shaheen S, Kaskoos R. et al. (2013) Essential oil composition and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* from Iraq. *International Research Journal of Pharmacy* 4 (4): 117–3120.
- Ghelardini C, Galeotti N, Salvatore G, Mazzanti G (1999) Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. *Planta Medica* 65: 700–703.

- Grunebaum LD, Murdock J, Castanedo-Tardan MP, Bauman LS (2011) Effects of lavender olfactory input on cosmetic procedures. *Journal of Cosmetic Dermatology* 10: 89–93.
- Hardy M, Smith MD, Stretch DD (1995) Replacement of drug treatment for insomnia by ambient odour. *Lancet* 346: 701.
- Hirokawa K, Nishimoto T, Taniguchi T (2012) Effects of lavender aroma on sleep quality in healthy Japanese students. *Perceptual and Motor Skills* 114: 111–112.
- Kara N, Baydar H (2013) Determination of lavender and lavandin cultivars (*Lavandula* sp.) containing high quality essential oil in Isparta, Turkey. *Turkish Journal of Field Crops* 18 (1): 58–365.
- Kohlmünzer S (2003) *Farmakognozja. Podręcznik dla studentów farmacji*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Lis-Balchin M (2002) *Lavender the genus Lavandula*, Taylor & Francis, London.
- Nadalin V, Lepojevic Z, Ristic M et al. (2014) Investigation of cultivated lavender (*Lavandula officinalis* L.) extraction and its extracts. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 20 (1): 71–386.
- Nartowska J (2012) Rośliny lecznicze – lawenda. *Panacea* 40 (3): 5–37.
- Nowak G (2009) Surowce roślinne o działaniu przeciwlękowym i przeciwdepresyjnym. *Herba Polonica* 55 (1): 84–97.
- Olapour A, Behaen K, Akhondzadeh R, Soltani F et al. (2013) The effect of inhalation of aromatherapy blend containing lavender essential oil on cesarean postoperative pain. *Anesthetic Pain* 3, (1): 203–207.
- Ostrowska B, Rzemkowska Z, Kędzia B (2004) Ocena właściwości uspokajających wybranych wyciągów roślinnych. *Postępy Fitoterapii* 3: 115–118.
- Prusinowska R, Śmigielski K (2014) Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. *Herba Polonica* 60 (2): 53–66.
- Sayorwan W, Siripornpanich V, Piriyanunyanorn T, Hongratanaworakit T et al. (2012) The effects of lavender oil inhalation on emotional states, autonomic nervous system, and brain electrical activity. *Journal of The Medical Association of Thailand* 95, 4: 598–606.
- Seidler-Łożykowska K, Mordalski R, Kucharski W i in. (2014) Yielding in quality of lavender flowers (*Lavandula angustifolia* Mill.) from organic cultivation. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus* 13 (6): 173–3183.
- Shaw D, Annett JM, Doherty B, Leslie JC (2007) Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. *Phytomedicine* 14: 613–620.
- Tomi K, Kitao M, Murakami H, Matsumura Y et al. (2017) Classification of lavender essential oils: sedative effects of *Lavandula* oils. *Journal of Essential Oil Research*
DOI.org/10.1080/10412905.2017.1377122.
- Umezu T, Nagano K, Ito H, Kosakai K et al. (2006) Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 85, (4): 713–721.
- Vakili N, Gorji A (2006) Psychiatry and psychology in medievar Persia. *Journal of Clinic Psychiatry* 67, (12): 1862–1869.
- Verma RS, Rahman LU, Chanotiya CS et al. (2010) Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttara- Khand, India. *Journal of the Serbian Chemical Society* 3: 343–348.
- Zagorheva T, Stanev S, Rusanov K et al. (2013) Comparative GC/MS analysis of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) inflorescence and essential oil volatiles. *Agricultural Technology* 5 (4): 459–3462.

9. Zdolności adaptacyjne *Lactobacillus plantarum* na podstawie organizacji genomu

The adaptability of *Lactobacillus plantarum* based on genome organization.

Gustaw Klaudia

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Adam Waśko

Gustaw Klaudia: klaudiagustaw1@gmail.com

Słowa kluczowe: bakterie kwasu mlekowego, ORF, PTS

Streszczenie

Gatunek *Lactobacillus plantarum* jest uniwersalnym, wielofunkcyjnym i elastycznym drobnoustrojem, zamieszkującym różne nisze ekologiczne. Poznanie sekwencji genomu *Lb. plantarum* tłumaczy jego powszechność, wśród bakterii kwasu mlekowego, oraz przewagę w zajmowaniu przez ten gatunek różnorodnych środowisk. Około trzy miliony par zasad w chromosomie tego gatunku, zawiera 3052 geny które prawdopodobnie kodują białka, z czego 70% przypuszczalnie posiada funkcje biologiczne. Ten dosyć duży genom koduje wszystkie enzymy wymagane do szlaków glikolizy i fosfoketolazy, oraz 25 kompletnych systemów transportu cukrów, a także geny kodujące funkcje zewnątrzkomórkowe i białka biorące udział w mechanizmach odpowiedzi na warunki stresowe. Ponadto wiele z tych genów ulega częstej ekspresji. Odkrycia ostatnich lat sugerują że geny te stanowią ważną część interakcji *Lb. plantarum* z środowiskiem w którym żyje, co doprowadziło do wytworzenia regionu adaptacji do życia w jego chromosomie.

1. Wstęp

Rodzaj *Lactobacillus* jest niezwykle różnorodny, obejmuje ponad 150 gatunków. Często te poszczególne gatunki są wysoce wyspecjalizowane i przystosowane do specyficznej niszy ekologicznej, takiej jak bogate w białko mleko (van de Guchte et al. 2006), podczas gdy inne preferują środowisko układu przewodu pokarmowego ssaków (Russell and Klaenhammer, 2001). Gatunek *Lactobacillus plantarum* prawdopodobnie jest najbardziej wszechstronnym członkiem grupy bakterii kwasu mlekowego (LAB). Występuje w wielu różnych niszach ekologicznych, takich jak warzywa, mięso, ryby oraz produkty mleczne, jak również przewod żołądkowo-jelitowy. *Lactobacillus plantarum* jest gatunkiem wysoce heterogennym, szeroko stosowanym w wielu gałęziach przemysłu związanych z żywnością i zdrowiem, na przykład jako kultury starterowe w procesach fermentacji. Kilka badań wykazało, że niektóre szczepy mogą mieć korzystny wpływ na funkcjonowanie jelit ssaków, a niektóre szczepy zostały opracowane jako kultury probiotyczne (Siezen et al. 2010). Co więcej, bakterie kwasu mlekowego są odpowiedzialne za produkcję istotnych witamin i aminokwasów, dostarczanych wraz z pokarmem lub wytwarzanych już w przewodzie pokarmowym (Holzapfel et al. 2014). Bakterie *Lactobacillus* wykazują dużą zmienność genomu, co może wpływać na ich właściwości fizyko-chemiczne oraz zdolności adaptacyjne. Wielkość genomu bakterii z rodzaju *Lactobacillales* jest stosunkowo niewielka, i wynosi około 2 miliona par zasad (Jurkowski i inni, 2012), jednakże *Lactobacillus plantarum* wybijają się ponad przeciętność. Ze względu na doskonale dostosowany genom, niezwykłą plastyczność, ilość genów metabolizmu cukrów, genów kodujących białka zewnątrzkomórkowe i białka odpowiedzi na stres jest w stanie zajmować różnorodne nisze ekologiczne.

2. Przegląd literatury

Bakteria *Lactobacillus plantarum* posiada jeden z największych genomów wśród bakterii kwasu mlekowego. Materiał genetyczny uporządkowany jest w kuliście chromosom, który zawiera 3 308 273 pary zasad. Procentowa zawartość par GC w chromosomie wynosi 44,5%, przy czym ilość

GC, jest znacznie mniejsza w plazmidach. W chromosomie szczególnie interesujący jest region 3072500-328500, o wielkości 213 kb, koduje on białka odpowiedzialne za transport cukrów oraz metabolizm, co jest niezwykle ważne dla gatunku zasiedlającego tak różnorodne nisze ekologiczne. Region ten posiada stosunkowo niewielką procentową zawartość GC, sądzi się, że wiele z tych cennych genów zostało pozyskanych na drodze transferu horyzontalnego.

W skład genomu *Lb. plantarum* wchodzi trzy plazmidy, są to pWCFS101 o długości 1917 par zasad, pWCFS102 o długości 2365 par zasad oraz najdłuższy pWCFS103 z 36069 bp. Plazmid pWCFS101 jest nośnikiem genów kodujących proces replikacji. Plazmid pWCFS102 również zawiera geny odpowiedzialne za replikację, ale również geny kodujące białka kontrolujące liczbę kopii. Plazmid pWCFS103 posiada geny oporności na kadm, arsenian, również zawiera geny białek biorących udział w replikacji, białka chroniące DNA przed uszkodzeniem oraz oksydazy (Kleerebezem et al. 2003).

Dzięki homologii chromosomu *Lb. plantarum* z chromosomami *Bacillus halodurans* (Takami et al. 2000) i *Bacillus subtilis* (Knust et al. 1997) zostały opisane miejsca początku replikacji, ponieważ u tych gatunków w obrębie miejsca origin organizacja genów jest praktycznie identyczna. Opisany przez Kleerebezem i innych, genom szczepu *Lb. plantarum* WCFS1 posiadał w tym regionie dwanaście na czternaście ortologicznych genów do wyżej wymienionych gatunków *Bacillus*, dodatkowo geny są zorganizowane i ułożone w ten sam sposób. Ponadto wykazano że 11 DnaA białek wiążących DnaA flankuje gen *dnaA*, dostarczając dalszych dowodów związanych z inicjacją replikacji (Yoshikawa et al. 1991). U *Lb. plantarum* geny kodujące białka są przeważnie transkrybowane zgodnie z kierunkiem replikacji, który jest zachowany w wielu genomach Gram-dodatnich bakterii, o niskiej procentowej zawartości zasad G+C. Miejsce terminacji replikacji znajduje się dokładnie po przeciwnej stronie miejsca inicjacji replikacji. Dodatkowo sekwencja terminacji, podobna do sekwencji *dif*, rozpoczyna się od 1,669,020 bp. Sekwencja analogiczna do sekwencji *dif*, wraz z aktywnymi specyficznymi miejscami XerC i XerD, jest teoretycznie zaangażowana w podział chromosomu podczas replikacji.

Genom *Lb. plantarum* obejmuje pięć operonów rRNA, które są równomiernie położone na chromosomie, charakteryzują się ograniczoną liczbą polimorficznych sekwencji. W sumie zidentyfikowano 62 geny kodujące tRNA, z których większość wydaje się być genetycznie połączona z niektórymi klastrami rRNA. Opisano kilka odmiennych powtarzalnych elementów sekwencji, w tym dwie klasy transpozaz, które są prawdopodobnie odpowiedzialne za reprezentowanie ruchomych elementów genetycznych. Wyznaczono powtarzalne sekwencje: ISP1 (osiem kompletnych kopii i dwie kopie przerywane), i ISP2 (cztery kompletne kopie i jedna kopia przerywana). ISP1 reprezentuje klasyczne elementy IS, zawierające geny kodujące transpozazę, flankowane przez odwrócone powtórzenia terminalne. ISP2 nie posiadają odwróconych sekwencji powtarzalnych, ale kodują białko homologiczne do transpozazy, należące do rodziny ruchomych elementów genetycznych SCCmec.

Otwarte ramki odczytu-ORF

Oznaczono 3,052 genów kodujących białka, z których tylko 39 okazały się być pseudogenami. Zestawienie przewidywanych białek z pozostałymi kompletnymi sekwencjami genomu pokazało, że białka *Lb. plantarum* są wysoce podobne do białek bakterii Gram-dodatnich, o niskiej procentowej zawartością G+C, z których większość należy do rodzaju: *Streptococcus*, *Listeria*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* oraz *Staphylococcus*. Analiza porównawcza genomów *Listeria spp.* *B. subtilis* i *S. aureus* ujawniła zachowaną, kolinearną organizację ich genów, wskazując na pewną stabilność czy też analogiczność genomów tej grupy bakterii Gram-dodatnich (Glaser et al. 2001). Gatunek *Lb. plantarum* wydaje się podążać za tym trendem, chociaż podobieństwo jest mniejsze niż pomiędzy rodzajami *Listeria* i *Bacillus*. Opisano 16 klastrów, z zachowaną kolinearną organizacją genów, ponad osiem podobnym genów pomiędzy *Lb. plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *B. subtilis*. Domniemane funkcje biologiczne zostały przypisane do genów 2,120 białek, z kolei 588 prawdopodobnych białek *Lb. plantarum* jest homologicznych do konserwatywnych białek, o nieznanym funkcji w innych organizmach. Zidentyfikowano co najmniej 440 grup multigenów, zawierających 1,443 białek.

Indeks adaptacji kodonów (CAI), i pozostałe równowartościowe wskaźniki, pozwalają na uzyskanie informacji, że dany gen ulega silnej ekspresji w organizmie. Korelacja ta opiera się na fakcie, że geny o wysokim poziomie ekspresji, mają silną tendencję wykorzystania synonimicznych kodonów (Karlin et al. 2001). Wartość CAI jest determinowana dla każdego genu *Lb. plantarum*, poprzez wykorzystanie białek kodujących rybosomalne geny, jako zestawu referencyjnego. Oprócz spodziewanych genów metabolizmu podstawowego (*housekeeping*), zestaw genów potencjalnie ulegające wysokiej ekspresji (PHX- potentially highly expressed), u *Lb. plantarum* zawiera geny całego szlaku Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), i szereg enzymów zaangażowanych w degradację pentoz i heksoz. Skupienie tego gatunku na szerokich możliwościach katabolizmu cukrów odnajduje swoje odzwierciedlenie w tym iż pewna liczba systemów fosfotransferazy (PTSs) i głównie enzymów HPr PTS (ptsH) i enzymu-I (ptsI) jest PHX. W szczególności wszystkie systemy PTS mannozy, i fruktozy wchodzi w skład tego zestawu. Szlak katabolizmu N-actetyloglukozaminy również zaliczony został jako PHX. Odchylenie wykorzystania synonimicznych kodonów genów PHX, przejawia się niską obecnością kodonów ATA (Ile), AGA i AGG (Arg), i częstym występowaniu CGG oraz CGT (Arg) (Kleerebezem et al. 2003).

Metabolizm cukrów

Cechą charakterystyczną dla *Lactobacillus plantarum*, jest możliwość wzrostu na różnych źródłach cukrów, co umożliwia mu zajmowanie tak wielu różnorodnych środowisk. Ta fenotypowa cecha przejawia się, w dużej liczbie genów kodujących przypuszczalne transportery cukrów. Większość tych transporterów, to przewidywane cukrowe PTS, zależne od PEP. Gatunek *Lb. plantarum* WCFS1 koduje 25 kompletnych kompleksów enzymu II PTS, i kilka niekompletnych. Ta wysoka liczba PTS, znacznie przewyższa ich ilość w innych genomach mikroorganizmów, zaś jest najbardziej podobna do ilości PTS, jaką posiada *Listeria monocytogenes* (Glaser et al. 2001). Specyficzność substratowa *Lb. plantarum*, może być przewidziana, na podstawie homologii genów PTS, ponieważ w wielu przypadkach geny enzymu II PTS, są położone blisko z enzymami i genami regulatorowymi zaangażowanymi w metabolizm cukrów. W genomie *Lb. plantarum* znajduje się 30 genów kodujących system transporterowy, zaangażowany w transport węgla. Jednak nie można przewidzieć specyficzności substratu, dla niektórych PTS i innych systemów wychwytu węgla, a różne systemy transportu cukru są znane z tego, że importują więcej niż jeden substrat, zwiększając w ten sposób zdolność transportu węgla tego gatunku a nawet dalej. Cukry są wykorzystywane jako źródło węgla, do namnażania się, i wzrostu oraz do wytwarzania energii poprzez fermentację. Gatunek *Lb. plantarum* należy do grupy fakultatywnie heterofermentacyjnych, bakterii kwasu mlekowego, dlatego też, zgodnie z tą klasyfikacją geny dla szlaku fosfoketolazy, obecne są na chromosomie *Lb. plantarum*. Geny kodujące enzymy zaangażowane w szlak EMP, są zorganizowane w dwa operony (Bolotin et al. 2001). To genetyczne umiejscowienie, pozwala na efektywną regulację ekspresji enzymów, w odpowiedzi na dostępne w środowisku źródła węgla. Chromosom *Lb. plantarum* nie koduje genów zaangażowanych w szlak cytrynowy. Jednakże opisano kilka genów enzymów zaangażowanych w ten szlak to jest, sześć kopii reduktazy fumaranu. Ten wysoki stopień redundancji reduktazy fumaranu sugeruje, że *Lb. plantarum* posiada prymitywny łańcuch transportu elektronów. Oprócz tego, odnotowano obecność szlaku redukcji azotanów, co może wskazywać na wykorzystanie azotanów, jako ostatecznego akceptora elektronów (Kleerebezem et al. 2003). *Lb. plantarum* wykazuje homofermentację, podczas wzrostu na glukozie, która jest rozkładana w szlaku EMP prowadzącym do wytworzenia pirogronianu, jest on następnie przekształcany w zbliżonych molowych ilościach do D- i L-mleczanu, dzięki aktywności stereospecyficznych enzymów dehydrogenazy mleczanowej. W porównaniu do *Lactobacillus lactis* IL1403, potencjał rozkładu pirogronianu jest znacznie większy u *Lb. plantarum*. Obserwacje te potwierdzają zdolność drobnoustrojów fermentacyjnych do rozkładu pirogronianu (Kleerebezem et al. 2001). Geny zaangażowane w transport, i wykorzystania cukrów, należą również do grupy genów ulegających częstej ekspresji, dlatego można stwierdzić, że *Lb. plantarum* jest „zaprogramowany” do efektywnego wykorzystania różnych źródeł węgla. Wiele z tych genów, jest zlokalizowanych blisko miejsca origin replikacji. W szczególności region 213 kb, kodujący niemal wyłącznie białka odpowiadające za transport, czy metabolizm cukrów. Ponadto cały ten region posiada procentową

niższą zawartość par GC (41,5%), w porównaniu do pozostałej części genomu, co może wskazywać na horyzontalny transfer genów. Jest to zgodne z hipotezą, że ta część chromosomu *Lb. plantarum*, stanowi region adaptacji życiowej, służący do efektywnego dostosowywania się do zmian warunków środowiskowych (Kleerebezem et al. 2001).

System proteolityczny i biosynteza aminokwasów

Bakterie kwasu mlekowego z reguły zamieszkują środowiska bogate w białko (mleko), dlatego też posiadają mechanizmy degradacji białek. W genomie *Lb. plantarum* nie zlokalizowano enzymów wymaganych do wykorzystywania dużych polipeptydów, czyli pozakomórkowe proteazy Prt. Jednakże *Lb. plantarum* dysponuje systemem pobierania peptydów (Opp i Dtp). Po pobraniu peptydy, są degradowane różnorodnymi peptydazami. W genomie *Lb. plantarum* jest 19 genów, kodujących wewnątrzkomórkowe peptydazy, o różnej specyficzności, oraz trzy geny pozwalające na rozszczepienie prolina na N-końcach. Obecne u *Lb. plantarum* są także, kompletne szlaki biosyntezy większości aminokwasów, zlokalizowane zazwyczaj w dużych klastrach, lub operonach. Nie posiadają szlaków umożliwiających wytworzenie rozgałęzionych aminokwasów, takich jak: walina, leucyna, i izoleucyna (Van Montfort et al. 2000). Klaster genów NRPS (nonribosomal peptide synthesis), występujący u *Lb. plantarum*, jest pierwszym przykładem takiej maszyny biosyntezy, znalezionym u grupy bakterii kwasu mlekowego. Peptydy lub produkty peptydopodobne wytwarzane przez analogiczne systemy, są bardzo różnorodne pod względem składu czy struktury, mogą zawierać ważne związki dla przemysłu farmaceutycznego. Kilka z tych związków odgrywa kluczową rolę w patogeniczności drobnoustrojów (Marahiel et al. 1997). NRPS to „multimodular protein”, *Lb. plantarum* koduje dwa klastry NRPS, składające się odpowiednio z pięciu i jednego modułu/modułów. Klaster koduje podstawowe transferazy fosfopantenolu, jak również białka rzekomo wymagane w regulacji, transporcie, i sekrecji enzymów (Kleerebezem et al. 2001).

Jak dotąd największa klasa białek, wśród tych zakodowanych w genomie *Lb. plantarum*, jest reprezentowana przez białka transportowe (411 genów). Z tych transporterów zidentyfikowano 57 transporterów kasy ATP wiążącej (168 białek), z których 27 było importerami, a 30 eksporterami. Wiele z tych importerów, są transporterami aminokwasów i peptydów, podczas gdy specyficzność substratowa większości eksporterów jest nieznaną. Chromosom *Lb. plantarum*, koduje kilka transporterów, w celu wychwytu aminokwasów rozgałęzionych, w tym transportera ABC kodowanego przez geny livABCDE, co jest zgodne z brakiem genów kodujących enzymy zaangażowanych w biosyntezę tych aminokwasów u *Lb. plantarum*. Posiada cztery kompletne systemy glutamino-specyficznych transporterów ABC. U *Lb. plantarum* transport glutaminy może mieć decydujące znaczenie w regulacji metabolizmu azotu. Kolejną dużą klasą białek są białka regulacyjne, kodowane przez 262 genów (co stanowi 8,5% wszystkich białek). Klasa ta zawiera trzy geny kodujące czynniki sigma: rpoD, rpoN, sigH, i co najmniej 13 par receptorów regulatorowych, przypisywanych do dwóch rodzin komponentów regulacyjnych. Względnie wysoki poziom genów regulatorowych odkrytych u *Lb. plantarum* jest również odzwierciedleniem różnych warunków środowiskowych w których te bakterie występują (Kleerebezem et al. 2001). Jeśli chodzi o adaptację do warunków niekorzystnych, gatunek *Lb. plantarum* koduje geny związane z odpowiedzią na stres, czyli proteazy, przykładowo wewnątrzkomórkowe energetycznie zależne proteazy ClpP, HsIV i Lon, które rozkładają nieprawidłowe niefunkcjonalne białka. Dodatkowo, białko opiekuńcze groES-groEL, i operon hrcA-grpE-dnaK-dnaJ, koduje trzy małe białka szoku cieplnego, z rodziny HSP20, i trzy wysoce homologiczne białka szoku cieplnego (CspL, CspC, CspP). Oprócz innych powszechnych mechanizmów odpowiedzi na stres, bakterie wytwarzające kwas mlekowy, muszą skutecznie radzić sobie z zakwaszaniem środowiska, w którym żyją. ATPaza FOF1 prawdopodobnie służy jako główny regulator wewnątrzkomórkowej wartości pH. Co więcej, 10 kodowanych antyportów protonów sodu, może być zaangażowane w odpowiedzi na stres kwasowy. Gatunek *Lb. plantarum* koduje trzy białka szoku alkalicznego, które odgrywają kluczową rolę w tolerancji szczepu na pH. Badano fizjologiczną odpowiedź na stres hiperosmotyczny i wykazano, że głównie elektrolity pośredniczące we wzroście osmolarności prowadzą do akumulacji substancji rozpuszczalnych. Genom *Lb. plantarum* koduje trzy systemy pobierania i biosyntezy osmoprotektantów, glicyna/betaina, karnityna/cholina, dwa transportery ABC (opuABCD, choSQ). Dodatkowo, są

kodowane różne białka, związane ze stresem oksydacyjnym, takie jak katalazy, peroksydazy tiolowe, peroksydazy glutationowe, cztery reduktazy glutationowe, pięć oksydaz NADPH, dwie peroksydazy NADPH. Genom *Lb. plantarum*, nie posiada genu dysmutazy ponadtlenkowej. Ponad 20 lat temu, w przeprowadzonych badaniach ustalono, że bakterie te, rekompensują brak tego enzymu przez wysoki poziom (20-30mM) wewnątrzkomórkowej akumulacji jonów Mn²⁺, które w takiej koncentracji mogą działać jako zmiatacze wolnych rodników.

Zewnątrzkomórkowe proteiny

Odkryto 217 białek posiadającą N-terminalną sekwencję sygnałową, z których 144, dysponuje miejscem cięcia dla peptydazy sygnałowej. Znaczna część tych białek, jest zakotwiczona w komórce sekwencją N- lub C-terminalną, kotwicą lipoproteinową, kotwicą typu LPxTG, lub poprzez odmienne domeny wiążące ścianę komórkową, takie jak np.: domena LysM, lub domeny wiążące cholinę. C-terminalna domena składa się z dwóch konserwatywnych motywów WxL i została zdefiniowana w 19 białkach u *Lb. plantarum*.

Białka *Lb. plantarum* zawierające motywy sortazy typu LPxTG, faktycznie mają inną i całkiem odmienną sekwencję konsensusową LPQTxE, które mogą odzwierciedlać specyficzność pojedynczej sortazy, kodowanej przez genom. Taki wysoce konserwatywny motyw sortazy, nie został wcześniej opisany w innych bakteriach Gram-dodatnich. Większość z pozakomórkowych białek, należy do tzw.: „para log family” ,są to hydrolazy, o częściowo znanej swoistości substratowej (peptydy sygnałowe, sortazy, proteinazy), ale znaczną część stanowią głównie enzymy o nieznannej swoistości. Nie określono funkcji dla większości zewnątrzkomórkowych białek. Generalnie białka te posiadają sygnał peptydowy, wiele domen, w tym przynajmniej jedną domenę zakotwiczoną w komórce. Istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że niektóre z tych pozakomórkowych białek, odgrywają kluczową rolę w adhezji i wiązaniu się do innych białek komórkowych, posiadają domeny wiążące mucynę, fibronektynę, promotor agregacji, adhezji międzykomórkowej, aglutynacji komórkowej. Niezwykłym związaniem z powierzchnią białkiem u *Lb. plantarum*, jest białko o 3 660 aminokwasach, oznaczone Sdr, które zawiera prawie doskonale powtórzenie SD (Ser-Asp), posiada na C-końcu sygnał peptydowy zakotwiczony w transmembranie, regiony o niskiej złożoności, i domeny o nieznanym funkcjach. Pozakomórkowe białka o analogicznej budowie domen, opisano u innych bakterii Gram-dodatnich. Trzy geny tagE *Lb. plantarum* kodujące Poli- α -glukozylotransferazy, położone w pobliżu genu sdr, biorą udział w O-glikozylacji (McCrea et al. 2000). Ogólnie rzecz biorąc, ta duża grupa białek może funkcjonować w rozpoznawaniu, lub wiązaniu pewnych składników w różnych środowiskach, które zajmuje *Lb. plantarum*. Co intrygujące, geny kodujące białka pozakomórkowe nie są losowo rozmieszczone na chromosomie, ponieważ region od 2 604,000 do 3,063,000 bp ma silną nadreprezentację tych genów. Co więcej, wiele z tych genów występuje w skupiskach od trzech, do sześciu genów, a funkcja tych klastrów genów nie jest znana. Ten region chromosomu, sąsiaduje z regionem, który prawie wyłącznie koduje białka zaangażowane w transport i wykorzystanie cukru oraz ich regulację. Odkrycia te potwierdzają hipotezę, że ta część genomu *Lb. plantarum*, reprezentuje region adaptacji stylu życia, który obrazuje funkcje związane z elastyczną interakcją z różnymi środowiskami. (Kleerebezem et al. 2001).

3. Podsumowanie

Struktura i organizacja genomu *Lb. plantarum* ujawnia, koncentrację tego mikroorganizmu na katabolizm węgla, który przejawia się w zdolności do importowania i wykorzystywania dużej różnorodności źródeł węgla. Potwierdza się to tym, że wiele genów kodujących enzymy zaangażowane w centralny metabolizm węgla, należy do grupy PHX – czyli ulegających częstej ekspresji. Co więcej sekwencja genomu, tłumaczy elastyczność i wszechstronność *Lb. plantarum*, co uwiadamia się wyjątkowo licznie występujących systemach transportu cukrów PTSs. Genom *Lb. plantarum*, bogaty jest w różnorakie białka powierzchniowe, umożliwiające zakotwiczenie się do rozmaitych powierzchni, czy też substratów do wzrostu. Niezwykła adaptacja tego gatunku wynika z wielu cennych zawartych w genomie genów, dlatego też, ich koncentracja, i szereg funkcji został określony jako region adaptacji życiowej.

4. Literatura

- Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, i in. (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294: 849–852.
- Holzapfel WH, Brian JB (2014) *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. John Wiley & Sons 249-320.
- Jurkowski M, Błaszczuk M (2012) Charakterystyka fizjologiczno-biologiczna bakterii fermentacji mlekowej. *Kosmos* 61(3): 493-504.
- Karlin, S., Mrázek, J., Campbell, I i in. (2001) Characterizations of highly expressed genes of four fast-growing bacteria. *Journal of bacteriology* 183(17):5025-5040.
- Bolotin A, Wincker P, Mauger T i in. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome research* 11(5): 731-753.
- Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg i in. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1990-1995.
- Kleerebezem M, Hols P, Bernard E i in. (2010) The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS microbiology reviews* 34(2): 199-230.
- Kunst, F, Ogasawara, N, Moszer I i in. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390(6657): 249-256.
- Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical reviews* 97(7): 2651-2674.
- McCrea KW, Hartford O, Davis S i in. (2000) The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 146: 1535–1546.
- Russell WM, Klaenhammer TR (2001) Identification and cloning of *gusA*, encoding a new β -glucuronidase from *Lactobacillus gasserii* ADH. *Appl Environ Microbiol* 67: 1253–1261.
- Siezen RJ, Tzeneva VA, Castioni A i in. (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental Microbiology* 12(3): 758-773.
- Takami H, Nakasone K, Takaki Y i in. (2000) Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research* 28(21): 4317-4331.
- van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C i in. (2006) The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 9274–9279.
- Van Montfort R, Slingsby C, Vierling E (2001) Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv Protein Chem* 59: 105–156.
- Yoshikawa H, Ogasawara N (1991) Structure and function of DnaA and the DnaA-box in eubacteria: evolutionary relationships of bacterial replication origins. *Molecular microbiology* 11: 2589-2597.

10. Mechanizmy adaptacyjne *Euryarchaeota* i ich potencjał biotechnologiczny

The adaptative mechanisms of *Euryarchaeota* and their possible potential in biotechnology

Gustaw Klaudia, Michalak Magdalena, Waško Adam

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywnienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekun naukowy: dr hab. Adam Waško

Gustaw Klaudia: klaudiagustaw1@gmail.com

Słowa kluczowe: enzymy, archeony, halofile, termofile

Streszczenie

Archeony mają wiele wyjątkowych właściwości genotypowych i fenotypowych, świadczących o ich szczególnym statusie ewolucyjnym. Tak zwani ekstremofile muszą być odpowiednio przystosowani do ekstremalnych warunków środowiska w odniesieniu do procesów metabolicznych, funkcji biologicznych, genomów i aby przezwyciężyć wyzwania życia. Ten rozdział opisuje ostatnie postępy w badaniach nad ekstremofilami z typu *Euryarchaeota* i dotyczy ich, strategii metabolicznych, strukturalnych adaptacji ich enzymów do temperatury, zasolenia i pH oraz ich zastosowania biotechnologicznego. Archeony ewoluowały, aby poradzić sobie z jednym lub większą liczbą ekstremalnych warunków, a w trakcie ewolucji wprowadziły zmiany w celu optymalizacji struktury białka i aktywności enzymów. Strukturalne podstawy tych adaptacji doprowadziły do skonstruowania rozległego repertuaru molekuł o szczególnych cechach nie występujących w innych organizmach. Archeony można badać jako niewyczerpane źródło cząsteczek biologicznych do zastosowań przemysłowych lub biotechnologicznych.

1. Wstęp

Archaea reprezentuje jedną z trzech domen życia. Ich szczególny status ewolucyjny odpowiada ich unikalnym cechom genotypowym i fenotypowym. Z wyjątkiem metanogenezy, która nie została jeszcze opisana w bakteriach, wszystkie centralne szlaki metaboliczne odkryte w archeonie istnieją również w bakteriach, chociaż w niektórych przypadkach są to ważne i nowe modyfikacje. Organizmy zwane archeonami, lub archeobakteriami mogą być heterotrofami lub autotrofami i mogą wykorzystywać dużą różnorodność donorów elektronów i akceptorów (Huber i in. 2000). Jedną z najbardziej uderzających cech organizmów archeonów jest ich związek z hipertermofilią, ponieważ są w stanie zamieszkiwać nisze ekologiczne o temperaturze nawet powyżej 95 °C. Ta właściwość opiera się częściowo na unikalnej strukturze lipidów archeonów, które są w stanie utrzymać nieprzepuszczalność błony cytoplazmatycznej w stosunku do jonów w tak wysokich temperaturach. Chociaż uważa się, że archeony żyją w ekstremalnych warunkach, można je również znaleźć w umiarkowanych warunkach środowiskowych.

Typ *Euryarchaeota*, to niezwykle różnorodna fizjologicznie grupa drobnoustrojów, dostosowana do najbardziej znanych dotychczas ekstremalnych środowisk. Zawiera organizmy przystosowane do różnych nisz temperaturowych (termofile, mezofile i psychofile), pH (acidofile) oraz organizmy, które rosną przy podwyższonych stężeniach soli (halofile). Niniejszy rozdział koncentruje się na *Euryarchaeota* i przemysłowym potencjale ich białek.

2. Przegląd literatury

Metabolizm *Euryarchaeota*

Jak już wspomniano, archaea rozwija się w wielu różnych ekstremach: ciepło, zimno, kwas, zasada, zasolenie, ciśnienie i promieniowanie. Te trudne warunki środowiskowe nakładały szereg ograniczeń, do których musiały się dostosować w trakcie swojej ewolucji, archeony można podzielić na: halofile, psychofile, termofile, acidofile i piezofile. Należy jednak pamiętać, że gałęzie te często

krzyżują się w interesujący sposób. Archeony w celu przystosowania wykształciły zdolność do akumulacji, modyfikacji struktury białka i aktywności enzymów. Te adaptacje wyposażyły je w cząsteczki o szczególnych cechach niedostępnych w ich odpowiednikach z innych organizmów. Stanowi to niewyczerpane źródło cząsteczek biologicznych do zastosowań przemysłowych lub biotechnologicznych.

Termofile i hipertermofile

Termofilne i hipertermofilne archeony występują głównie w głębinach oceanu, otworach hydrotermalnych i gorącej wodzie w pobliżu wulkanów. W zależności od temperatury wzrostu organizmy te zostały sklasyfikowane jako termofile lub hipertermofile. Pierwsze z nich mogą rosnąć w temperaturach powyżej 50 ° C, a drugie w temperaturze 80 ° C lub więcej (Urbieta i in. 2015). Istnieją różne mechanizmy komórkowe, które umożliwiają życie w tych ekstremalnych temperaturach. Chaperony (HsP), które pomagają w prawidłowym fałdowaniu białek i enzymów w połączeniu ze sztywniejszymi błonami i białkami, niż te występujące u mezofilów (Albers i in. 2000). Wiele archaicznych termofilnych i hipertermofilnych enzymów wykorzystuje substraty, które różnią się od tych stosowanych przez ich bakteryjne homologi; nawet niektóre posiadają nowe aktywności katalityczne nie występujące u bakterii. Ogólnie rzecz biorąc, struktury enzymów termofilowych i hipertermofilnych archeonów zostały opisane jako wysoce sztywne i termostabilne w porównaniu do ich mezofilnych homologów. Mechanizmy wyspecjalizowane do termostabilności obejmują wzrost liczby oddziaływań jonowych, mostków dwusiarczkowych, łańcuchów powierzchniowych, wyższych stanów oligomeryzacji i bardziej zwartego rdzenia hydrofobowego (Reed i in. 2013). Chociaż do tej pory istnieje wiele scharakteryzowanych enzymów termofilnych i hipertermofilnych z rodzaju *Euryarchaeota*, nie jest możliwe porównanie ich z mezofilowymi homologami z tego samego rodzaju ze względu na brak badań dotyczących homologicznego odpowiednika. Strukturę enzymu izomerazy triozofosforanowej charakteryzuje fałdowanie beczkowe TIM i katalizuje on odwracalną reakcję przemiany fosfodihydroksyacetonu w aldehyd 3-fosfoglicerynowy. U eukariotów, bakterii i archea mezofilnych enzym ten jest dimerem, natomiast u archeonów termofilnych i hipertermofilnych występuje w formie tetramerycznej (Walden i in. 2004). Hipertermofilną izomerazę triozofosforanową z *P. furiosus* i *Thermococcus onnurineus* scharakteryzowano również jako tetramery. Wzrost stanu oligomeryzacji może być różnicą spowodowaną wzrostem stabilności termicznej; interesujący, ale inny przykład stanu oligomeryzacji jako strategii zwiększania termostabilności przejawia się u *P. furiosus* enzymem amylazy. Ten hipertermofilny enzym, w przeciwieństwie do mezofilnych homologów, które są dimerami, ma niższy stan oligomeryzacji, opisany jako wysoce upakowany monomer. Ta wysoce upakowana struktura, jak również spadek stanu oligomeryzacji, powoduje zmniejszenie hydrofobowej powierzchni wystawionej na działanie rozpuszczalnika. W tym przypadku interakcje, które sprzyjają zawartości hydrofobowego rdzenia hipertermofilnej amylazy, są wiązaniami wodorowymi, które odgrywają podstawową rolę w utrzymywaniu fałdowania w wysokich temperaturach (Park i in. 2013). Ponadto można zauważyć, że białka termofilne i hipertermofilne wykazują większą polarną powierzchnię wystawioną na działanie rozpuszczalnika w porównaniu z białkami mezofilnymi. Obecność dużych hydrofobowych łańcuchów bocznych jest również charakterystyczną cechą białek termostabilnych. Kolejnym mechanizmem jest zwiększenie ilości mostków dwusiarczkowych, porównując alfa-amylazę z *P. furiosus* i jej bakteryjnego odpowiednika z *Bacillus licheniformis*. Zwiększona stabilność alfa-amylazy u *P. furiosus* była spowodowana wyższą zawartością reszt cysteinowych niż te obserwowane w enzymie z *B. licheniformis*. Wzrost liczby reszt cysteinowych wraz ze wzrostem liczby par jonowych został opisany jako główna cecha odpowiedzialna za aktywność i stabilizację białka w tym hipertermofilnym organizmie (Savchenko i in. 2002).

Psychofile

Większość badanych organizmów archeologicznych ewoluowała, aby skolonizować ekosystemy wodne o niskiej temperaturze, takie jak te występujące na Antarktydzie, Arktyce, rozległe obszary głębokiego morza, a także regiony alpejskie. Organizmy te nazywane są psychrofilami i można je klasyfikować w *Stenopsychrophiles* i *Eurypsychrophiles* w zależności od ich zakresu temperatur wzrostu. Klasyfikacja ta opiera się na dwóch parametrach: optymalnej temperaturze

wzrostu (T_{opt}) i maksymalnej (T_{max}). Stenopsychrophile wykazują optymalną temperaturę wzrostu poniżej $\sim 20^{\circ}\text{C}$ i T_{max} nie większą niż 25°C . Z drugiej strony, Eurypsychrophiles tolerują szerszy zakres temperatur, T_{opt} powyżej 30°C i T_{max} poniżej 10°C (Feller i in. 2003). Do tej pory prawie wszystkie archeony psychofilne należą do typu Euryarchaeota i wszystkie są metanogene.

Niska temperatura nakłada szereg wyzwań na funkcje komórkowe, takie jak replikacja, transkrypcja, translacja i reakcje metaboliczne kluczowe dla rozwoju mikroorganizmów. Na poziomie komórkowym, powszechne strategie stosowane do radzenia sobie z niskimi temperaturami obejmują, między innymi, białka szoku cieplnego, białka przeciw zamrażaniu i zwiększoną płynność błony (Feller i in. 2003). Poza tym struktura białka powinna również przystosować się do zimnego otoczenia. Do tej pory zbadano bardzo mało białek z archeonów psychrofilnych, w przeciwieństwie do dużej liczby białek i enzymów z mezofilnych, termofilnych i hipertermofilnych archeonów. Aktualne badania wskazują, że główną cechą białek psychrofilnych i enzymów jest posiadanie elastycznej struktury, która może zrekompensować spadek energii ośrodka reakcji, ułatwiając w ten sposób procesy katalizy w niskich temperaturach. Eksperymenty indukowane ciepłem dla psychrofilnych, mezofilnych i termofilnych białek archeonów wykazują wyraźne wzorce stabilności, białka ulegają rozwijaniu przy niższych temperaturach. Niemniej jednak, enzymy psychrofilne nie wykazują niezwykłych lub egzotycznych konformacji i przypominają ich mezofilne odpowiedniki. Głównym wyzwaniem dla enzymów psychrofilnych jest katalizowanie reakcji z odpowiednią szybkością, nawet gdy niskie temperatury silnie obniżają szybkość reakcji chemicznych. Jest to spowodowane destabilizacją miejsca aktywnego lub całego białka, co nadaje ruchliwość i elastyczność miejscu aktywnemu w temperaturach, które mają tendencję do zamrażania ruchów cząsteczkowych. Aby uzyskać bardziej elastyczne struktury enzymów, zmniejszono liczbę reszt obecnych na powierzchni białka i hydrofobowego rdzenia (Arg, Lys, Glu). Niska zawartość reszt argininowych powoduje niską liczbę wiązań wodorowych. Aby zrekompensować utratę ładunków na powierzchni białka i uniknąć agregacji, białka te zawierają dużą część nienaładowanych reszt polarnych, takich jak Gln i Thr, co z kolei implikuje zmniejszenie stabilizujących par jonowych sprzyjających strukturalnej destabilizacji. Inne adaptacje obejmują grupowanie reszt glicyny (zapewniające lokalną ruchliwość), zanikanie reszt proliny w pętłach (zapewnia zwiększoną elastyczność łańcucha między strukturami drugorzędowymi), jak również mniejszą liczbę par jonowych, oddziaływania aromatyczne i wiązania wodorowe. Dodatkowo hydrofobowość rdzenia białkowego i zwartość wnętrza białka jest zwykle niska (Siddiqui i in. 2006).

Halofile

Środowiska halofilne są zdefiniowane jako te, które zawierają wyższe stężenia soli niż wody morskiej ($> 3,5\%$ wszystkich rozpuszczonych soli). Większość to jeziora solankowe zdominowane przez jony Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- i SO_4^{2-} , powstają z wody morskiej i podlegają ciąglemu, intensywnemu parowaniu. Zarówno całkowite zasolenie, jak i skład jonowy wraz z warunkami, takimi jak temperatura i dostępność składników odżywczych, warunkują istnienie wysoce zmiennych środowisk zasolonych, które można znaleźć od Antarktydy po alkaliczne solanki sodowe i podziemne złoża ewaporitu. Halofilne mikroorganizmy klasyfikuje się pod względem ich optymalnego wzrostu przy różnych stężeniach soli i rozpoznano dwie główne grupy: ekstremalnych halofili (optymalny wzrost powyżej 15% NaCl) i umiarkowanych halofilów (optymalny wzrost $3\text{-}15\%$ NaCl).

Istnieją dwie zasadniczo różne strategie proponowane dla drobnoustrojów halofilnych, wyjaśniające, w jaki sposób utrzymują one ciśnienie osmotyczne w cytoplazmie podczas wzrostu w podłożu solnym: sól w cytoplazmie i gromadzenie osmolitu organicznego. Wykazano, że u Halobacteria wewnątrzkomórkowa akumulacja jonów nieorganicznych, głównie potasu i chlorków, przy wysokich stężeniach jest strategią zastosowaną do równoważenia ciśnienia osmotycznego wraz z mechanizmem wprowadzania soli. Te wysokie stężenia wewnątrzkomórkowe wymagają wyjątkowych adaptacji mechanizmu molekularnego, co oznacza, że białka muszą zachowywać swoją strukturalną i funkcjonalną integralność w tak wysokiej stężeniu soli (Oren 2008). Analizy statystyczne i bioinformatyczne sekwencji genomu organizmów Halobacteria, pozwoliły na zidentyfikowanie kompozycji aminokwasów znaną jako "sygnatura halofilowa". Ta sygnatura charakteryzuje się wzrostem reszt Asp i Glu, redukcją dodatnio naładowanych reszt, Lys ale nie Arg, małą zawartością hydrofobowej reszty Phe i Ile oraz wzrost małych hydrofobowych reszt, takich jak

Ala i Val. W wyniku tego, oprócz zachowania zwijania się białka w stosunku do mezofilnych odpowiedników, białka halofilowe wykazują niską zawartość hydrofobową i powierzchnię z dużym ujemnym ładunkiem. Trend ten został również potwierdzony za pomocą punktu izoelektrycznego obliczonego z proteomu tych organizmów (najbardziej kwaśnych proteomii do tej pory). Organizmy te są zdolne do gromadzenia się wewnątrzkomórkowych substancji rozpuszczonych, a bardziej halofilne organizmy z grupy są również w stanie gromadzić jony nieorganiczne (takie jak K⁺) w wysokich stężeniach.

Acidofile

Organizmy tolerujące kwasy mogą rozwijać się w pH poniżej 4,0. Środowiska te zwykle występują w połączeniu z innymi czynnikami stresogennymi, takimi jak wysokie temperatury, podwyższone stężenia metali ciężkich i zasolenie zbliżone do nasycenia. W rezultacie organizmy acidofilne Euryarchaeota to głównie poliekstremofile. Chociaż niektórzy członkowie Euryarchaea żyją w środowiskach o wartościach pH poniżej 1, wykazano, że większość acidofilii utrzymuje swoje wewnętrzne pH w pobliżu neutralności. Aby przystosować się do tych warunków, organizmy acidofilne wyewoluowały różne mechanizmy, takie jak nieprzepuszczalna dla protonów błona komórkowa, odwrócony potencjał błony i system buforowania cytoplazmatycznego (Baker-Austin i Dopson 2007). Jednak pomimo utrzymywania wewnętrznego środowiska w pobliżu neutralnych wartości pH, organizmy te posiadają makrocząsteczki z adaptacjami, które zachowują ich strukturę i funkcję. Jednak dokładne mechanizmy leżące u podstaw tych dostosowań nie zostały do tej pory wyjaśnione. Jedną z uderzających cech niektórych białek acydoofilnych jest ich zapotrzebowanie na niskie pH (2-5) dla ich optymalnej aktywności, takie jak alfa-glukozydaza i karboksyetylaza, nawet gdy wewnętrzne pH tych organizmów jest bliskie neutralności. Niemniej jednak, nie wszystkie białka z acidophili Euryarchaeota preferują niskie pH dla ich optymalnej aktywności, na przykład ligaza DNA zależna od ATP u *Ferroplasma acidarmanus* ma optymalną aktywność przy pH 6-7, podobnie jak ligazy DNA z organizmów nieacidofilnych. Możliwe wyjaśnienie optymalnej aktywności przy niskim pH zostało zaproponowane poprzez badanie endo- β -glukanazy z *Crenarchaeota Sulfolobus solfataricus*. Ten enzym ma optymalne pH około 2,0 i optymalną temperaturę około 80°C. Poprzez modelowanie homologii ustalono, że jego domena katalityczna posiada fałd podobny do obserwowanego w innych mezofilnych, kwasofilowych i neutralnych celulazach, a jego powierzchnia wykazuje głównie ładunki ujemne.

Ostatnie badania krystalograficzne rzuciły nieco światła na mechanizmy stabilności białek i skuteczność katalityczną przy niskim pH, u *F. acidiphilum* zidentyfikowano wysoce ujemnie naładowaną powierzchnię wokół miejsca aktywnego. Jednak nie jest to trend obserwowany dla reszty powierzchni białka. Ponadto w tym enzymie wykazano, że modyfikacje sieci wiązania wodorowego otaczające triadę katalityczną zmieniły wydajność katalityczną i umożliwiły dostosowanie pH od niskiego do bardziej optymalnego w górę i na odwrót (Ohara i in. 2014).

Piezofile

Głębokowodne otwory hydrotermalne to kolejne ekstremalne środowisko skolonizowane przez archeony. W tych środowiskach można znaleźć średnie ciśnienie około 38 MPa, które może osiągnąć nawet 110 MPa, a więc narzucić duże wyzwanie dla życia. Organizmy, które mogą się rozwijać w tak ekstremalnym ciśnieniu barometrycznym, są często określane jako piezofile lub barofile. Poza wysokim ciśnieniem, nawiewy hydrotermalne mają również bardzo wysoką temperaturę i mogą być także siedliskiem hipertermofili. Jednak tylko kilka hipertermofili to także piezofile. Do chwili obecnej podano jedynie ściśle piezofilny anaerobowy archetyp hipertermofilny *Pyrococcus yayanosii* CH1 (Birrien i in. 2011).

Biotechnologiczne zastosowanie

Ekstremalne trudne warunki środowiskowe, w których żyją ekstremofile, służą jako ogromne źródło enzymów o szczególnych właściwościach, które czynią je bardzo przydatnymi do zastosowań przemysłowych lub biotechnologicznych. Pierwszym komercyjnie dostępnym enzymem była diastaza dostępna na rynku we Francji od 1830 r.. Od tego czasu rynek enzymów zyskał na znaczeniu, ponieważ nie tylko obniżają one koszty produktów, ale również korzystnie wpływają na środowisko. W 2015 r. światowy rynek enzymów przemysłowych osiągnął wartość około 4,9

miliardów i oczekuje się, że osiągnie ponad 5,0 miliarda USD w 2017 r., Natomiast do 2021 roku wyniesie około 6,3 miliarda USD. Oczekuje się, że rynek enzymów przemysłowych żywności i pasz zwierzęcych także wzrośnie do 1,9 miliarda USD i 1,6 miliarda USD w 2021 r. (Raport BCC Research Biotechnology 2017). Przykładowo α -amylaza izolowana z *Thermococcus profundus* jest odporna na wysokie temperatury (Chung i in. 1995). Ten sam enzym izolowany z *Haloferax mediterranei* wykazuje właściwości halofilne. Enzym wykazał zapotrzebowanie na sól zarówno pod względem stabilności, jak i aktywności, jest stabilny od 2 do 4 M NaCl, z maksymalną aktywnością przy 3 M NaCl. Enzym wykazuje maksymalną aktywność przy wartościach pH od 7 do 8, a jego optymalna temperatura mieściła się w zakresie od 50°C do 60°C (Pérez-Pomares i in. 2003). α -amylaza pochodząca z *Picrophilus torridus* ma właściwości acydoofilne, natomiast psychofilny odpowiednik można pozyskać od *Methanococcoides burtonii*. Wszystkie wyżej wymienione α -amylazy wykorzystywane są odpowiednio w przemyśle piekarniczym, do upłynniania skrobi i scukrzania, w produkcji słodzików, w przemyśle włókienniczym i papierniczym. Proteaza subtylizyna stabilna w bardzo wysokich temperaturach, wykazuje aktywność w temperaturze 80°C przez około sześćdziesiąt minut, została wyizolowana z *Thermococcus kodakaraensis* (Kannan i in. 2001). Opisano białka o aktywności subtylizyny z *Halorubrum litoreum* o właściwościach halofilnych, odporne na wysokie pH z *Thermoplasmatales* archaeon oraz enzym psychofilny z *Methanobolus psychrophilus*, wykorzystywane są jako detergenty, w produkcji aminokwasów oraz w przemyśle piekarniczym i browarniczym. Jako detergenty używane są esterazy pochodzące z *Picrophilus torridus* o właściwościach hipertermofilnych, z *Haloarcula marismortui*- halofilnych, i z *Picrophilus torridus*- acidofilnych. Niezastąpionym enzymem w biotechnologii i biologii molekularnej jest polimeraza DNA, wykorzystywana do kolonowania DNA, sekwencjonowania, metod markerowych, mutagenyzy i wielu innych. Z organizmu hipertermofilnego *Pyrococcus abyssi* wyizolowano taką też polimerazę DNA (Gueguen i in. 2001). Z *Halobacterium halobium* pozyskano enzym o właściwościach halofilnych, co więcej jest bardzo podobny do polimerazy DNA eukariontów, do maksymalnej wydajności wymaga środowiska 5 M NaCl (Nakayama i Kohiyama 1985).

Związki archeonów mają również wiele zastosowań w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym. Halobakterie wytwarzają peptyd halocin, który jest stosowany jako środek przeciwdrobnoustrojowy i środek konserwujący w żywności o wysokiej zawartości soli. Ponadto związki takie jak kantaksantyna wytwarzane przez *Haloferax alexandrinus* posiadają właściwości przeciwutleniające, które mogą być potencjalnie stosowane jako suplementy diety w zapobieganiu nowotworom lub chorobom sercowo-naczyniowym. Egzopolisacharydy wytwarzane przez *Haloferax* zostały zastosowane w przemyśle spożywczym jako emulgatory, ponieważ są stabilne w wysokich temperaturach. Inne interesujące zastosowania biotechnologiczne to zastosowanie lipidów archeologicznych do tworzenia nowej generacji liposomów, znanych jako archaeosomy. Archaealne lipidy mają bardziej polarny charakter oraz wiązania eterowe, co daje im większą stabilność w ekstremalnych temperaturach, pH i ciśnieniu. Ponadto te właściwości zapewniają ochronę przed utlenianiem, działaniem fosfolipaz i hydrolizą chemiczną, zapewniając im przewagę nad liposomami tworzonymi przez obojętne fosfolipidy. Ze względu na ich dużą stabilność, biokompatybilność i biodegradację archaeosomy mają wiele zastosowań jako adiuwanty szczepionkowe oraz w systemie dostarczania leków (Asker i Ohta 2002).

3. Podsumowanie

Archeony to drobne, jednokomórkowce, zwykle ekstemofilne, niekiedy zaliczane jako oddzielna domena obok bakterii i eukariontów. Ewolowały one równolegle wraz z bakteriami, jednakże badania genetyczne wskazują że są one bliżej spokrewnione z eukariontami niż właśnie z bakteriami. Archaea są wszechobecne w większości środowisk lądowych, wodnych oraz ekstremalnych (acidofilne, halofilne, mezofilne, metanogenne, psychrofilne i termofilne). Chociaż grupa ta jest bardzo zróżnicowana i składa się z wielkiej liczby gatunków, na szczęście, wśród domeny Archaea nie opisano patogenów ludzi, zwierząt czy roślin, co więcej mogą być obecne w jelitach przewodu pokarmowego. Archaea jest zatem potencjalnie cennym zasobem

w opracowywaniu nowych biokatalizatorów, nowych farmaceutyków i różnych zastosowań biotechnologicznych.

4. Literatura

- Albers SV, van de Vossenberg J, Driessen AJM, et al. (2000) Adaptations of the archaeal cell membrane to heat stress. *Frontiers in Bioscience* 5: 813-820.
- Asker D, Ohta Y (2002) *Haloferax alexandrinus* sp. nov., an extremely halophilic canthaxanthin-producing archaeon from a solar saltern in Alexandria (Egypt). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(3): 729-738.
- Baker-Austin C, Dopson M (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology* 15(4): 165-171.
- Birrien JL, Zeng X, Jebbar M et al. (2011) *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61(12): 2827-2831.
- Chung YC, Kobayashi T, Kanai H, et al. (1995) Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* Dt5432. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4): 1502-1506.
- Feller G, Gerday C (2003) Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nature Reviews Microbiology* 1(3): 200-208.
- Gueguen Y, Rolland JL, Lecompte O, et al. (2001) Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *European Journal of Biochemistry* 268(22): 5961-5969.
- Huber R, Huber H, Stetter KO (2000) Towards the ecology of hyperthermophiles: Biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 24(5): 615-623.
- Kannan Y, Koga Y, Inoue Y, et al. (2001) Active subtilisin-like protease from a hyperthermophilic archaeon in a form with a putative prosequence. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6): 2445-2452.
- Nakayama M, Kohiyama M (1985) An α -like DNA polymerase from *Halobacterium halobium*. *European Journal of Biochemistry*. 152:293-297
- Ohara K, Unno H, Oshima Y, et al. (2014) Structural insights into the low pH adaptation of a unique carboxylesterase from *Ferroplasma*: Altering the pH optima of two carboxylesterases. *Journal of Biological Chemistry* 289(35): 24499-24510.
- Oren A (2008) Microbial life at high salt concentrations: Phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4: 2.
- Park JT, Song HN, Jung TY, et al. (2013) A novel domain arrangement in a monomeric cyclodextrin-hydrolyzing enzyme from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1834(1): 380-386.
- Pérez-Pomares F, Bautista V, Ferrer J, et al. (2003) α -Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* 7(4): 299-306
- Reed CJ, Lewis H, Trejo E, et al. (2013). Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea*.
- Savchenko A, Vieille C, Kang S, et al. (2002) *Pyrococcus furiosus* alpha-amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry* 41(19): 6193-6201.
- Siddiqui KS, Cavicchioli R (2006) Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry* 75: 403-433.
- Urbieta MS, Donati ER, Chan KG, et al. (2015) Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications. *Biotechnology Advances*. 33(6): 633-647.
- Walden H, Taylor GL, Lorentzen E, et al. (2004) Structure and function of a regulated archaeal triosephosphate isomerase adapted to high temperature. *Journal of Molecular Biology* 342(3): 861-875.

11. Alkaloidy *Lycopodium*- budowa i aktywność biologiczna

Lycopodium alkaloids – their structure and biological activity

Aleksandra Dymek⁽¹⁾, Gabriela Widelska⁽²⁾, Dominik Straszak⁽³⁾, Monika Drózd⁽⁴⁾,
Magdalena Dymek⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾Katedra Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Tomasz Mroczek

Aleksandra Dymek: aleksandra.dymek91@interia.pl

Słowa kluczowe: *Lycopodium*, alkaloidy *Lycopodium*, hupercyna A

Streszczenie

Widłaki to najstarsze z roślin naczyniowych zdolne do wytwarzania zarodników. Ich nazwa pochodzi od widlasto rozgałęzionych, zimotrwałych pędów, które wytwarzają drobne, gęsto osadzone liście. Zarodniki widłaków, głównie widłaka goździstego – *Lycopodium clavatum* (charakterystyczny żółty proszek) znajdowały zastosowanie w lecznictwie i przemyśle. Były wykorzystywane jako zasyпка na rany w celu przyspieszenia ich gojenia i szybszej regeneracji tkanki. Również pędy licznych gatunków należących do widłaków były wykorzystywane w lecznictwie ludowym. Swoje wielokierunkowe działanie zawdzięczają bogatemu składowi chemicznemu, w którym istotne składniki stanowią związki należące do alkaloidów. Związki te cechują się różnorodnością budowy i aktywnością biologiczną. Szczególne zainteresowanie wzbudziły właściwości inhibicji acetylocholinoesterazy (hupercyna Ai B), co wykorzystywane jest w leczeniu choroby Alzheimera i innych schorzeń neurodegeneracyjnych.

1. Wstęp

Widłaki to najstarsze z roślin naczyniowych zdolne do wytwarzania zarodników. Ich nazwa pochodzi od widlasto rozgałęzionych, zimotrwałych pędów, które wytwarzają drobne, gęsto osadzone liście. Zarodniki widłaków, głównie widłaka goździstego – *Lycopodium clavatum* (charakterystyczny żółty proszek) znalazły zastosowanie w lecznictwie oraz przemyśle. Były wykorzystywane jako zasyпка na rany w celu przyspieszenia ich gojenia i szybszej regeneracji tkanki. Pędy licznych gatunków należących do widłaków były wykorzystywane również w lecznictwie ludowym. Swoje wielokierunkowe działanie zawdzięczają bogatemu składowi chemicznemu, w którym istotne składniki stanowią związki należące do grupy alkaloidów. Związki te cechują się różnorodnością budowy i aktywnością biologiczną. Szczególne zainteresowanie wzbudziły właściwości inhibicji acetylocholinoesterazy (aktywnością tą cechowały się np. hupercyna A i B), enzymu odpowiedzialnego za rozkład neuroprzekaźnika acetylocholino w układzie przywspółczulnym. W wyniku zmniejszenia rozkładu mediatora ACh dochodzi do poprawy funkcji pamięciowych oraz poznawczych. Cecha ta znalazła zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimera i innych schorzeń neurodegeneracyjnych XX i XXI wieku.

2. Opis zagadnienia

Rodzaj *Lycopodium* należy do rodziny widłakowatych – *Lycopodiaceae* sklasyfikowanych do grupy paprotników- *Pteridophyta*. (Tab. 1.)

Widłaki to najstarsze z roślin naczyniowych zdolne do wytwarzania zarodników. Ich pierwsze szczątki znane są już z okresu dewonu a nawet z późnego syluru (Szypuła 2013). Są one niewielkimi, zimotrwałymi roślinami, o widlasto rozgałęziających się pędach, skąd pochodzi ich

nazwa. Ich łodygi, niekiedy o znacznej długości sięgają do kilku metrów. Płożąc się po powierzchni ziemi, wypuszczają ulistnione pędy kończące się liśćmi zarodnionośnymi zebranych zwykle w trzy lub cztery kłosa. Są to tzw. pędy zarodnionośne stojące najczęściej na szczycie pędu bocznego (Mowszowicz 1986). Rośliny te przytwierdzone są do podłoża za pomocą korzonków, które wyrastają z łodyg, a ich liście płonne są zwykle proste, huseczkowate, ułożone na łodydze okółkowo lub skrzyżtelegle. Surowiec zielarski stanowią ziele oraz zarodniki dojrzewające w lipcu i sierpniu (Perzanowska 2012).

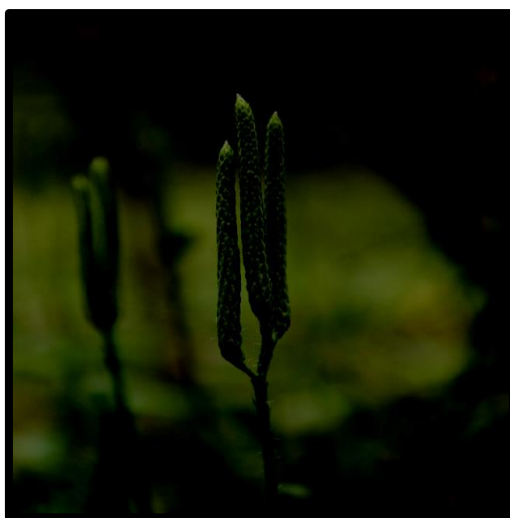
Ich charakterystyczną cechą jest wytwarzanie jednakowych zarodników (tzw. widłaki jednakozarodnikowe). Współczesne widłaki cechują się małą różnorodnością, stanowiąc tylko 1% flory (Szweykowska i Szweykowski 2006). Gromada ta obejmuje ponad 1000 gatunków, z czego w naszym kraju występuje zaledwie kilka gatunków (Szypuła 2013).

Tab. 1. Systematyka gatunku *Lycopodiaceae* (Szweykowska i Szweykowski 2006).

Jednostka systematyczna	Nazwa łacińska	Nazwa polska
Królestwo	<i>Vegetabile</i>	Rośliny
Gromada	<i>Lycopodiophyta</i>	Widłaki
Klasa	<i>Lycopodiopsida</i>	Widłaki jednakozarodnikowe
Rząd	<i>Lycopodiales</i>	Widłakowe
Rodzina	<i>Lycopodiaceae</i>	Widłakowate
Grupa	<i>Pteridophytes</i>	Paprotniki
Rodzaj	<i>Lycopodium</i>	Widłak

Do głównych przedstawicieli rosnących na terenie Polski należą:

- ✓ *Lycopodium clavatum*- widłak goździsty
- ✓ *Lycopodium annotinum* – widłak jałowcowy
- ✓ *Lycopodium selago*- widłak wroniec



Rys. 1. Pęd zarodnionośny widłaka goździstego (*Lycopodium clavatum* L.). (fot. Jarosław Widelski)

Większość występujących obecnie gatunków *Lycopodium* można spotkać zarówno w strefie tropikalnej jak i umiarkowanej. Na terenie Polski upodobały sobie tereny suchych borów, lasów mieszanych oraz wrzosowisk, rosnąc jednak prawie zawsze na zakwaszonych, suchych i ubogich glebach (Podbielkowski i in. 1961). Od drugiej połowy XX wieku do 2014 roku widłaki objęte były całkowitą ochroną, jednak obecnie podlegają częściowej ochronie (Rozporządzenie Ministra Środowiska 2017). Niestety nadal dochodzi do ich niszczenia na szeroką skalę nie tylko ze względu na walory lecznicze ale również z powodu ich ozdobnego wyglądu.

3. Przegląd literatury

Pierwsze wzmianki na temat widłaków pojawiły się już w XVI wieku w "Herbarzu Polskim" opisanym przez polskiego botanika i lekarza Macina z Urzędowa. Nieco później, bo na początku XVII wieku Szymon Syreniusz opisuje już w "Zielniku" dwa gatunki widłaków, przypisując im działanie środka wywołującego wymioty. W 1808 roku w polskim piśmie botanicznym "Dykcjonarza Roślinnego" opisanych jest już 7 gatunków widłaków, wraz z ówczesnym ich zastawianiem w lecznictwie (Szypuła 2013).

Ze względu na swoje właściwości farmakologiczne, dużą zawartość alkaloidów oraz wysoką aktywność biologiczną widłaki (*Lycopodium*) stały się tematem dużego zainteresowania oraz wielokierunkowych badań w wielu krajach zarówno Europy, Ameryki Północnej czy Azji (Borkowski. 1970). Zarodniki widłaków, głównie widłaka goździstego- *Lycopodium clavatum* (charakterystyczny żółty proszek), znalazły zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu oraz w lecznictwie. Cała roślina jest trująca, ze względu na obecność toksycznych alkaloidów, jednak wykorzystywane w recepturze farmaceutycznej i lecznictwie zarodniki nie są toksyczne. Stosowano je jako zasyпка na rany w celu przyspieszenia ich gojenia i szybszej regeneracji tkanek, gdzie wykorzystano ich właściwości absorbujące, osłaniające i przeciwzapalne. W recepturze farmaceutycznej wykorzystywano je przy wyrobie leków jako substancje pomocnicze, czy jako wypełniacz w proszkach złożonych. Zarodniki widłaków znane są również ze swoich właściwości łatwopalnych, co zostało użyte do wywołania efektów specjalnych i pirotechnicznych (Kohlmunzer 1985).

Obecnie *Lycopodium* stosuje się m. in. w leczeniu zapań, tętniaków, przewlekłych chorób płuc i oskrzeli oraz gorączki (Zangara 2003). Ułatwiają procesy trawienia, zmniejszają stany zapalne przewodu pokarmowego, działają łagodząco na skórę, zmniejszając jej podrażnienia i swędzenie (Banerjee. i in. 2014). Jednym z ciekawszych właściwości alkaloidów widłaków jest inhibicja acetylocholinoesterazy (AChE), enzymu któremu przypisuje się jedną z przyczyn powstawania chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimer. Deficyt neuroprzekazników w tym acetylocholino, powoduje znaczne ubytki w pamięci oraz upośledzenie funkcji poznawczych. Choroba Alzheimer, jak i inne schorzenia neurodegeneracyjne są chorobami cywilizacyjnymi i ze względu na starzenie się społeczeństw dotykają coraz większej liczby osób (Zhang i in. 2008). Choroba ta nie tylko odbiera pamięć i godność osobie nią dotkniętej, ale jest w kolejnych etapach źródłem cierpienia, ubezwłasnowolnienia chorej osoby i przyczyną śmierci. Etiologia tej choroby nie jest do końca wyjaśniona, a metod pozwalających na skuteczne wyleczenie wciąż brakuje.

Do czynników ryzyka, które mogą przyczynić się do jej wywołania należą: wiek powyżej 65 lat, choroby sercowo-naczyniowe, zaburzenia gospodarki lipidowej, cukrzyca oraz predyspozycje genetyczne (Zabłocka 2006). W chorobie Alzheimer dochodzi do upośledzenia funkcji poznawczych, które są podstawowymi objawami klinicznymi tej jednostki chorobowej. Dotyczą one podstawowych zachowań takich jak przetwarzanie i odbiór wiadomości, orientacja, pamięć oraz uwaga. Przyczyną tego jest gromadzenie się w obrębie kory mózgowej i hipokampu, a więc obszarów kontroli funkcji pamięciowych oraz poznawczych złogów białek β -amyloidu, w postaci komórek starczych, co prowadzi do rozwoju otępienia i stopniowego zaniku pamięci (Daniluk. i Borkowska 2008; Czapski i in. 2014).

W innych dziedzinach medycyny alkaloidy widłaków swoje zastosowanie znalazły również w homeopatii, wykazując działanie hepatoprotekcyjne i przeciwrakowe w przypadku nowotworu wątroby, co zostało udowodnione w badaniach na szczurach (Da Silva i in. 2015). Jako środki

moczopędne i przeczyszczające pozyskuje się z nadziemnych części widłaków w tym m. in. widłaka goździstego, natomiast w Ameryce Południowej i Północnej cała roślina znalazła zastosowanie jako afrodyzjak oraz w leczeniu bólu reumatycznego (Erdogan i in. 2007).

Bogaty skład chemiczny roślin należących do widłaków obejmuje: olej tłusty, substancje terpenowo-woskowe, fenolokwasy w tym kwas azelainowy, ferulowy, syryngowy, wanilinowy, cukry, alkaloidy, glikozydy flawonoidowe np. luteolina, apigenina oraz sole mineralne w tym dużo soli glinu (Kohlmunzer 1985).

Na aktywność biologiczną oraz wielokierunkowe działanie największy wpływ ma obecność związków należących do alkaloidów. Związki z tej grupy cechują się różnorodnością budowy i aktywnością biologiczną. Są to zasadowe związki organiczne, głównie pochodzenia roślinnego, które w swojej budowie zawierają atom lub atomy azotu w heterocyklicznych pierścieniach (Kolińska i in. 2016).

Alkaloidy *Lycopodium* zostały podzielone na cztery główne klasy: likopodyny, likodyny, fawcetyminy oraz alkaloidy o odmiennej budowie strukturalnej.

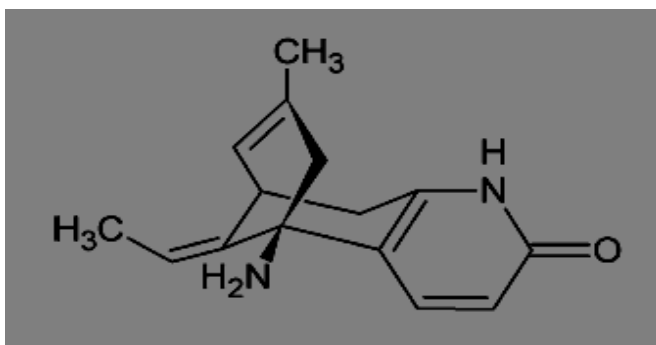
Większość związków alkaloidowych, które posiadają najsilniejszą zdolność do hamowania acetylocholinoesterazy należą do typu likodyny. Do przedstawicieli tej grupy należą takie alkaloidy jak hupercyna A (HupA), 6 β -hydroxyHupA, hupercyna B i inne. Hupercyna A jest najsilniejszym, odwracalnym i selektywnym inhibitorem AchE. To główny alkaloid *Lycopodium*, który został wyizolowany z widłaka wronca *Huperzia serrata* (Ferreira i in. 2014). Hupercyna A silnie hamuje rozkład neuroprzekaźnika (acetylocholino) poprzez inhibicję enzymu cholinoesterazy, powodując wzrost stężenia mediatora w przestrzeniach synaptycznych i prowadząc do poprawy efektywności mózgowej (Zangara i in. 2003). Właściwość ta została wykorzystana do leczenia wielu chorób neurodegeneracyjnych, oraz upośledzających procesy poznawcze jak schizofrenia czy miastenia. Badania wykazały, że hupercyna A poprzez zwiększenie stężenia acetylocholino w złączach nerwowo-mięśniowych zmniejsza zużycie mięśni (Ferreira i in. 2014). Obecnie w leczeniu farmakologicznym w terapii choroby Alzheimera stosowane są inhibitory acetylocholinoesterazy, do których należą donepezyl, riwastygmina, które wpływają na poprawę funkcji poznawczych i behawioralnych. Terapia polega wyłącznie na zahamowaniu objawów choroby, poprzez nasilenie neurotransmisji w układzie cholinergicznym. Dlatego podejmowane są próby poszukiwania inhibitorów acetylocholinoesterazy o większej efektywności oraz lepszej farmakokinetyce (Zabłocka 2006). Hupercyna A w porównaniu do wyżej wymienionych leków lepiej przenika przez barierę krew-mózg osiągając najwyższe stężenie w mózgu. Po podaniu doustnym charakteryzuje się wysoką biodostępnością, a powolny metabolizm prowadzi do utrzymania jej na stałym poziomie, dzięki czemu działanie jest przedłużone. Jest nietoksyczna, nie zaburza pracy narządów wewnętrznych oraz nie wykazuje działania teratogenne (Zangara 2003). Hupercyna A działa także ochronnie na komórki nerwowe, chroniąc je przed działaniem wolnych rodników, β -amyloidu, obniża toksyczny poziom glutamianu, co zapobiega apoptozie neuronów (Wang i in. 2006). Wykazuje ponadto, właściwości niekonkurencyjnego antagonisty receptorów NMDA, co wskazuje na to, że może być skuteczna u osób z epilepsją.

Warto wspomnieć również o innym przedstawicielu likodyn - hupercynie B, która chroni komórki przed uszkodzeniem spowodowanym zaburzeniami oksydacyjnymi i energetycznymi związanymi z niedoborem tlenu i glukozy. Badania te zostały przeprowadzone na szczurach z guzem chromochłonnym (Ferreira i in. 2014).

Alkaloidy z kolejnej grupy, z klasy fawcetymin np hupercyna P i R wykazują zdolność hamowania enzymu acetylocholinoesterazy (AChE), ale siła inhibicji jest znacznie mniejsza w porównaniu z hupercyną A, stąd ich małe zainteresowanie w lecznictwie. Z kolei alkaloidy z grupy likopodyn zostały przebadane w kierunku hamowania receptora NMDA co mogłoby dać początek w leczeniu osób chorych na padaczkę.

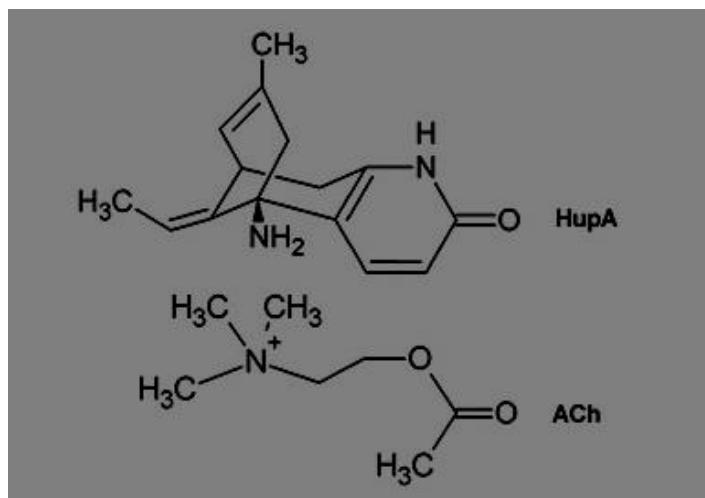
Silne działanie prowadzące do wzrostu poziomu neuroprzekaźnika acetylocholino w szczelinie synaptycznej związane jest z budową chemiczną hupercyny A (Rys. 2.). Odpowiada za to budowa pierścienia – α - pirydynowego, grupa aminowa, trójwęglowy mostek z podwójnym wiązaniem oraz grupa metylowa. Dodatkowo warto wspomnieć że duży wpływ wykazuje stereoizomeria tego związku. Hupercyna A jest aktywna optycznie i naturalnie występuje jako

lewoskrętny izomer. W porównaniu z izomerem prawoskrętnym posiada silniejsze właściwości inhibicji enzymu odpowiedzialnego za rozkład neuroprzekaźnika układu przywspółczulnego (Fereira i in. 2014)



Rys. 2. Wzór strukturalny - hupercyna A (Fereira i in. 2014).

Dodatkowo zauważono podobieństwo w budowie chemicznej pomiędzy cząsteczką hupercyny A a cząsteczką neuroprzekaźnika układu przywspółczulnego – acetylocholiny. Jak wynika z budowy, hupercyna A posiada podstawowe cechy strukturalne tego mediatora (Rys. 3.). Podobieństwo wynika z obecności w obu cząsteczkach atomów azotu, tlenu i grup karbonylowych. Jednoczesna obecność grupy aminowej, pierścienia α -pirydonowego, trójwęglowego mostu z podwójnym wiązaniem są odpowiedzialne za silny efekt hamujący hupercyny A wobec enzymu acetylocholinoesterazy. Tak więc eliminacja, bądź zastąpienie, co najmniej jednej z tych strukturalnych cech mogłaby radykalnie zmniejszyć aktywność hamującą hupercyny A na ten enzym, co wiązałoby się ze spadkiem jej znaczenia chociażby w leczeniu choroby Alzheimera (Fereira i in. 2014).



Rys. 3. Strukturalne podobieństwo pomiędzy cząsteczkami hupercyny A a acetylocholinoesterazą (Fereira i in. 2014).

4. Podsumowanie

Odkrycie właściwości inhibicji acetylocholinoesterazy ma przełomowe znaczenie w leczeniu jednych z najpowszechniejszych chorób neuropsychiatrycznych dotyczących głównie osób w podeszłym wieku, co w przełożeniu na starzenie się społeczeństw dotyczy coraz większej grupy. W poszukiwaniu leków, które odgrywałyby kluczową rolę w terapii choroby Alzheimera,

poszukuje się właściwości, które nie tylko będą niwelować niekorzystne objawy zachodzące w obrębie mózgu w czasie trwania choroby, ale takich, które będą doskonałe w próbach leczenia przyczynowego (Zabłocka 2006). Dlatego poszukiwanie leków pochodzenia naturalnego jest dużym wyzwaniem dla współczesnej nauki. Alkaloidy obecne w różnych gatunkach z rodziny widłakowatych (*Lycopodiaceae*) są bogatym źródłem tych związków o dużej aktywności biologicznej w zakresie hamowania acetylocholinesterazy i dlatego zasadna jest analiza fitochemiczna wybranych gatunków należących do rodzajów *Lycopodium* i *Huperzia*, w celu identyfikacji jakościowej i ilościowej tych związków, zbadania ich aktywności biologicznej oraz izolacja pojedynczych, jednorodnych związków lub ich frakcji. Wzbogaci to wiedzę ogólną na temat tej grupy roślin, jak i przyczyni się do zwiększenia „arsenału” substancji pochodzenia naturalnego wykorzystywanych do walki z chorobami XXI wieku.

5. Literatura

- Banerjee J, Biswas S, Madhu N. R, et al. (2014) A better understanding of pharmacological activities and uses of phytochemicals of *Lycopodium clavatum*: A review, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 3 (1): 207-210;
- Czapski G. A, Szypuła W, Kudlik M, et al. (2014) Assessment of antioxidative activity of alkaloids from *Huperzia selago* and *Diplazium complanatum* using in vitro systems, *Folia Neuropathol*; 52 (4): 394-406
- Da Silva G. F, Gandolfi P. H. K, Almeida R. N, et al. (2015) Analysis of supercritical fluid extraction of lycopodine using response surface methodology and process mathematical modeling, *Chemical Engineering Research and Design*, Vol. 100, pp. 353-361
- Daniluk J, Borkowska A (2008) Zaburzenia funkcji poznawczych i depresja w chorobie Alzheimerera, *zagadnienia neurobiologiczne*, 5 (2) 43-50
- Erdogan Orhan I, Ozelik B, Aslan S, et al. (2007) Antioxidant and antimicrobial actions of the clubmoss *Lycopodium clavatum* L., *Phytochem Rev*, Vol. 6, pp. 189-196
- Ferreira A, Rodrigues M, Fortuna A, et al. (2014) Huperzine A from *Huperzia serrata*: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology
- Kohlmunzer S (1985) *Farmakognozja*, PZWL; (300; 449)
- Kolińska A, Marciniak P, Adamski Z i in. (2016) Alkaloidy - naturalne substancje kardioaktywne. 65 (2): 247-256
- Mowszowicz J (1986) *Pospolite rośliny naczyniowe Polski*, PWN
- Perzanowska J (2012) *Monitoring gatunków roślin. Przewodnik metodyczny. Część III. GIOŚ*, Podbielkowski Z, Rejment-Grochowska I, Skirgiełło A, (1961) *Rośliny zarodnikowe Państwowe Wydawnictwo Naukowe*,
- Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 października 2014 r. w sprawie ochrony gatunkowej roślin (Dz. U. z 2014 r. Nr 0, poz. 1409).
- Szweykowska A, Szweykowski J (2006) *Botanika, tom 2 Systematyka*, PWN, 221 - 229
- Szypuła W (2013) *O filogenezie i systematyce rodziny widłakowatych Lycopodiaceae sensu lato - przegląd piśmiennictwa*
- Wang R, Yan H, Tang X, (2006) Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine, *Acta Pharmacologica Sinica*;27(1): 1–26
- Wszelaki N (2009) Hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez surowce roślinne i ich substancje czynne, *Postępy Fitoterapii*, s. 24-38
- Zabłocka A, (2006) Choroba Alzheimerera jako przykład schorzenia neurodegeneracyjnego, *PHMD* ; 60: 209-216
- Zangara A (2003) The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 75, 675–686
- Zhang H. Y, Zheng C. Y, Yan H (2008) Potential therapeutic targets of huperzine A for Alzheimer's disease and vascular dementia", *Chemico-Biological Interactions*, Vol. 175, pp. 396-402

12. Kumaryny jako inhibitory AChE

Aleksandra Dymek⁽¹⁾, Gabriela Widelska⁽²⁾, Dominik Straszak⁽³⁾, Monika Drózd⁽⁴⁾, Magdalena Dymek⁽¹⁾

⁽¹⁾Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾Katedra Chemii, Zakład Chemii Nieorganicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Opiekun naukowy: dr hab.n.farm. Tomasz Mroczek

Aleksandra Dymek: aleksandra.dymek91@interia.pl

Słowa kluczowe: furanokumaryny, Alzheimer, acetylocholinoesteraza

Streszczenie

Związki kumarynowe oraz rośliny w których są one obecne od dawna wykorzystywano w leczeniu różnych chorób. Były stosowane zarówno w lecznictwie tradycyjnym jak i obecnie są stosowane w nowoczesnej medycynie akademickiej. Kumaryny reprezentujące chemicznie zarówno furanokumaryny, piranokumaryny, jak i kumaryny proste wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe, wazodylatacyjne jak i spazmolityczne. Stosowane są w leczeniu bielactwa i łuszczycy. Wykazują też wielokierunkowe działania na ośrodkowy układ nerwowy, które obejmuje zarówno aktywność przeciwpadaczkową jak i przeciwlękową. Badania potwierdziły także zdolność wielu związków kumarynowych do hamowania aktywności acetylocholinoesteraz, co zwraca uwagę na związki kumarynowe, jako potencjalne substancje wykorzystywane w leczeniu choroby Alzheimera. Przykładem takich kumaryny jest dekursinol izolowany z *Angelica gigas* czy związki obecne w *Mutellina purpurea*, jak pteryksyna.

1. Wstęp

Choroba Alzheimera jest schorzeniem neurodegeneracyjnym, która przebiega z otępieniem. Cechą charakterystyczną tej choroby są zaburzenia czynności poznawczych, zaniki pamięci o charakterze postępującym, stopniową utratą zdolności do myślenia abstrakcyjnego, zdolności wykonywania w sposób logiczny i uporządkowany, a w miarę postępu choroby również tych najprostszych (Wszelaki 2009). Choroba Alzheimera (AD) jest najczęstszą postacią demencji oraz poważnym problemem medycznym i społecznym, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) oraz raportu Alzheimer's Association liczba chorych w 2010 roku wynosząca 35,6 milionów w ciągu 20 lat podwoi się. W Stanach Zjednoczonych chorobą Alzheimera dotkniętych było ok. 5,2 miliona osób, z czego ok. 200000 stanowili ludzie poniżej 65 roku życia. Przyczyny powstawania tego straszliwego schorzenia dla osoby nim dotkniętej, rodziny oraz dotkliwego dla społeczeństwa są wciąż niewyjaśnione, choć powiązane z podeszłym wiekiem. Jednak wiadomym jest, że schorzenie to związane jest z zaburzeniami układu cholinergicznego powiązanymi ze spadkiem poziomu acetylocholino w obszarach mózgu, które odpowiedzialne są za uczenie się, pamięć, zachowanie oraz reakcje uczuciowe, co prowadzi do zaburzenia funkcji poznawczych (Alzheimer's Association Report: 2014).

Biochemicznym obrazem choroby Alzheimera na poziomie komórkowym jest zarówno spadek stężenia acetylocholino w obszarach mózgu biorących udział w prawidłowym funkcjonowaniu pamięci oraz funkcji poznawczych (układ limbiczny z hipokampem, ciało migdałowate). Wewnątrz neuronów zaobserwować można proces akumulacji białek tau cytoszkieletu (ulegających fosforylacji), natomiast na zewnątrz neuronów centralnego układu nerwowego oraz w naczyniach mózgowych dochodzi do odkładania złogów, które składają się z białek oraz peptydów, które często uległy procesowi glikolizacji i noszą miano β -amyloidu (Pinho 2013; Wszelaki 2009).

Złogi oraz płytki starcze tworzone zarówno przez β -amyloid, jak i białko tau (ufosforylowane) generują stany zapalne w skutek zwiększenia poziomu wolnych rodników oraz aktywacji komórek gębowych (astro- i mikrogleju). Skutkiem ich obecności jest też obniżenie energii, co jest konsekwencją utraty mitochondriów biorących udział w jej wytwarzaniu, co w powiązaniu z zaburzeniami równowagi jonowej prowadzi do zniszczenia neuronów cholinergiczych. Fragmenty płytek starczych powodują znaczne osłabienie przewodnictwa, a to niekorzystne zjawisko potęguje obecny w tych strukturach enzym butyrylocholinoesteraza (Ball 2003; Wszelaki 2009).

W ośrodkowym układzie nerwowym istnieją dwa rodzaje enzymów hydrolitycznych zaliczanych do cholinoesteraz: acetylocholinoesteraza (AChE) oraz butyrylocholinoesteraza (BuChE), przy czym w zdrowym mózgu za degradację (hydrolizę) neuroprzekaźnika jakim jest acetylocholina jest odpowiedzialny pierwszy z enzymów (Ożarowski i in 2009). W trakcie rozwoju choroby Alzheimera aktywność AChE ulega redukcji o około 33 – 45 %, podczas gdy zdecydowanie (40 – 90%) zwiększa się stężenie drugiego z enzymów, czyli BuChE (Gauthier i in. 2003; Ożarowski i in. 2009). Wyniki badań dowiodły, że te dwa enzymy (ich stężenia) odgrywają równie istotną rolę w metabolizmie jednego z najważniejszych neuroprzekaźników jakim jest acetylocholina. Proces ten odbywa się na zasadzie kompensowania spadku poziomu AChE przez wzrastający poziom butyrylocholinoesterazy, zarówno u zdrowego, jak i chorego człowieka, a efektywne zwiększenie poziomu acetylocholiny powinno odbywać się przez inhibicję obu enzymów jednocześnie i substancje o takich właściwościach będą najskuteczniejsze (Gauthier i in. 2003; Ożarowski i in. 2009).

2. Opis zagadnienia

Kumaryny są związkami pochodzenia naturalnego występującymi w wielu gatunkach roślin, zwłaszcza w różnych organach (głównie owoce i korzenie) przedstawicieli rodzin *Apiaceae* (*Umbelliferae*) (Rys. 1), *Rutaceae*, *Asteraceae* (*Compositae*), *Labiatae* i wielu innych. Te metabolity



Rys. 1 Arcydgiegiel lekarski jest Źródłem wielu związków kumarynowych (źródło - https://pl.wikipedia.org/wiki/Dziegiel_litwor#/media/File:Koehler1887-GardenAngelica.jpg).

wtórne roślin cechują się wielokierunkową aktywnością biologiczną, wśród której wymienić należy działanie przeciwdrobnoustrojowe (Widelski i in. 2009). Związki kumarynowe o różnej budowie chemicznej, wliczając w to zarówno furanokumaryny, piranokumaryny oraz kumaryny proste wykazują aktywność farmakologiczną wobec ośrodkowego układu nerwowego (Senol i in 2011; Budzyńska i in. 2013). Znany jest również fakt oddziaływania kumaryn na receptory benzodiazepinowe, a także ich działanie przeciwlękowe (anksjolityczne) oraz powinowactwo do receptorów dopaminergicznych oraz serotoniny, a także zdolność inhibicji monoaminoooksydazy (Skalicka-Woźniak i in. 2016).

Trwają poszukiwania nowych substancji, które posiadają zdolność inhibicji acetylocholinoesterazy oraz butyrylocholinoesterazy. Współczesna medycyna, ma do dyspozycji w leczeniu objawowym początkowych oraz średnio-zaawansowanych etapów rozwoju choroby Alzheimera tylko kilka substancji leczniczych. Wśród nich wymienić można galantaminę (Reminyl), riwastygminę (Exelon) oraz donepezil (Aricept). Te substancje lecznicze są jednak obciążone licznymi działaniami niepożądanymi wśród których wymienić można zarówno zaburzenia żołądkowo-jelitowe, ograniczoną biodostępność a także niski stopień przenikalności przez barierę krew-mózg. Powoduje to konieczność poszukiwania innych, bezpieczniejszych oraz skuteczniejszych środków leczniczych.

Nowe substancje hamujące rozkład (hydrolizę) acetylocholinoesterazy to w dużej mierze substancje pochodzenia roślinnego. Medycyna ludowa zna liczne rośliny, których używano tradycyjnie w leczeniu zaburzeń pamięci lub funkcji poznawczych, a także w zaburzeniach funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Związki pochodzenia roślinnego, którym udowodniono działanie hamujące aktywność acetylocholinoesterazy oraz butyrylocholinoesterazy, mają różnorodną budowę chemiczną i należą do różnych grup związków pochodzenia naturalnego. Większość z nich należy do alkaloidów. Najliczniejsze w tej grupie związki reprezentują alkaloidy typu steroidowego oraz indolowego. Najbardziej znanym alkaloidem indolowym jest fizostygmina, która otrzymywana jest z rośliny *Physostigma venenosum* Balf., używana niegdyś przez plemiona afrykańskie jako trucizna. Silnie hamuje zarówno acetylocholinoesterazę, jak i butyrylocholinoesterazę, jednak ma krótki okres półtrwania, co utrudnia jej stosowanie w lecznictwie.

Galantamina to inny przykład alkaloidu typu *Amaryllidaceae* wyizolowanego z przebiśniegu (*Galanthus nivalis* L.), z którego wyciągi były stosowane w medycynie ludowej w Bułgarii i Turcji do leczenia schorzeń neurologicznych. Powinowactwo galantaminy do acetylocholinoesterazy jest 100 razy większe niż do butyrylocholinoesterazy. Ponadto związek ten jest allosterycznym aktywatorem receptora nikotynowego, czyli łączy się z receptorem w miejscu innym niż miejsce wiązania acetylocholinoesterazy, nasilając jej działanie (Wszelaki 2009). Pacjenci biorący udział w badaniach klinicznych, zanotowali poprawę funkcji poznawczych oraz większą samodzielność w zajęciach dnia codziennego (Wszelaki 2009).

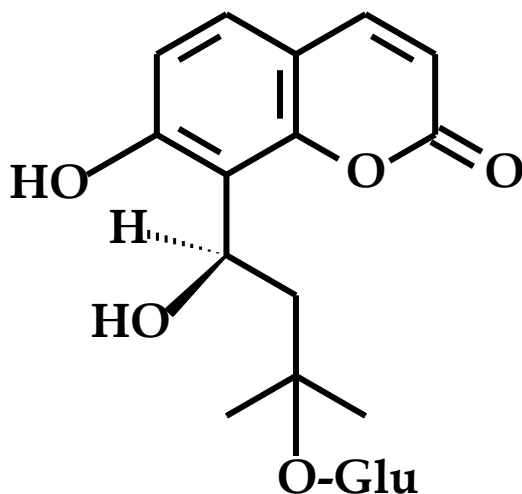
3. Przegląd literatury

W licznych badaniach potwierdzono aktywność inhibicji cholinoesteraz przez liczne związki należące do kumaryn (Orhan, Gulcan 2015). Badania dotyczące aktywności kumaryn wykazały, że kumaryny podstawione przy pierścieniu w pozycji C-7 małymi grupami funkcyjnymi, typu hydroksylowa lub metoksylova cechują się niższą aktywnością inhibicyjną w stosunku do acetylocholinoesterazy. Podstawniki w pozycji C-3 modulują aktywność inhibicji zarówno w stosunku do AChE jak i monoaminoooksydazy. Podstawniki metylowe w pozycjach C-3 i C-4 zwiększają aktywność związków kumarynowych wobec obu enzymów, podczas gdy podstawniki w pozycji C-4 np. fenylove, trifluorometylowe lub hydroksylowe silnie obniżają aktywność inhibicji MAO (monoaminoooksydazy).

Bogatym źródłem substancji kumarynowych, zwłaszcza furanokumaryn oraz kumaryn prostych są gatunki należące do rodzaju *Peucedanum* reprezentującego rodzinę *Apiaceae* (Chinou i in. 2007). Spośród pięciu kumaryn wyizolowanych z korzenia *Peucedanum ostruthium* (L.) W.D.J. Koch (*Apiaceae*) najbardziej aktywnym związkiem okazał się ostruthiol (Urbain i in. 2005). W badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem testów bioautograficznych TLC przy zastosowaniu innych znanych związków wykazujących aktywność inhibicji AChE takich jak

hupercyna A oraz bromowodorek galantaminy, związek kumarynowy (ostrutiol) okazał się dziesięciokrotnie silniejszy od galantaminy a równie aktywny co hupercyna A (Urbain i in. 2005). Wskazuje to na słuszność poszukiwań efektywnych inhibitorów acetylocholinoesterazy wśród furanokumaryn.

W innym badaniu określono aktywność inhibicyjną w stosunku do acetylocholinoesterazy dwunastu różnych kumaryn, przy czym największą aktywnością cechowały się pochodne piranokumaryn (Anand i in. 2012; So YK i in. 2001). Dekursynol, dihydropiranokumaryna, okazał się być skutecznym inhibitorem AChE ($IC_{50}=2,8 \times 10^{-5}$). Natomiast inne związki kumarynowe jak dekursyna (pozbawiona grupy hydroksylowej w pozycji C-3') jak i ksantyletyna (z podstawioną grupą hydroksylową w pozycji C-3') okazały się być w zasadzie nieaktywne, jako inhibitory acetylocholinoesterazy (IC_{50} odpowiednio $3,9 \times 10^{-4}$ oraz $1,5 \times 10^{-4}$). Dane te świadczą o fakcie, że wolna grupa hydroksylowa w pozycji C-3' ma podstawowe znaczenie dla tego typu aktywności w przypadku piranokumaryn (Skalicka i in. 2016). Liczne gatunki zawierające piranokumaryny są badane w kierunku aktywności powodującej zwiększenie stężenia acetylocholinoesterazy w centralnym układzie nerwowym. Szczególnie bogate w związki o takiej strukturze chemicznej jest rodzaj *Seseli* (żebrzyca) należący do rodziny *Umbelliferae* (*Apiceae*) (Widelski i in. 2005). Jeden z przedstawicieli tego rodzaju *Seseli devenyense* zawiera liczne związki należące do piranokumaryn, czego przykładem może być deweniozyd A (glikozyd kumarynowy) (Rys.2).



Rys. 2. Wzór deweniozydu A, izolowanego z owoców *Seseli devenyense*.

Inna kumaryna skopoletyna oraz jej glikozydowa pochodna skopolina były badane w kierunku właściwości hamujących aktywność acetylocholinoesterazy. Wyniki badań pokazały, że oba te związki wykazują umiarkowaną, ale istotną zdolność do hamowania aktywności enzymów rozkładających neuroprzekaźnik (acetylocholinę), a samo działanie ma charakter trwały i zależny od dawki (Rollinger i in. 2004; Skalicka i in. 2016). Pomimo umiarkowanej (niezbyt silnej) aktywności *in vitro* badanych kumaryn (skopoletyny i skopoliny) eksperymenty przeprowadzone *in vivo* wykazały niezbicie, że oba związki kumarynowe zwiększały zewnątrzkomórkowe stężenie neuroprzekaźnika, jakim jest acetylocholina (ACh) w mózgu badanych szczurów o 170 % i 300 % w stosunku do linii bazowej (Rollinger i in. 2004; Skalicka i in. 2016). Rzeczywiście aktywność skopoletyny była na takim samym poziomie jak aktywność znanego i przebadanego klinicznie inhibitora acetylocholinoesterazy, jakim jest galantamina (związek izolowany z *Galnthus* – przebiśniegu) (Loizzo i in 2008; Rollinger i in. 2004; Skalicka i in. 2016). Inne badania potwierdziły aktywność skopoletyny, jako inhibitora acetylocholinoesterazy, która została wyizolowana z liści *Vaccinium oldhami* Miquel. (family *Ericaceae*) a wartość $IC_{50}=52 \mu\text{M}$ (Loizzo i in 2008; Rollinger i in. 2004; Skalicka i in. 2016). W innym badaniu, w którym sprawdzono aktywność siedmiu różnych związków kumarynowych skopoletyna obok 4-metylumbelliferonu wykazały aktywność

inhibicyjną w stosunku do acetylocholinoesterazy oraz butyrylocholinoesterazy o 50 % w dawce 1 mg/ml (Skalicka i in. 2016).

Jest rzeczą oczywistą, że budowa chemiczna ma decydujący wpływ na budowę przestrzenną danej cząsteczki, co determinuje jej aktywność. Dotyczy to także aktywności inhibicji acetylocholinoesterazy, które jest potęgowane przez cykliczny podstawnik izoprenoidowy w pozycji C6 w przypadku furanokumaryn i piranokumaryn w stosunku do kumaryn prostych. Jest kwestią udowodnioną, że obecność podstawników o dużych rozmiarach w pozycji C-5 oraz C-8 szkieletu kumarynowego zwiększa znacząco aktywność hamującą acetylocholinoesterazę związków kumarynowych należących do furanokumaryn. Taka zależność potwierdziła aktywność ksantotoksyny oraz izopimpinliny izolowanych z korzenia gatunku *Angelica acutiloba* (Siebold&Zucc) Kitag z rodziny *Apiaceae*, gdzie wartości $IC_{50}=0.58$ i $0,32 \mu\text{M/ml}$ (Skalicka i in 2016).

Liczne badania dotyczyły wielu innych związków kumarynowych obecnych i izolowanych z wielu gatunków roślin należących do wielu różnych rodzin botanicznych. Wszystkie one potwierdzają, że liczne związki należące zarówno do kumaryn złożonych (furanokumaryn oraz piranokumaryn) oraz kumaryn prostych są dobrymi inhibitorami acetylocholinoesterazy, butyrylocholinoesterazy lub obu tych enzymów naraz.

4. Podsumowanie

Według danych zarówno WHO jak i innych organizacji zaburzenia neurologiczne i psychiatryczne są i w przyszłości będą bardzo istotnymi i coraz gwałtowniej narastającymi problemami medycznymi i społecznymi. Choroby te, w tym choroba Alzheimera i inne typy demencji, będą dotykały coraz większej liczby osób ze względu na gwałtowne starzenie się społeczeństw krajów rozwiniętych. Dostępne metody leczenia (substancje lecznicze) cechują się niezadowalającą skutecznością i są obciążone wieloma działaniami niepożądanymi. Stwarza to pilną potrzebę i wciąż aktualną konieczność poszukiwania nowych strategii terapeutycznych opartych o nowe substancje lecznicze. Po raz kolejny współczesna medycyna rozczarowana lekiem syntetycznym sięga do natury, do świata roślin z nadzieją, że znajdzie tam odpowiedź na wielkie wyzwanie współczesnej medycyny jakim jest choroba Alzheimera. Pozostaje mieć nadzieję, że w którejś, być może niepozornej roślinie kryje się substancja, która sprostą temu wyzwaniu i będzie stanowić nowy lek dla osób cierpiących na demencje lub da początek całej grupie leków. Obiecujące wyniki badań z ostatnich lat pozwalają przypuszczać, że może to być któraś z kumaryn.

5. Literatura

- Alzheimer's Association (2014) Alzheimer's Association Report: 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's&Dementia* 10: e47-e92.
- Anand P, Singh B, Singh N (2012) A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic& Medicinal Chemistry* 20: 1175 – 1180.
- Ball S (2003) Chemia szarych komórek. *Neurochemia i toksykologia ośrodkowego układu nerwowego*. Warszawa. Medyk:128-130.
- Budzyńska B, Boguszewska - Czubara M, Kruk - Słomka M. *et al.* (2013) Effects of imperatorin on nicotine - induced anxiety - and memory - related responses and oxidative stress in mice. *Physiology & Behavior* 122: 46-55.
- Chinou I, Wideliski J., Fokialakis N, *et al.* (2007) Coumarins from *Peucedanum luxurians*. *Fitoterapia* 78: 448 – 449.
- Gauthier S, Emre M, Farlow MR *et al.* (2003) Strategies for continued successful treatment of Alzheimer's disease: switching cholinesterase inhibitors. *Curr Med. Res Opin* 19(8); 707-714.
- Loizzo MR, Tundis R, Menichini F *et al.* (2008) Natural products and their derivatives as cholinesterase inhibitors in the treatment of neurodegenerative disorders : un updte . *Curr Med. Chem* 15: 1209 – 1228.
- Orhan IE, Gulcan HO (2015) Coumarins: auspicious cholinesterase and monoamine oxidase inhibitors, *Curr. Topics Med. Chem.* 15 :1673–1682.

- Ożarowski M, Mikołajczak PŁ, Bobkiewicz –Kozłowska T. i in. (2009) Neuroaktywne związki roślin leczniczych z rodziny *Lamiaceae* wykazujące potencjalnie korzystne działanie w leczeniu choroby alzheimera. *Herba Polonica* 55 : 148-163.
- Pinho BR, Ferreres F, Valentao P *et al.* (2013) Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibition activity: an approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65: 1681-1700.
- Rollinger JM, Hornick A, Langer T *et al.* (2004) Acetylcholinesterase inhibitory activity of scopolin and scopoletin discovered by virtual screening of natural products. *J Med. Chem* 47 : 6248 - 6254
- Senol FS, Skalicka - Woźniak K, Khan MTH *et al.* (2011) An in vitro and in silico approach to cholinesterase inhibitory and antioxidant effects of the methanol extract, furanocoumarin fraction, and major coumarins of *Angelica officinalis* L. fruits. *Phytochemistry Letters* 4: 462-467.
- So YK, Ki YL, Sang HS *et al.* (2001) Coumarins isolated from *Angelica gigasi* inhibit acetylcholinesterase : structure – activity relationships. *J. Nat. Prod.* 64 : 683- 685
- Skalicka-Woźniak K, Orhan IE, Cordell GA *et al.* (2016) Implication of coumarins towards central nervous system disorders. *Pharmacological Research* 103: 188–203.
- Urbain A, Marston A, Hostettmann K (2005) Coumarins from *Peucedanum ostruthium* as inhibitor of acetylcholinesterase. *Pharmaceutical Biology* 43: 647 - 650
- Widelski J, Melliou E, Fokialakis N *et al.* (2005) Coumarins from the fruit of *Seseli deventense*. *J.Nat.Prod.* 66: 1637-1641.
- Widelski J, Popova M, Graikou K *et al.* (2009) Coumarins from *Angelica lucida* L. - Antibacterial Activities. *Molecules* 14: 2729-2734.
- Wszelaki N (2009) Hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy i butyrylocholinoesterazy przez surowce roślinne i ich substancje czynne, *Postępy Fitoterapii* 1: 24 -38.

13. Biowęgiel jako alternatywne źródło materii organicznej i jego zastosowanie w rolnictwie

Biochar as an alternative source of organic matter and its use in agriculture

Marta Wyzińska⁽¹⁾, Marzena Mikos-Szymańska⁽²⁾

⁽¹⁾ Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Uprawy Roślin Zbożowych, Puławy

⁽²⁾ Instytut Nowych Syntez Chemicznych, Zakład Nawozów, Puławy

Wyzińska Marta: mwyzinska@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: biowęgiel, materia organiczna, zastosowanie w rolnictwie

Streszczenie

Opracowanie obejmuje przegląd badań dotyczących wykorzystania biowęgla w rolnictwie jako alternatywnego źródła materii organicznej. Przedstawiono wpływ biowęgla na środowisko glebowe i roślinę uprawną. Na podstawie przedstawionych badań można stwierdzić, że wprowadzenie biowęgla do środowiska glebowego ma pozytywny wpływ na mikroorganizmy glebowe. Nie bez znaczenia jest również surowiec z którego ten biowęgiel powstał, a także temperatura w jakiej przeprowadzono proces pirolizy. Zagadnienie przedstawiono na podstawie przeglądu literatury dotyczącej tematu.

1. Wstęp

Na świecie obserwujemy wzrost liczby ludności, wiąże się to bezpośrednio ze wzrastającym zapotrzebowaniem na żywność, a szacunki mówią, że do roku 2050 produkcja ziarna musi wzrosnąć o 50-70% (Ladha i in. 2005). Prognozy te stają się realne poprzez prowadzenie hodowli lepszych i plenniejszych odmian ale również dzięki postępowi agrotechnicznemu i efektywniejszemu wykorzystaniu składników pokarmowych (Anioł 2010, Ladha i in. 2005) oraz wprowadzaniu do środowiska produktów i substancji poprawiających żyzność gleby. Podstawowym wskaźnikiem, który świadczy o żyzności gleb jest zawartość materii organicznej. Uprawa roślin skutkuje jej ubytkami w glebie, co musi być wyrównane w postaci nawożenia obornikiem lub innymi nawozami naturalnymi czy też organicznymi, w tym także słomą (Maćkowiak 1998). Można również wprowadzić do środowiska glebowego alternatywne źródło materii organicznej, takie jak biowęgiel. Bardzo ważne jest aby utrzymać dodatni lub co najmniej zrównoważony bilans glebowej materii organicznej, ponieważ jest to jedną z podstawowych miar poprawności gospodarowania w rolnictwie (Kuś i Krasowicz 2001).

2. Opis zagadnienia

Materia organiczna w dużej mierze świadczy o właściwościach fizycznych, chemicznych oraz biologicznych gleby (Kowalski i Gonet 1999). Jak podaje definicja Prusinkiewicza (1999): „Glebowa materia organiczna to organiczna część gleby składająca się z resztek roślinnych i zwierzęcych w różnych stadiach mineralizacji i humifikacji oraz organicznych produktów działalności życiowej organizmów glebowych, występuje częściowo w stanie wolnym, a częściowo w postaci kompleksów mineralno-organicznych”. Obrót i trwałość materii organicznej w glebie wynosi od niespełna roku do tysiąca lat w zależności od jej rodzaju. Najszybciej ulegają mineralizacji oraz przemianom świeży materiał roślinny (ściółka, resztki poźniwne) oraz mikroorganizmy glebowe (Sapek 2010).

Wśród organicznych związków, które występują w materii organicznej są substancje humusowe – kwasy humusowe i huminy oraz związki mineralno-organiczne (związki policykliczne, których struktura składa się z dwu lub więcej pierścieni karbocyklicznych lub heterocyklicznych tj. zawierających poza węglem inne pierwiastki (N i P). Przybliżony skład chemiczny próchnicy przedstawia się następująco: 60% C, 30% O, 6% N, 1,2% P, 0,9% S i mikroelementy. Wzajemny

stosunek poszczególnych makroelementów to 10:1:0,2:0,15. Jak podaje Pałosz (2009) w glebie ulokowane jest dwa razy więcej węgla niż w ziemskiej atmosferze.

Biowęgiel jest doskonałym źródłem materii organicznej. Jest on drobnoziarnistym karbonatem, który zawiera dużą ilość węgla, a także jest odporny na rozkład (IBI 2015). Powstaje on w wyniku pirolizy biomasy w beztlenowych warunkach w zakresie temperatur 350-700°C (Lehman 2007). Jest on czarną, lekką drobnoziarnistą substancją, której silne porowate drobinę zachowują strukturę przestrzenną celulozowego materiału, z którego on powstaje (Sohi i in. 2009). Jego właściwości zależą od surowca, z którego został wytworzony oraz parametrów procesu pirolizy (czas spalania i temperatura). W zależności od rodzaju surowca oraz warunków pirolizy biowęgiel może zawierać 50-90% węgla, 1-15% wody, 0-40% substancji lotnych oraz 0,5-5% mikro- i makroelementów.

Tabela 1. Surowce używane do produkcji biowęgla (Kwapiński i in. 2010, Bird i in. 2011, Ibarrola i in. 2012)

Rodzaje surowców	Wyszczególnienie
rolnicze	Rośliny energetyczne (miskant, wierzba), łodygi tytoniu i bawełny, kolby kukurydzy, owies pofermentacyjny, wytloki trzciny cukrowej i sorga, łuski ryżowe, lupiny słonecznika, orzechów laskowych i kokosowych, odpady z produkcji oliwy, bambus, słoma z pszenicy, ryżu, rzepaku i kukurydzy, zdrewniałe części lnu, plewy pszenicy, obornik bydlęcy, pomiot kurzy, algi
leśne	kora klonu i drzew iglastych, palety sosnowe, trociny z topoli osiki, drewno bukowe, brzożowe i sosnowe, torf, mech
odpady	z fabryk herbaty, papier (w tym także gazetowy), odpady płynne, organiczne odpady komunalne i osady ściekowe

3. Przegląd literatury

Zastosowanie węgla w formie popiołu i odpadów bytowych sięga okresu przedkolumbijskiego. Na terenie Amazonii dzięki stosowaniu popiołu wskutek działalności antropogenicznej (wypalanie puszczy pod uprawy, wyrzucanie popiołu z palenisk) lub też naturalnej (pożary) powstały bardzo żyzne gleby zwane Terra Preta de Indios. Gleby te są zasobne w węgiel i składniki pokarmowe gleby i zajmują płaty o powierzchni sięgającej zwykle 2 ha. Od sąsiednich gleb wyróżnia je wysoka zawartość węgla (nawet 150 g C·kg⁻¹) oraz wielkość warstwy wzbogacenia w węgiel (Novotny i in. 2009).

Poprzez określenie właściwości fizycznych, chemicznych i mikrobiologicznych gleby obserwujemy wpływ działalności rolniczej i pozarolniczej na środowisko glebowe. Analiza stanu gleb w Polsce wykazuje, że ten wpływ nie zawsze jest dobry. Niepodważalne znaczenie w wielu procesach biochemicznych ma próchnica glebowa, a jej deficyt ciągle się pogłębia poprzez nieumiejętne gospodarowanie środowiskiem glebowym. Skłania to do poszukiwania alternatywnych źródeł substratów, które mogą tworzyć próchnicę. Dodatek zewnętrznego źródła materii organicznej, może wpływać na istotne zmiany jakości i ilości związków próchnicznych.

3.1. Wpływ biowęgla na środowisko glebowe i roślinę

Jednym z wiodących obszarów badawczych w Europie w ostatnich latach jest biowęgiel i jego produkcja. Dynamicznie rozwija się przede wszystkim obszar dotyczący udoskonalania instalacji do produkcji biowęgla, modyfikacja (poprawa jakości) biowęgla oraz wytwarzanie produktów na jego bazie. Definicja International Biochar Initiative mówi, że biowęgiel to drobnoziarnisty karbonizat o wysokiej zawartości węgla organicznego i o nieznacznej podatności na degradację, otrzymuje się go w procesie pirolizy biomasy i odpadów biodegradowalnych.

Biowęgiel wykorzystywany jest przede wszystkim na cele inne niż energetyczne (w ochronie środowiska oraz rolnictwie). Jest to stałe paliwo odnawialne otrzymywane z różnych rodzajów biomasy w procesie pirolizy, w której powstają paliwa ciekłe i gazowe (Bis 2012). Można stwierdzić, że biowęgiel jest produktem ubocznym pirolizy. Materiał z którego produkuje się biowęgiel jest bardzo zróżnicowany (rośliny energetyczne, odpady leśne, biomasa: rzepak, słonecznika, kolb kukurydzy ale również osady ściekowe, organiczne odpady czy też pomiot kurzy (Kwapiński i in. 2010, Sanchez i in. 2009, Song i Guo 2012, Ibarrola i in. 2012). Jego właściwości opisywane są szeroko w literaturze przedmiotu, a lista obszarów w których można go wykorzystać stale rośnie. Obecnie produkt ten znajduje swoje zastosowanie w rolnictwie, ochronie środowiska czy też różnych gałęziach przemysłu. Może być wykorzystywany dogłębnie jako naturalny nawóz z dodatkiem gnojowicy czy też dodatek do kompostu. Istnieje wiele badań potwierdzających korzystny wpływ biowęglu na wzrost i rozwój roślin. Badania Gebremedhin i in. (2015) wskazują korzystny wpływ biowęglu na plon i cechy struktury plonu pszenicy. Zastosowanie biowęglu w ilości $4 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ powodowało wzrost plonu ziarna i słomy w stosunku do obiektu kontrolnego. W doświadczeniu wazonowym (Hossain i in. 2011) dodatek biowęglu z osadów ściekowych ($10 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$) zwiększył plonowanie pomidorów o 64% w porównaniu do kontroli. Autorzy tłumaczą to synergicznym efektem zwiększonej dla roślin dostępności składników odżywczych ale również poprawą właściwości gleby. Uzoma (2011) twierdzi, że zastosowanie biowęglu w ilości 15 i $20 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ zwiększyło wydajność ziarna odpowiednio o 150 i 98%. Z kolei Graber (2010) stwierdził większą liczbę pąków i owoców upomidorów na obiektach z biowęgłem. Czteroletni eksperyment (Major i in. 2010) przeprowadzony z kukurydzą dowodzi, że w drugim, trzecim i czwartym roku badań po zastosowaniu biowęglu w ilości $20 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Wydajność kukurydzy wzrastała w stosunku do kontroli odpowiednio o 28, 30 i 140%. Jonest i in. (2012) donoszą, że po zastosowaniu biowęglu w ilości 25 i $50 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ poprawie uległa wysokość i całkowita biomasa trawy. Autorzy tłumaczą to poprawą wchłaniania makro i mikroelementów. Biowęgiel wykorzystywany jest także jako dodatek do kiszzonek i pasz. Ma on również zastosowanie przy oczyszczaniu wody w stawach rybnych. Stosuje się go także do usuwania zanieczyszczeń ze środowiska gruntowo-wodnego jako sorbent. Biowęgiel wspomaga także proces kompostowania oraz fermentacji metanowej.

Resztki poźniwe, nawozy organiczne i naturalne ale również odpady organiczne o odpowiedniej jakości mogą być źródłem materii organicznej (Kwiatkowska-Malina i Maciejewska 2009). Wydaje się, że doskonale może się sprawdzić także wprowadzenie biowęglu do środowiska glebowego. Potwierdzenie korzystnego wpływu dodatku materii organicznej na żyzność gleby ale również na wielkość plonów można znaleźć w literaturze przedmiotu (Ciećko i in. 2001, Sienkiewicz i in. 2005, Wołoszczyk i in. 2005).

Wprowadzenie do gleby biomasy korzystnie wpływa na tworzenie mocnego kompleksu sorpcyjnego, co jest szczególnie ważne na glebach lekkich. Jednak wprowadzenie biomasy w dużych ilościach i rozkładanie jej przez mikroorganizmy prowadzi do uwalniania kwasów organicznych i wzrostu zakwaszenia gleby (Filipek i Skowrońska 2013). W związku z tym, że biowęgiel jest odporny na rozkład mikrobiologiczny, to wprowadzenie materii organicznej w takiej formie nie będzie skutkowało dalszym obniżeniem pH. Malisa i in. (2011) donoszą, że biowęgiel ma właściwości odkwaszające. Kurth i in. (2006) uważają, że dodatek biowęglu korzystnie wpływa na mikroorganizmy glebowe, które odgrywają kluczową rolę w strukturze i funkcjonowaniu gleby. Odpowiedzialne są za tworzenie gleb czy rozkład pozostałości roślinnych. Do najistotniejszych czynników środowiskowych wpływających na ich liczebność, różnorodność a także aktywność zalicza się wilgotność, temperaturę oraz pH (Wardle 1998). Biowęgiel wspomaga aktywność wielu mikroorganizmów glebowych ważnych dla rolnictwa. Lehmann i in. (2011) twierdzą, że wprowadzenie biowęglu do gleby ma znaczący wpływ na właściwości biotyczne gleby. Porowata struktura biowęglu może stanowić odpowiednie siedlisko dla wielu mikroorganizmów dostarczając im węgiel, energię i składniki mineralne. Wzrost i liczebność bakterii może wiązać się z powierzchnią sorbcyjną biowęglu. Biowęgiel dzięki swoim właściwościom sorpcyjnym również chroni mikroorganizmy przed suszą. Sezonowe okresy posuchy w glebach, gdzie nie zastosowano biowęglu prowadzą do stresu, a w konsekwencji do śmiertelności niektórych bakterii. Badania (Woolf 2008) wskazują, że biowęgiel w sposób pozytywny wpływa on na mikoryzę.

Wprowadzenie biowęglu do środowiska glebowego powoduje wzrost zawartości węgla organicznego (Larid 2008, Oleszczuk i in. 2014) ale również innych biogenów – N, P, K i Mg (Chang i in. 2007). Literatura donosi, że dzięki wysokiej pojemności jonowymiennej i powierzchni właściwej biowęgiel redukuje emisję metanu i tlenu azotu z gleby (Woolf i in. 2010, Malińska 2012), a także korzystnie wpływa na wykorzystanie nawożenia przez rośliny (Lal 2008). Według Lehmana (2007) redukcja emisji gazów cieplarnianych możliwa jest dzięki lepszemu napowietrzeniu gleby i ewentualnemu spowolnieniu obiegu azotu.

Biowęgiel wykorzystywany jest także do neutralizacji metali ciężkich w glebach. Ogranicza on pobieranie metali ciężkich z gleby przez roślinę na niej uprawianą (Nagussie i in. 2012). Stwierdzono również, że produkt ten ogranicza negatywny wpływ pestycydów na mikroorganizmy glebowe. Możliwe jest to dzięki sorbowaniu i immobilizowaniu środków ochrony roślin i ich pozostałości oraz pobudzaniu aktywności enzymatycznej gleby (Kookana 2010, Sopena i Bending 2013, Tarkova i in. 2013, Oleszczuk i in. 2014).

Wprowadzenie biowęglu do środowiska glebowego powinno następować po spełnieniu odpowiednich wymagań dotyczących jakości, a także bezpieczeństwa tego produktu. Różnego rodzaju zanieczyszczenia, w szczególności metale ciężkie mogą powodować skażenie środowiska. Dlatego tak ważne jest określenie charakterystyki wyprodukowanego biowęglu pod kątem określenia ich zawartości.

Dodatek biowęglu do gleb zwiększa ich żyzność, a także wpływa na zmiany klimatyczne poprzez sekwestrację węgla w glebie i redukcję emisji N_2O oraz CH_4 z gleb. Produkt ten zwiększa pojemność wodną oraz pH gleby, ale również zapobiega wymywaniu składników pokarmowych oraz wiąże organiczne i nieorganiczne zanieczyszczenia (Lehman i Joseph 2009). Badania wskazują również, że biowęgiel dzięki wysokiej pojemności jonowej charakteryzuje się zdolnością do retencji i wymiany substancji pokarmowych w glebie (Lehman i Joseph 2009, Lehman 2007, McHenry 2009).

4. Podsumowanie

Wprowadzenie biowęglu do środowiska glebowego korzystnie wpływa nie tylko na poprawę właściwości fizycznych i chemicznych gleby ale również na mikroorganizmy glebowe. W zależności od rodzaju biowęglu liczebność bakterii jest różna. Biowęgiel działa jako sorbent, a na podstawie przedstawionej literatury można stwierdzić, że w korzystny sposób kształtuje plony roślin uprawnych.

5. Literatura

- Anioł A (2010) Wpływ biotechnologii i procesów globalizacji w gospodarce na hodowlę roślin i wspierające ten sektor badania naukowe. *Biul IHAR* 256: 3-13.
- Bird MI, Wurster CM, de Paula Silva PH et al. (2011) Algal biochar – production and properties, *Bioresource Technology*, 102: 1886-1891.
- Bis Z (2012) Biowęgiel - powrót do przeszłości, szansa dla przyszłości. *Czysta energia*. 6.
- Chan KY, Van Zwieten L, Meszaros I, Downie A, Joseph S (2007) Agronomic values of green waste biochar as a soil amendment, *Australian Journal of Soil Research* 45(8): 629-634.
- Ciećko Z, Wyszowski M, Krajewski W, Zabielska J (2001) Effect of organic matter and liming on the reduction of cadmium uptake from soil by triticale and spring oilseed rape. *The Science of the Total Environment* 281: 37-45.
- Filipek T, Skowrońska M (2013) Aktualnie dominujące przyczyny oraz skutki zakwaszenia gleb użytkowanych rolniczo w Polsce. *Acta Agrophysica*, 20(2): 283-294.
- Gebremedhin GH, Haliesselassie B, Berhe D, Belay T (2015) Effect of biochar on yield and yield components of wheat and post-harvest soil properties in Tigray, Ethiopia. *Journal of Fertilizer & Pesticides*. 6: 1-4.
- Graber ER, Harel YM, Kolton M et al. (2010) Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant Soil*. 337: 481-496.
- Hossain MK, Strezov V, Chan KY, Ziolkowski A, Nelson PF (2011) Influence of pyrolysis temperature on production and nutrient properties of wastewater sludge biochar, *Journal of Environmental Management*. 92: 223-228.

- Ibarrola R, Shackely S, Hammond J (2012) Pyrolysis biochar systems for recovering biodegradable materials: a life cycle carbon assessment. *Waste Management*. 32: 859-868.
- International Biochar Initiative (2015) <http://www.biochar-international.org/biochar>
- Jones DL, Rousk J, Edwards-Jones G et al. (2012) Biochar mediated changes in soil quality and plant growth in three year field trial. *Soil Biology and Biochemistry*. 45: 113-124.
- Kookana RS (2010) The role of biochar in modifying the environmental fate, bioavailability and efficacy of pesticides in soils: a review. *Aust. J. Soil Res.* 48: 627-637.
- Kowalski S, Gonet S (1999) Materia organiczna gleby. W: *Gleboznawstwo*. Pr. Zbiorowa. Red. S. Zawadzki. Warszawa. PWRiL: 237-260.
- Kurth VJ, MacKenzie MD, DeLuca TH (2006) Estimating charcoal content in forest mineral soils, *Geoderma*, Volume 137(1-2): 135-139.
- Kuś J, Krasowicz S (2001) Przyrodniczo-organizacyjne uwarunkowania zrównoważonego rozwoju gospodarstw rolnych. *Pamiętnik Puławski*. 124: 273-288.
- Kwapinski W, Byrne CMP, Kryachko E, Wolfram P, Adley C, Leahy JJ, Novotny EH, Hayes MHB (2010) Biochar from Biomass and Waste. *Waste Biomass Valorization* 1: 177-189.
- Kwiatkowska-Malina J, Maciejewska A (2009) Wpływ materii organicznej na pobieranie metali ciężkich przez rzodkiewkę i facelię, *Ochrona Środowiska i Zasobów Naturalnych* (40): 217-223.
- Ladha J, Pathak H, Krupnik T, Six, J, van Kessel C (2005) Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects. *Adv. Agron.* 87: 85-156.
- Laird DA (2008) The charcoal vision: a win-win-win scenario for simultaneously producing bioenergy, permanently sequestering carbon, while improving soil and water quality, *Agronomy Journal* 100, 178-181.
- Lal R (2008) Soils and food sufficiency, A review, *Agronomy for Sustainable Development*. Volume 29(1): 113-133.
- Lehman J (2007) Bio-energy in the black. *Frontiers in Ecology and Environment*. 5 (7): 381-387.
- Lehmann J, Joseph S (2009) *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*, Earthscan, London & Sterling, VA. 416p.
- Lehmann J, Rillig MC, Thies J, Masiello CA, Hockaday WC, Crowley D (2011) Biochar effects on soil biota — a review, *Soil Biol. Biochem.* 43, 1812-1836.
- Maćkowiak C (1998) Słoma jako nawóz w gospodarstwie bezinwentarowym. *Więś Jutra*, 5: 46-48.
- Major J, Rondon M, Molina D et al. (2010) Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. *Plant Soil*. 333: 117-128.
- Malińska K (2012) Biowęgiel odpowiedzią na aktualne problemy ochrony środowiska. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*. 15 (4): 387-403.
- Malisa MN, Hamdan J, Husni MHA (2011) Yield Response of Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) to Different Rates of Charcoal and Nitrogen Fertilizer on Bris Soils in Malaysia. *Middle-East Journal of Scientific Research* 10 (1): 54-59.
- McHenry MP (2009) Agricultural biochar production, renewable energy generation and farm carbon sequestration in Western Australia: Certainty, uncertainty and risk. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 129:1-7.
- Nigussie A, Kissi E, Misganaw M, Ambaw G (2012) Effect of Biochar Application on Soil Properties and Nutrient Uptake of Lettuces (*Lactuca sativa*) Grown in Chromium Polluted Soils. *American-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci.*, 12 (3): 369-376.
- Novotny EH, de Azevedo ER, de Souza et al (2009) Lessons from the Terra Preta de Indios of the Amazon Region for the Utilisation of Charcoal for Soil Amendment, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(6): 1003-1010.
- Oleszczuk P, Joško J, Futa B, Pasieczna-Patkowska S, Pałysz E, Kraska P (2014) Effect of pesticides on microorganisms, enzymatic activity and plant in biochar-amended soil. *Geoderma*. 10-18.
- Pałysz T (2009) Rolnicze i środowiskowe znaczenie próchnicy glebowej i metodyka jej bilansu, *Środkowo-Pomorskie Towarzystwo Naukowe Ochrony Środowiska*, t. 11: 329-338.
- Prusinkiewicz Z (1999) *Środowisko i gleby w definicjach*. Toruń. Wyd. Turpress: 477.

- Sanchez ME, Lindao E, Margaleff D, Martinez O, Moran A (2009) Pyrolysis of agricultural residues from rape and sunflower: production and characterization of bio-fuels and biochar soil management. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 85, 142-144.
- Sapek B (2010) Uwalnianie azotu i fosforu z materii organicznej gleby. *Woda Środowisko-Obszary Wiejskie*, 10, 3(31): 229-256.
- Sienkiewicz S, Krzebietke S, Panak H, Czapla J (2005) Plony jęczmienia jarego i pszenicy jarej w zależności nawożenia w wieloletnim doświadczeniu polowym. *Fragmenta Agronomica (XXII) nr 1 (85)*, 244-253.
- Sohi S, Lopez-Capel E, Krull E et al (2009) Biochar climate and soil: A review to guide future research, CSIRO Land and Water Science Report 05/09: 1-56.
- Song W, Guo M (2012) Quality variations of poultry litter biochar generated at different pyrolysis temperatures, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 94, 138-145.
- Sopena F, Bending GD (2013) Impact of biochar on bioavailability of the fungicide azoxystrobin: a comparison of the effect on biodegradation rate and toxicity to the fungal community. *Chemosphere*. 91: 1525-1533.
- Tatarkova V, Hiller E, Vaculik M (2013) Impact of wheat straw biochar addition to soil on the sorption, leaching, dissipation of the herbicide (4-chloro-2-methylophenoxy) acetic acid and the growth of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92: 215-221.
- Uzoma KC, Inoue M, Andry N at al. (2011) Effect of Cow Manure Biochar on Maize Productivity under Sandy Soil Condition. *Soil Use and Mangement* 27 (2): 205-212.
- Wardle DA (1998) Control of temporal variability of the soil microbial biomass. A global-scale synthesis. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1627-1637.
- Wołoszyk C, Krzywy E, Iżewska A (2005) Ocena właściwości nawozowej kompostów sporządzonych z komunalnego osadu ściekowego w trzyletnim zmianowaniu roślin. *Fragmenta Agronomica (XXII) nr 1 (85)*, 631-642.
- Woolf D (2008) Biochar as a soil amendment: A review of the environmental implications, *Organic eprints*, 1-25.
- Woolf D, Amonette JE, Street-Perrott FA, Lehmann J, Joseph S (2010) Sustainable biochar to mitigate global climate change. *Nature Communications* 1 (56), doi:10.1038/ncomms1053.

14. Wartość technologiczna pszenicy orkisz

Technological value of spelt wheat

Marta Wyzińska⁽¹⁾, Marzena Mikos-Szymańska⁽²⁾

⁽¹⁾ Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Uprawy Roślin Zbożowych, Puławy

⁽²⁾ Instytut Nowych Syntez Chemicznych, Zakład Nawozów, Puławy

Wyzińska Marta: mwyzińska@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: pszenica orkisz, jakość, wartość technologiczna

Streszczenie

Opracowanie zostało wykonane na podstawie przeglądu literatury dotyczącej wartości technologicznej pszenicy orkisz. W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie zdrową żywnością, a także produktami prozdrowotnymi, dlatego też orkisz przeżywa swój renesans. Składa się na to wiele zalet tej pszenicy: lepsze walory odżywcze i wyższa jakość biologiczna w porównaniu do pszenicy zwyczajnej, co jest wynikiem składu chemicznego ziarna. Ziarno orkiszu charakteryzuje się także lepiej przyswajalnym glutenem. Orkisz zawiera więcej witamin z grupy B, a z wielu badań wynika, że cechuje się również wyższą zawartością białka i wydajnością glutenu w odniesieniu do pszenicy zwyczajnej.

1. Wstęp

Wiele chorób cywilizacyjnych w tym alergię, wiąże się z nieprawidłowym odżywianiem i złą jakością pokarmów (Frazer i in. 1959). Od wielu lat poszukuje się surowców, które można wykorzystać do produkcji zdrowej żywności (Obuchowski 2000). Jednym z takich surowców jest ziarno pszenicy *Triticum aestivum* ssp. *spelta* L., powszechnie znanej jako orkisz, które jest bogate w węglowodany, białko i aminokwasy egzogenne oraz zawiera witaminy z grupy B i minerały. Wprowadzenie do diety człowieka produktów na bazie orkiszu obniża poziom cholesterolu, zapobiega atakom serca oraz nadciśnieniu tętniczemu krwi (Winzeler i in. 1994, Mikos 2009). Zaistniały w ostatnim czasie rozwój rolnictwa ekologicznego stwarza ogromną szansę dla orkiszu.

Ziarno wykorzystywane na cele spożywcze powinno charakteryzować się odpowiednią wartością technologiczną, na którą składa się wartość przemiałowa ziarna i wartość wypiekowa mąki. Wartość przemiałowa określa ilość mąki uzyskanej z odpowiedniej ilości ziarna, a wartość wypiekowa decyduje o jakości pieczywa i stabilności procesu technologicznego. Renesans pszenicy orkiszowej wynika także z możliwości wykorzystania jej jako źródła genów odpowiedzialnych np. za wysoką zawartość białka.

2. Opis zagadnienia

Intensyfikacja produkcji roślinnej (zbóż) była przyczyną do zastąpienia orkiszu odmianami pszenicy zwyczajnej, które są bardziej plenne, ale zawierają mniej składników odżywczych (Krawczyk i in. 2008a). Wzrost zainteresowania pszenicą orkisz nastąpił w związku z jej wysokimi walorami odżywczymi i dietetycznymi. Orkisz wyróżnia się dużą wartością odżywczą porównywalną do owsa (Sulewska 2004). Pszenicę tą wyróżniają także mniejsze wymagania agrotechniczne w porównaniu do pszenicy zwyczajnej (Sulewska i in. 2008), twarde plewy, a także łamliwa osadka kłosowa (Szumiło i Rachoń 2015), co w dużym stopniu utrudnia młócenie. Mąka z pszenic orkiszowych służy do produkcji chleba, makaronów czy też wyrobów ciastkarskich, a produkty te sprzedawane są w sklepach ze zdrową żywnością. Pszenica orkisz to jedno z najstarszych zbóż uprawianych i wykorzystywanych przez człowieka. Orkisz należy do rodziny wiechlinowatych, jest pszenicą niewymłacalną i zawiera heksaploidalną liczbę chromosomów. Uprawia się ją obecnie w Europie Centralnej (Belgia, Niemcy, Austria, Szwajcaria i Słowenia), a także w Kanadzie i Stanach Zjednoczonych (Sulewska 2006, Kohajdová i Karovicova 2008). Uprawa orkiszu w Polsce odbywa

się głównie w gospodarstwach ekologicznych. Obecnie w Krajowym Rejestrze odmian mamy jedną odmianę jara (Wirtas) i jedną ozimą (Rokosz).

Większość uprawianych na terenie Europy odmian ozimych orkiszu cechuje się długim źdźbłem. Długie źdźbło wpływa na większą podatność orkiszu na wyleganie w porównaniu do pszenicy zwyczajnej. Orkisz jest bardziej odporny na choroby i szkodniki podczas wegetacji, ale też przechowywania ziarna. Ziarno tej pszenicy jest szkliste, o barwie białej po czerwonej i ma wyraźnie zaznaczoną bródkę. Masa 1000 ziaren kształtuje się od 24-60 g (Rachoń i Szumiło 2009).

Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że mąka orkiszowa różni się od mąki pszenicy zwyczajnej. Zawiera więcej tłuszczu ogółem, witamin (PP, B₆, D, prowitaminy A, tokoferoli), mikro- (P, Fe, Zn, Cu) i makroelementów (K, Mg, Na), co świadczy o jej wyższej wartości odżywczej (Ostrowska 1993, Capouchová 2001, Sulewska 2004, Mikos 2009). Poza tym, ziarno orkiszu jest bogate w białko, które charakteryzuje się stosunkowo wyższą strawnością (PD = 83%) oraz wyższym wskaźnikiem NPU (61) niż białko pszenicy zwyczajnej (PD = 78%, NPU = 57) (Chrenková i in. 2000). Właściwości te sprawiają, że pszenica *spelta* jest wykorzystywana do produkcji pieczywa, (Aabdel-Aal i in. 1997), makaronów (Kostecki 2005), kasz, zup (Jurga 1996, Achremowicz i in. 1999, Kalinowska-Zdun 2005), a także ciastek i słodczy (Capouchová 2001, Sulewska 2004).

3. Przegląd literatury

Ziarno wykorzystywane na cele spożywcze powinno charakteryzować się odpowiednią wartością technologiczną (wartość przemiałowa ziarna i wypiekowa mąki). Jest wiele metod określających przydatność pszenicy do wypieku. Metody bezpośrednie polegają na wykonaniu przemiału i wypieku. Metody pośrednie polegają na określeniu wartości technologicznej za pomocą szeregu metod fizycznych i chemicznych. Wymienione oznaczenia informują głównie o jakości kompleksu białkowego (zawartość białka, ilość glutenu, wskaźnik sedymentacyjny), aktywności enzymów amylolitycznych (liczba opadania), zachowaniu ciasta podczas miesienia (właściwości reologiczne), czy o wartości przemiałowej (gęstość ziarna w stanie zsypanym, MTZ). Literatura jednoznacznie wskazuje, że wartość wypiekowa mąki w głównej mierze zależy od odmiany, ale również kształtują ją warunki pogody w okresie wegetacji oraz czynniki agrotechniczne (Budzyński i in. 2008, Podolska 2011), a jakość technologiczna ziarna pszenicy jest wynikiem efektów interakcyjnych zachodzących między genotypem, warunkami glebowo-klimatycznymi oraz technologią produkcji. Spośród czynników agrotechnicznych największą rolę przypisuje się nawożeniu mineralnemu (nawożenie azotem – dawka i termin aplikacji) (Dubis i Borysiewicz 2008, Podolska 2011). Istotny wpływ na jakość ziarna wywiera ochrona i zbiór (Podolska 2011). Wiele opracowań naukowych dotyczy określenia wartości technologicznej i przydatności do wypieku zagranicznych odmian pszenicy orkiszowych w warunkach Polski oraz porównania ich z pszenicą zwyczajną (Dąbkowska 2009, Bepirszcz i Budzyński 2011).

Duża część badań wskazuje na duże zróżnicowanie jakości ziarna uprawianych w Polsce odmian pszenicy orkiszowej. Różnią się one wartościami poszczególnych cech jakości zarówno między sobą jak też w porównaniu z pszenicą zwyczajną (Majewska i in. 2007, Krawczyk i in. 2008a, b).

Do bardzo ważnych wskaźników wartości wypiekowej mąki należą zawartość białka ogółem i wydajność glutenu mokrego oraz jego jakość (Bojñanská i Frančáková 2002). Majewska i in. (2007) porównując, pod względem ilości glutenu, odmiany orkiszu Ceralio, Schwabekorn, Frankenkorn, Holstenkorn, Schwabenspelz, Ostro i Oberkulmer Rothkorn. Wykazali, że mąki wszystkich odmian cechowały się istotnie wyższą wydajnością glutenu mokrego (27,3 - 45,6%) w porównaniu z mąką pszenicy zwyczajnej odm. Korweta (22,5%). Autorzy donoszą, że największą wydajnością glutenu mokrego cechowała się mąka z orkiszu odmian Ostro i Oberkulmer Rotkorn (45,6% i 38,9%). Nieco mniejszymi wartościami ilości glutenu (od 23,5 do 27,5%), charakteryzowały się odm. Frankenkorn, Ceralio i Schwabekorn, a najbardziej stabilną pod względem tej cechy była odmiana Ceralio, zaś największą zmienność zaobserwowano u odm. Frankenkorn (Krochmal – Marczak i Sawicka, 2011). Z kolei Podolska i in. (2011) udowodnili, że odmiana niemiecka pszenicy orkiszowej Schwabekorn charakteryzuje się większą ilością białka i glutenu zarówno w stosunku do pszenicy orkiszowej STH

8 jak i pszenicy zwyczajnej odmiany Komnata i Sukces. Tę samą tendencję zauważyli również Achremowicz i in. (1999), Capouchová (2001) oraz Ceglińska (2003). Natomiast odmienne wyniki uzyskał Radomski i in. (2007) stwierdzając, mniejszą ilość glutenu u pszenic orkiszowych. Pszenica orkiszowa charakteryzuje się większą ilością glutenu, jednak jak podają Krawczyk i in. (2008a, b) jego jakość (mierzona indeksem glutenu) jest gorsza w porównaniu do pszenicy zwyczajnej.

Zawartość białka ogółem w mąkach orkiszowych jest zmienna i waha się w szerokim zakresie. Majewska i in. (2007) stwierdzili duże zróżnicowanie odmian pszenicy orkiszowej w zawartości białka od 8,6 do 12,4% s.m. z wyjątkiem mąki z ziarna orkiszu odm. Ceralio. Zawartość ta była istotnie wyższa od zawartości białka ogółem w mące otrzymanej z ziarna pszenicy zwyczajnej odm. Korweta (8,6% s.m.). Autorzy wykazali, że najwyższą zawartością białka cechowała się mąka z orkiszu odmiana Ostro (12,4%). W badaniach Podolskiej i in. (2011) wykazano, że odmiana Szwabenkorn charakteryzowała się większą ilością białka w odniesieniu do pszenicy zwyczajnej odm. Komnata i Sukces. Również Bepirszcz i Budzyński (2011) donoszą, że pszenica orkiszowa Szwabenkorn charakteryzuje się wyższą zawartością białka (o 1,6%) w stosunku do pszenicy zwyczajnej odmiana Olivin. W badaniach stwierdzono nieco większe różnice w zawartości białka pszenic orkiszowych Ostro, Oberkulmer Rothkorn w odniesieniu do pszenicy zwyczajnej Korweta (Żuk – Gołaszewska i in., 2011). Wielu naukowców w swoich badaniach wykazuje wyższą zawartość białka ogółem w orkiszu w porównaniu do pszenicy zwyczajnej (Grela 1996, Capouchová 2001).

Kolejną cechą wartości wypiekowej mąki jest wskaźnik sedymentacyjny. Określa on zarówno jakość jak i ilość glutenu. Dostępna literatura (Capouchová 2001, Bojňanská i Frančaková 2002, Ceglińska 2003, Majewska i in. 2007, Krawczyk i in. 2008a, b) wskazuje na zmienność odmian pod względem tej cechy, ale również wyższe wartości wskaźnika sedymentacyjnego pszenicy zwyczajnej w odniesieniu do pszenicy orkiszowej. W badaniach Majewskiej i in. (2007) stwierdzono duże zróżnicowanie odmian orkiszu pod względem tej cechy (od 12 cm³ u odmiany Ceralio, do 27 cm³ przypadku odmian Schwabenkorn i Schwabenspelz). Z kolei inne badania (Capouchová 2001, Podolska i in. 2011) udowodniły, że mąka z pszenicy zwyczajnej odmian jakościowych cechuje się istotnie wyższą liczbą sedymentacji niż mąki z badanych odmian orkiszu, co świadczy o tym, że gluten z mąki pszenic zwyczajnych odmian technologicznych ma wyższą jakość.

Wartość liczby opadania jest miarą aktywności enzymu alfa amylazy i charakteryzuje porośnięcie ziarna. Jest to niekorzystne zjawisko indukowane przede wszystkim przez warunki pogody panujące w okresie dojrzewania ziarna i jest to cecha odmianowa. Do produkcji mąki chlebowej nadaje się jedynie surowiec nieporośnięty, wykazujący wysokie wartości liczby opadania (powyżej 220 s). W literaturze przedmiotu wykazano zróżnicowanie odmian orkiszu pod względem wielkości liczby opadania (Capouchová 2001, Bojňanská i Frančaková 2002). W badaniach Majewskiej i in. (2007) stwierdzono, że u pszenic orkiszowych liczba opadania mieściła się w zakresie 215 - 315 s, natomiast w mące z ziarna pszenicy zwyczajnej odmiany Korweta wynosiła 278 s. Krochmal-Marczak i Sawicka (2011) w swoich badaniach wykazały, że u odmian pszenicy orkisz wartości liczby opadania mieściły się w granicach od 272 s (Frankenkorn) do 254 s (Szwabenkorn). Badania Krawczyka i in. (2008b) pokazały, że mąki orkiszowe charakteryzowały się średnią lub niską aktywnością enzymów amylolitycznych (Tab. 1).

Tab. 1. Charakterystyka cech fizykochemicznych mąk z orkiszu i pszenicy zwyczajnej (Krawczyk i in. 2008a).

Cecha	Pszenica zwyczajna	Pszenica orkisz				NIR
		STH 8	STH 11	STH 12	Schwabencorn	
Gluten mokry	31,4	35,0	39,3	44,5	45,9	2,6
Indeks glutenu	95	46	61	58	44	6
Wskaźnik sedymentacji	44	30	39	40	38	2
Liczba opadania	296	288	331	313	270	23

Pośrednim wskaźnikiem określającym wartość przemiałową ziarna jest gęstość ziarna w stanie zsypanym. Wyraża ona masę jednego hektolitra ziarna. Wyższe wartości tej cechy świadczą o lepszej wydajności mąki, małe zaś o słabym wykształceniu bielma. Gęstość ziarna w stanie zsypanym według literatury przedmiotu (Cacak-Pietrzak i in. 1999) jest cechą bardzo stabilną, jednak wpływają na nią warunki siedliska, a także poziom agrotechniki oraz gęstość i termin siewu.

Warechowska i in. (2011) donoszą, że ziarno pszenicy orkiszowej odmiany Schwabenkorn cechuje się mniejszą gęstością ziarna w stanie zsypanym i większą popiołowością w odniesieniu do pszenicy zwyczajnej Korweta.

Stwierdzono także zróżnicowanie pod względem właściwości reologicznych ciasta pszenic orkiszowych. Krawczyk i in. (2008a,b) wykazali, krótszy czas stałości ciasta i mniejszą objętość pieczywa z badanych rodów orkiszu (STH 8, STH 11, STH 12) w odniesieniu do pszenicy zwyczajnej. Autorzy stwierdzili (Krawczyka i in. 2008b), że ciasta z mąk orkiszowych mają dłuższy czas rozwoju i stałości, są mniej sprężyste, ale bardziej rozciągliwe niż ciasto z pszenicy zwyczajnej. Sugerują, że w odniesieniu do takich mąk powinien być zastosowany odmienny proces technologiczny. Z kolei Radomski i in. (2007) stwierdzili, że wypieki z samej mąki orkiszowej nie spełniają wymagań konsumenta. Natomiast Majewska i in. (2007) twierdzą, że ziarno orkiszu może stanowić dobry surowiec do produkcji mąki chlebowej, ale jest to zależne od doboru odmiany.

Spośród czynników agrotechnicznych nawożenie azotem w największym stopniu ma wpływ na wartość technologiczną pszenicy (Cacak-Pietrzak i in. 1999, Podolska 2007). Według badań zwiększone dawki azotu wpływają korzystnie na kompleks białkowy. Powodują one wzrost ilości białka i glutenu oraz wzrost wskaźnika sedymentacyjnego. Wysoka dawka azotu wpływa na poprawę właściwości reologicznych ciasta (wodochłonność mąki, rozmiękczenie, czas stałości i liczbę jakości). Niewiele jest badań nad wpływem dawki azotu na wartość technologiczną pszenicy orkisz, przede wszystkim dlatego, że uprawiany jest głównie w gospodarstwach ekologicznych. Achremowicz i in. (1993) oraz Johansson (2001) wykazali, że duże dawki azotu zwiększają plon oraz zawartość białka w ziarnie, ale jednocześnie obniżają jego jakość. Achremowicz i in. (1995) oraz Dzik i Laskowski (2002) twierdzą, że wzrost udziału niskocząsteczkowej gliadyny w białku, skutkuje gorszymi właściwościami glutenu. Z kolei Nowak i in. (2004) oraz Stankowski i in. (2004) podają, że wysokie dawki azotu w przypadku niektórych odmian orkiszu poprawiają jakość glutenu. Można przypuszczać, że jest to wynikiem interakcji między odmianami, a warunkami siedliskowymi i agrotechnicznymi, które wpływają na cechy fizyczne ziarna i relacje ilościowe w jego składzie chemicznym (Budzyński i in. 2004). Znajduje to potwierdzenie w badaniach Podolskiej i in. (2011), które wskazują na występowanie współdziałania dawki azotu i odmiany pszenicy w kształtowaniu wielkości wyróżników jakości. Dobór dawki azotu nie miał wpływu na indeks glutenu u odmiany Schwabenkorn, natomiast u odmiany STH 8 i Sukces najwyższe wartości tego parametru stwierdzono przy najniższej dawce azotu. Jednak u wszystkich odmian najwyższe wartości wskaźnika sedymentacyjnego stwierdzono stosując średnią dawkę azotu – 2,4 g N/wazon. Schober i in. (2008) stwierdzają, że odmiany pszenicy orkisz wykazują typową reakcję jak inne gatunki pszenic na zwiększające się nawożenie azotowe. Wraz ze wzrostem nawożenia zwiększa się bardziej zawartość gliadyn w porównaniu do glutelin.

Tab. 2. Porównanie zawartości witamin i minerałów 1 porcji (38 g) pełnoziarnistej mąki z pszenicy zwyczajnej i pełnoziarnistej maki orkiszowej, gdzie 38 g jest ekwiwalentem ilości mąki w 1 kromce chleba (Sawicka i Krochmal-Marczak 2012).

Pełnoziarnista mąka z pszenicy zwyczajnej		Pełnoziarnista mąka orkiszowa	
Witaminy			
Tiamina (B1)	0,16 mg	Tiamina (B1)	0,25 mg
Ryboflawina (B2)	0,07 mg	Ryboflawina (B2)	0,87 mg
Niacyna (B3)	1,73 mg	Niacyna (B3)	3,20 mg

Pełnoziarnista mąka z pszenicy zwyczajnej		Pełnoziarnista mąka orkiszowa	
Minerały			
Wapń	21,67 mg	Wapń	0,01 mg
Miedź	0 mg	Miedź	0,23 mg
Żelazo	1,17 mg	Żelazo	1,36 mg
Magnez	0 mg	Magnez	0,83 mg
Potas	140,83 mg	Potas	145,53 mg
Cynk	0 mg	Cynk	1,29 mg

4. Podsumowanie

Dostępna literatura wskazuje, że pszenica orkisz staje się coraz bardziej popularna. Wynika to przede wszystkim z faktu, iż ziarno i mąka tej pszenicy charakteryzują się cechami prozdrowotnymi. Wiele badań udowodniło, że ten gatunek pszenicy doskonale sprawdza się w uprawie ekologicznej, a mąka stanowi doskonały surowiec do produkcji zdrowej żywności.

5. Literatura

- Abdel-Aal E S M, Hucl P, Sosulski F W i in. (1997) Kernel, milling and baking properties of spring-type spelt and einkorn wheats. *J. Cereal Sci.*, 26: 363-370.
- Achremowicz B, Borkowska H, Styk B i in. (1995) Wpływ nawożenia azotowego na jakość glutenu pszenicy jarej. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*. 193: 29-34.
- Achremowicz B, Kulpa D, Mazurkiewicz J (1999) Technologiczna ocena ziarna pszenic orkiszowych. *Zeszyty Naukowe AR Kraków*. 360: 11-17.
- Achremowicz B, Zając J, Styk B (1993) Wpływ podwyższonego nawożenia azotem na wartość technologiczną niektórych odmian pszenicy jarej i ozimej. *Rocz. Nauk Roln., A*. 110(1-2): 149-157.
- Bepirszcz K, Budzyński W (2011) Wartość technologiczna ziarna *Triticum aestivum* ssp. *vulgare* i ssp. *spelta* w zależności od poziomu agrotechniki. *Mat. konf. „Hodowla uprawa i wykorzystanie pszenicy orkisz w warunkach zmian klimatu”*. 6-8.
- Bojňanská T, Frančáková H (2002) The use of spelt wheat (*Triticum spelta* L.) for baking applications. *Rostlinná Výroba*. 48: 141-147.
- Budzyński W, Bielski S, Borysiewicz J (2008) Wpływ nawożenia azotem na jakość technologiczną ziarna pszenicy ozimej. *Fragmenta Agronomica*, 1(97): 39-49.
- Budzyński W, Borysiewicz J, Bielski S (2004) Wpływ poziomu nawożenia azotem na plonowanie i jakość technologiczną ziarna pszenicy ozimej. *Pam. Puł.*, 135: 33- 44.
- Cacak-Pietrzak G, Ceglińska A, Haber T (1999) Wartość technologiczna wybranych odmian pszenicy ozimej w zależności od zróżnicowanego nawożenia azotowego. *Pam. Puł.* 118: 45-56.
- Capouchová I (2001) Technological quality of spelt (*Triticum spelta* L.) from ecological growing system. *Sci. Agric. Bohem.* 32: 307-322.
- Ceglińska A (2003) Technological value of spelt and common wheat hybrid. *Electr. J. Pol. Agric. Univ.* 6: 1-7;
- Chrenková M, Čerešňáková Z, Sommer A i in. (2000) Assessment of nutritional value in spelt (*Triticum spelta* L.) and winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by chemical and biological methods. *Czech. J. Anim. Sci.* 45: 133-137.
- Dąbkowska E (2009) Wpływ odmiany ziarna orkisz uzyskanego w warunkach produkcji ekologicznej na jakość mąki. *Praca doktorska, UWM w Olsztynie*. 95-96.
- Dubis B, Borysiewicz J (2008) Wpływ nawożenia azotem na plon i technologiczną jakość wybranych odmian pszenicy zwyczajnej. *Fragmenta Agronomica*, XXV. 1 (97): 110-120.

- Dziki D, Laskowski J (2002) Wpływ nawożenia azotowego pszenicy na właściwości reologiczne ciasta. *Mat. XXXIII Sesji Nauk. Kom. Techn. i Chem. żywności PAN nt. „Nauka o żywności osiągnięcia i perspektywy”*. AR w Lublinie. 68.
- Frazer AC, Fletcher RF, Ross CAS (1959) Gluten-induced enteropathy. The effect of partially digested gluten. *Lancet*. 2: 252–255.
- Grela ER (1996) Nutrient composition and content of antinutritional factors in spelt (*Triticum spelta* L.) cultivars. *J. Sci. Food.Agric*. 71: 399-404/
- Johansson E, Prieto-Linde ML, Jonsson JO (2001) Effects of wheat cultivar and nitrogen application on storage protein composition and breadmaking quality. *Cereal Chemistry*. 78: 19-25.
- Jurga P (1996) Mąka dla potrzeb specjalnych. *Przegl. Zboż. Młyn*. 7: 11.
- Kalinowska - Zdun M (2005) Renesans pszenicy orkisz. *Przegl. Piek. Cukier*. 2: 4-5.
- Kohajdova Z, Karovicova J (2008) Nutritional Value and Baking Applications of Spelt Wheat. Slovak University of Technology in Bratislava. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*. 7 (3): 5-14.
- Kostecki Z (2005) Jakość orkiszu z upraw ekologicznych ze zbiorów 2004 r. *Przegl. Zboż. Młyn*. 6: 14.
- Krawczyk P, Ceglińska A, Izdebska K (2008b) Porównanie właściwości reologicznych ciasta i jakości pieczywa otrzymanego z mąki orkiszu i pszenicy zwyczajnej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 4 (59): 141 – 151.
- Krawczyk P, Ceglińska A, Kardialik J (2008a) Porównanie wartości technologicznej ziarna orkiszu z pszenicą zwyczajną. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 5 (60): 43-51.
- Krochmal-Marczak B, Sawicka B (2011) Wartość wypiekowa wybranych odmian ozimej pszenicy orkiszowej (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) uprawianych w warunkach Polski południowo-wschodniej. *Mat. konf. „Hodowla uprawa i wykorzystanie pszenicy orkisz w warunkach zmian klimatu”*. 16-17.
- Majewska K, Dąbkowska E, Żuk-Gołaszewska K i in. (2007) Wartość wypiekowa mąki otrzymanej z ziarna wybranych odmian orkiszu (*Triticum spelta* L.). *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2 (51): 60 – 71.
- Mikos M (2009) The effect of nitrogen fertilization on nutrient composition of spelt wheat. *Recenzný posudok na príspevok do Zborníka vedeckých prác doktorandov a mladých vedeckých „Mladí vedci 2009“*, Nitra
- Nowak W, Zbroszczyk T, Kotowicz L (2004) Wpływ intensywności uprawy na niektóre cechy jakościowe ziarna odmian pszenic. *Pam. Puł*. 135: 199-212.
- Obuchowski W (2000) Żywność funkcjonalna - aspekty technologiczne *Prz. Zboż. Młyn*. 7: 33-34.
- Ostrowska D (1993) Orkisz pszenicy cennym surowcem piekarskim. *Agrochemia*. 8: 11.
- Podolska G (2007) Kształtowanie cech jakościowych ziarna pszenicy poprzez technologię produkcji. *Studia i raporty IUNG-PIB*. 9: 55-64.
- Podolska G (2011) Kształtowanie jakości ziarna pszenicy. *Więś Jutra*. 3-4 (152-153): 19-22.
- Podolska G, Boguszewska E, Mikos M i in. (2011) Wartość technologiczna ziarna i mąki pszenicy *Triticum spelta*, *Triticum durum* i *Triticum aestivum* w zależności od dawki azotu i niedoboru wody w glebie. *Mat. konf. „Hodowla uprawa i wykorzystanie pszenicy orkisz w warunkach zmian klimatu”*. 31-33.
- Rachoń L, Szumiło G (2009) Comparison of chemical composition of selected Winter wheat species. *J. Elementol*. 14 (1): 135-146.
- Radomski G, Bać A, Mierzejewska S (2007) Ocena porównawcza wartości wypiekowej maki pszennej i orkiszowej. *Inż. Rol*. 5(93): 369-374.
- Sawicka B, Krochmal-Marczak B (2012) Pszenica orkiszowa (*TRITICUM AESTIVUM* SSP. *SPELTA*) jako alternatywa dla gospodarstw ekologicznych. <https://www.researchgate.net/publication/264172009>
- Schober TJ, Bean SR, Kuhn M (2006) Gluten proteins from spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) cultivars: A rheological and size-exclusion high performance liquid chromatography study. *Journal of Cereal of Science*. 44: 161-173.

- Stankowski S, Podolska G, Pacewicz K (2004) Wpływ nawożenia azotem na plonowanie i jakość ziarna odmian pszenicy ozimej. Ann. UMCS, Sect. E. 59: 1363-1369.
- Sulewska H (2004) Wpływ wybranych zabiegów agrotechnicznych na plonowanie i skład chemiczny ziarna formy ozimej orkiszu pszennego (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*). Pam. Puł. 135: 285-293.
- Sulewska H, Koziara W, Panasiewicz K i in. (2008) Yielding of two pelt varieties depending on sowing date and sowing rate in Central Wielkopolska conditions. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 53 (4): 85-91.
- Sulewska M (2006) Powrót orkiszu. Farmer. 24: 24.
- Szumilo G, Rachoń L (2015) Plonowanie i jakość ziarna jarej pszenicy orkisz w zależności od zastosowanego materiału siewnego. Polish Journal of Agronomy. 20: 9-14.
- Tyburcy A (tłum.) (2005) Wzrost znaczenia orkiszu w przetwórstwie zbożowym. Przegl. Zboż. Młyn. 7: 32-33.
- Warechowska M, Warechowski J, Tyburski J i in. (2011) Ocena wartości przemiałowej ziarna orkiszu. Mat. konf. „Hodowla uprawa i wykorzystanie pszenicy orkisz w warunkach zmian klimatu”. 45-46.
- Winzeler H, Schmid JE, Winzeler M (1994) Analysis of the yield potential and yield components of F1 and F2 hybrids of crosses between wheat (*Triticum aestivum* L.) and spelt (*Triticum spelta* L.). Euphytica. 74: 211-218.
- Żuk-Gołaszewska K, Tyburski J, Majewska K i in. (2011) Jakość ziarna ozimej pszenicy orkisz uprawianej w systemie rolnictwa ekologicznego. Mat. konf. „Hodowla uprawa i wykorzystanie pszenicy orkisz w warunkach zmian klimatu”. 47-48.

15. Rynek usług agroturystycznych

Market of agritourism services

Ewelina Surdacka

Katedra Turystyki i Rekreacji Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Joanna Hawlena

Ewelina Surdacka: surdackaewelina@wp.pl

Streszczenie

Ze względu na rozdrobnioną strukturę polskiego rolnictwa, bogactwo mineralne i zasoby kultury agroturystyka ma duże szanse rozwoju w naszym kraju. Warto zaznaczyć, iż dominującą pozycję odgrywają małe i średnie indywidualne gospodarstwa rolne, charakteryzujące się znajomością zwyczajów lokalnych, przekazywanych z pokolenia na pokolenie. Rejony wiejskie cechują się zróżnicowanym krajobrazem, nieskażonym środowiskiem przyrodniczym, interesująca fauną i florą. Polska wieś daje możliwość obcowania z przyrodą, bliskiego kontaktu z naturą i ludźmi jak również odpoczynku w ciszy i spokoju. Liczba turystów zarówno krajowych jak i zagranicznych stopniowo się zwiększa, co wpływa na rozwój różnej bazy noclegowej w rejonach wiejskich, w tym kwatery agroturystycznych a tym samym potrzebę rozwoju rynku agroturystycznego. Opracowanie stanowi artykuł przeglądowy, zawarte zostały tu informacje dotyczące rynku usług agroturystycznych. Do zestawienia obecnego stanu wiedzy w danym obszarze tematycznym autor posłużył się metodą opisową i graficzną.

Abstract

Due to the fragmented structure of Polish agriculture, mineral wealth and cultural resources agritourism has a great chance of development in our country. It should be noted that the dominant position is played by small and medium individual farms, characterized by knowledge of local customs, passed down from generation to generation. Rural areas are characterized by a diverse landscape, an unspoiled natural environment, interesting with fauna and flora. The village provides an opportunity to commune with nature, close contact with nature and people as well as rest in peace and quiet. The number of tourists, both domestic and foreign, is gradually narrowing, which influences the development of various accommodation in rural areas, including agrotourism and thus the need to develop the agrotourism market. The study is a review article, containing information on the market of agritourism services. To compile the present state of knowledge in a given subject area, the author used a descriptive and graphical method.

1. Wstęp

W konsekwencji wzrostu tempa życia i intensyfikacji skutków sytuacji stresowych uznanie zyskał odpoczynek na wsi. Atutem obszarów rolniczych jest zachowana przyroda oraz możliwość wypoczynku z dala od dużych miast. Agroturystyka i usługi jej towarzyszące mają zarówno w Polsce jak i w Europie wieloletnią tradycję. Agroturystyka to jedna z wiodących form aktywizacji i ożywienia obszarów wiejskich w Polsce i na świecie. Rozwój tej działalności na terenach rolniczych stwarza możliwość zatrudnienia a tym samym zwiększa dochód rolników i ich rodzin. Warto podkreślić, iż wpływa również na rozwój pokrewnych gałęzi, Wśród których wymienić można gastronomię, handel czy przetwórstwo. Agroturystyka pobudza inicjatywę i przedsiębiorczość ludności wiejskiej. Poprzez poprawę infrastruktury oraz wzrost popytu na tych obszarach możliwy jest rozwój innych form przedsiębiorczości. Wpływ agroturystyki na tereny rolnicze zauważalny jest także w samych gospodarstwach agroturystycznych. Należy zaznaczyć, iż zmienia się wielkość i jakość świadczonych usług w ramach tej działalności gospodarczej. Warto zaznaczyć, iż w efekcie wzrostu tempa życia liczba turystów preferujących tę formę spędzania czasu wolnego stale się powiększa. Zaprezentowana forma aktywizacji gospodarczej wsi doczekała się wielu opracowań zarówno naukowych jak i popularyzujących wiedzę dotyczącą tego zagadnienia, zasadne stało się jednak przedstawienie zasad funkcjonowania rynku usług agroturystycznych.

2. Agroturystyka – informacje ogólne

Agroturystyka to pojęcie niejednoznacznie definiowane w literaturze. Według Jalinika termin ten należy rozpatrywać z punktu widzenia usługobiorcy jak również usługodawcy. Może być zatem definiowana jako swego rodzaju mikroprzedsiębiorstwo produkcyjno – usługowe zajmujące się prowadzeniem działalności gospodarczej, która polega na wytworzeniu jak najlepszego produktu turystycznego lub forma wypoczynku na terenie gospodarstwa agroturystycznego (Jalinik 2009) Majewski podkreśla, iż jest strukturą turystyki związaną wyłącznie z funkcjonującym gospodarstwem rolnym, gdzie produkcja roślinna jak i zwierzęca stanowi jedną z największych atrakcji dla turystów (Majewski 2000). Agroturystyka rozumiana jest także jako przedsięwzięcie turystyczne podejmowane przez rolników na bazie posiadanych zasobów produkcji i pracy. Na ogół prowadzone jest ono na małą skalę, z uwzględnieniem walorów okolic wiejskich oraz ofertą aktywnych form czasu wolnego. Czynnikiemami decydującymi o możliwościach rozwoju agroturystyki są obiekty trwale powiązane z gospodarstwem rolnym oraz walory środowiska geograficznego. Należy zaznaczyć, iż Polska posiada korzystne warunki przyrodniczo – krajobrazowe, do rozwoju prezentowanej formy turystyki. Do świadczenia usług agroturystycznych w szczególności sposób predysponują rejony o niskim uprzemysłowieniu i urbanizacji, małym udziale zatrudnienia w zawodach pozarolniczych, niewysokich dochodach ludności, posiadającej jednocześnie wolne zasoby mieszkaniowe (Kamińska, Wilk – Grzywna 2015).

3. Pojęcie rynku usług agroturystycznych (podaż, popyt, cena)

Rynek jest to ogół stosunków ekonomiczno – społecznych, zachodzących między sprzedającym towar (oferta podażowa) a kupującym ten towar (oferta popytowa) na odpowiedniej przestrzeni w określonym czasie, w wyniku których obie strony uzyskują określone korzyści. Sprzedający osiąga zysk ze sprzedaży towaru (korzyść wymierna), kupujący natomiast zadowolenie z zaspokojenia potrzeb (korzyść niewymierna). Rynek można rozpatrywać z punktu widzenia jego różnych cech:

- zasięg terytorialny (lokalny, regionalny, krajowy, zagraniczny, międzynarodowy oraz światowy),
- przedmiot wymiany (rynek dóbr i usług konsumpcyjnych i produkcyjnych, rynek pieniądza – kredytowy, papierów wartościowych jak również rynek pracy),
- branża (rynkami poszczególnych towarów).

W wielu przypadkach wymienione kryteria są łączone i wówczas mówi się o rynkach towarów bądź usług jednocześnie określając zasięg geograficzny wymiany. Warunkiem koniecznym istnienia rynku jest wymiana, najczęściej w formie towarowo – pieniężnej oraz podmioty rynku czyli dostawcy i nabywcy towarów i usług. Do jego podstawowych elementów zaliczamy: popyt, podaż i cenę oraz relacje, które między nimi zachodzą tworząc mechanizm rynkowy. Zależności popytowo – podażowe powstają za pośrednictwem cen między równoprawnymi podmiotami gospodarczymi, dążącymi do osiągnięcia korzyści ekonomicznych przez dokonywanie dobrowolnych transakcji kupna i sprzedaży towarów oraz usług. Wspomniany mechanizm determinuje rodzaj produkcji, który motywowany jest zakupami konsumentów oraz profil odbiorców, który określają również dochody ludności.

Uczestnictwo w ruchu turystycznym wywołuje konieczność przedstawienia definicji popytu turystycznego. Rozumiany jako odpowiednia ilość dóbr i usług nabywanych przez turystów w tym samym czasie, na tym samym rynku i po tej samej cenie. Wywołowany ujawnionymi potrzebami podróżujących, które mają pokrycie w funduszu nabywczym. Wskazuje na dobra rzeczowe i usługi, jakie ludzie są skłonni nabyć przy określonym poziomie ceny. Cechuje go heterogeniczność (różnorodność), mobilność (zmiennosc w czasie i przestrzeni) oraz sezonowość. Charakterystyczne jest również występowanie w grupie wydatków na swobodną konsumpcję w budżecie turysty jak również komplementarność z uwagi na to, iż popyt łączy różne dobra i usługi. Jego zmienność zależy od wielkości ceny usług i dóbr oraz dochodów podróżujących. Określany potrzebami, dochodami, ceną oraz czynnikami podażowymi (Sikora 2012).

Podaż turystyczna definiowana jako suma dóbr i świadczonych usług turystycznych (materialnych bądź niematerialnych), dostępnych na rynku po określonej cenie. Składają się na nią czynniki miejsca docelowego pobytu turystów takie jak: atrakcje i środowisko, infrastruktura, usługi, dostępność, wizerunek, cena.

Tab. 1. Struktura podaży turystycznej (Sikora 2012).

Podaż turystyczna				
Podaż pierwotna			Podaż wtórna	
Przyrodnicze walory turystyczne	Produkty pracy ludzkiej materialne i niematerialne	Dobra komplementarne (infrastruktura ogólna)	Podstawowe usługi turystyczne	Usługi komplementarne do turystycznych
- woda, - las, - fauna i flora, - temperatura powietrza, - klimat, - ukształtowanie terenu.	- zabytki, - budowle sakralne i świeckie, - tradycje, - zwyczaje, - gościnność, - normy etyczne.	- transport, - drogi, - parkingi, - plaże, - punkty usługowe.	- hotelarskie, - gastronomiczne, - wypoczynkowe, - sportowe, - rekreacyjne, - rzemieślnicze, - lecznicze, - informacyjne.	- przewodnictwo, - znakowanie szlaków, - kulturalne, - oświatowe, - rozrywkowe.

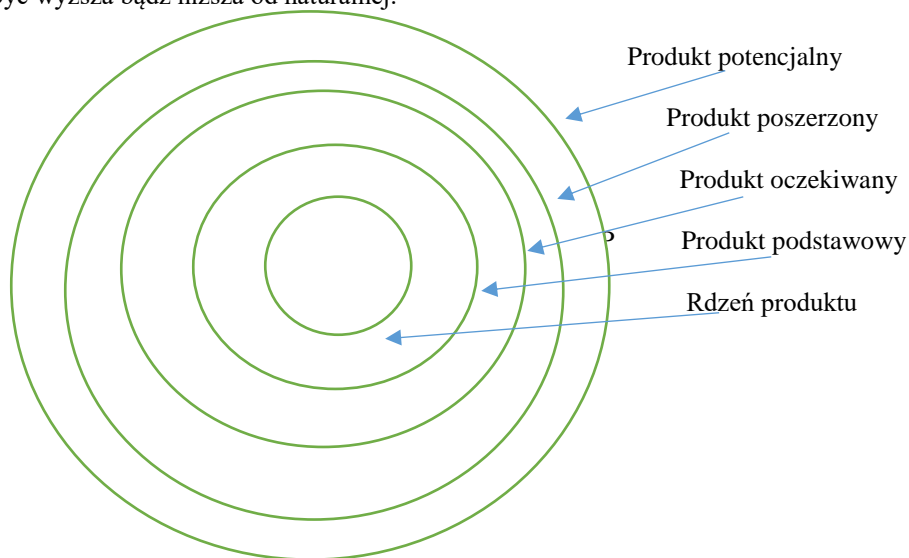
Podaż turystyczną można podzielić na pierwotną i wtórną (Tab. 1.), w przeciwieństwie do popytu jest wysoce sztywna i nieelastyczna, co wynika ze stabilności walorów turystycznych i ich nieprzemieszczalności. Dobra i usługi turystyczne nie mogą być magazynowane, świadczone w bezpośrednim kontakcie z usługobiorcą, wymagają jego fizycznej obecności. Produkcja usług zachodzi w tym samym czasie i miejscu, co ich konsumpcja, charakteryzuje ją zatem nierozdzielność. Konieczność sprzedaży oferty w konkretnym dniu wskazuje na nietrwałość podaży, w przeciwnym razie może zostać utracony potencjalny dochód z tej oferty. Ruch turystyczny obsługują różne podmioty turystyczne jak również pochodzące z innych branż. Nierównomierność podaży i popytu w skali roku bądź krótszych okresów czasowych wpływa na ich sezonowość. Dobra i usługi turystyczne mają charakter zarówno wymierny jak i niewymierny, materialny oraz niematerialny. Należy zaznaczyć, iż podaż turystyczna wiąże się z koniecznością całorocznego utrzymania obiektów hotelowych i urządzeń turystycznych, które w połączeniu ich sezonowością generują bardzo wysokie koszty stałe.

W agroturystyce przestrzenią geograficzną, na której spotyka się oferodawca usług turystycznych z klientem jest gospodarstwo rolne. Strony spotkań, w umówionym czasie wchodzi w kontakty społeczno – ekonomiczne powiązane świadczonymi usługami agroturystycznymi. Sikora rynek agroturystyczny określa jako ogół wymiennych stosunków społeczno – ekonomicznych zachodzących między sprzedającymi towary i usługi agroturystyczne a kupującymi je w gospodarstwie agroturystycznym w odpowiednim czasie. Składają się na niego rynek bezpośredni i pośredni. Pierwszy z wymienionych tworzą wzajemne relacje społeczno – ekonomiczne zachodzące między agroturystami a właścicielami gospodarstw agroturystycznych. Wspomniane więzi między agroturystami, ich potrzebami i motywami zakupu produktów agroturystycznych, decydujące o obopólnych korzyściach: zysku dla właściciela i zadowolenia dla klienta. Rynek agroturystyczny pośredni tworzą więzi gospodarstwa agroturystycznego z bankami, firmami ubezpieczeniowymi, samorządem terytorialnym, klientami i innymi instytucjami. Powiązania te determinowane są osiągniętym zyskiem gospodarstwa i wpływają na jego podaż usług agroturystycznych.

Transakcje realizowane między członkami rodziny, którzy tworzą gospodarstwo agroturystyczne a agroturystami mają charakter dobrowolny. Motywowane są własnym interesem ekonomicznym – społecznym sprzedającego oraz możliwością zaspokojenia potrzeb przez kupującego. Odbiorcami usług mogą być osoby fizyczne, rodziny i inne instytucje reprezentujące i wspierające popyt agroturystyczny a także determinujące podaż agroturystyczną. Rynek agroturystyczny rozumiany jest jako miejsce negocjacji i przetargów odnośnie wartości ilościowo – jakościowej

towarów i usług agroturystycznych. Definiowany również jako miejsce umożliwiające poznanie agroturystów, ich potrzeb i motywów przyjazdu do gospodarstwa. Należy podkreślić, iż nierzadkim zjawiskiem są czynności mające na celu pozyskanie nowych bądź tych samych klientów. Jest to zatem rynek konkurentów i konkurencji agroturystycznej, co tworzy istotny element otoczeni wpływający i kształtujący działalność agroturystyczną. Cechuje go również heterogeniczność, innowacyjność i dynamiczność. Determinuje to wiele czynników, wśród nich liczba konsumentów usług agroturystycznych zarówno indywidualnych jak również instytucjonalnych, zmiana siły nabywczej ludności, swoboda podejmowania decyzji jak również zmiany w modzie na wypoczynek i nawykach spędzania czasu wolnego. Dynamika rynku agroturystycznego wpływa na zróżnicowanie popytu i podaży usług agroturystycznych, wymusza dostosowanie działalności gospodarstw do zróżnicowanego popytu nabywców, determinowanego różnymi cechami społeczno – zawodowymi.

Przedmiot transakcji na rynku usług agroturystycznych stanowi produkt, w najszerszym ujęciu rozumiany jak to wszystko, co można zaoferować nabywcom do konsumpcji, użytkowania lub dalszego przerobu. Jest to kombinacja wartości materialnych i niematerialnych związana z pobytem turysty w gospodarstwie agroturystycznym i w jego okolicy oraz ze świadczonymi przez gospodarstwo dobrami i usługami turystycznymi. Dostarcza doznań i wrażeń. Posiada wartość użytkową, która wyraża możliwość i zakres zaspokojenia potrzeby jak również wskazuje na użyteczność produktu dla konsumenta. Zdolność wymiany produktu na inny produkt lub pieniądź określana jest jako wartość wymierna, wyrażana w cenie czyli sumie pieniędzy, jaką producent obciąża klienta za oferowany towar. Cena może być naturalna, wówczas wyraża koszty wyprodukowania produktu lub rynkowa, która powstaje w wyniku gry podaży i popytu produktu, może być wyższa bądź niższa od naturalnej.



Rys. 1. Struktura produktu agroturystycznego (Sikora 2012).

Rdzeń produktu stanowi motywację wyjazdu do gospodarstwa agroturystycznego oraz możliwości zaspokojenia potrzeb turystów w gospodarstwie agroturystycznym. Rozumiany jako korzyści postrzegane przez turystów. Wymienić tu można odpoczynek w ciszy, obcowanie z fauną i flora, polepszenie stanu zdrowia jak również możliwość przeżycia przygody. Produkt podstawowy zawiera konkretną ofertę sprzedaży, która informuje o tym, co turysta otrzyma za swoje pieniądze, są to usługi noclegowe, żywieniowe i rekreacyjne. Z dodatkowymi potrzebami klienta łączy się produkt oczekiwany, który powstaje w trakcie konsumpcji produktu podstawowego. Mogą go stanowić dodatkowe motywacje i potrzeby turysty związane z lepszą jakością usług, dodatkowym wyposażeniem pomieszczeń bądź ofertą rekreacyjną. Produkt poszerzony obejmuje wzbogacone usługi, zgodnie z produktem oczekiwanym lub wyprzedzające ten produkt i oczekiwania turysty. Jako przykład można wymienić bezpłatne wypożyczenie sprzętu bądź uroczystą kolację z gospodarzami,

które mają na celu zwiększenie zadowolenia wśród gości oraz stanowią zachętę do ponownego przyjazdu. Wszystkie elementy produktu agroturystycznego, które turysta może kupić a tym samym podnieść standard swojego pobytu zwane są produktem potencjalnym. Produkt agroturystyczny ma wymiar rzeczywisty jak również psychologiczny, co wskazuje jego struktura. Wiatrak podkreśla, iż stanowi zintegrowany układ oczekiwań, korzyści i wrażeń, tworzących niepowtarzalną kompozycję trzech podróży: wyobrażonej, rzeczywistej i zapamiętanej (Wiatrak, 2001, s. 157).

4. Prawne regulacje rynku usług agroturystycznych

Ustawa z dnia 2 lipca 2004 r. o swobodzie działalności gospodarczej (Dz. U. Nr 173 poz.1807) nie określa zasad wynajmowania przez rolnika pokoi, sprzedaży posiłków domowych i świadczenia w gospodarstwach rolnych innych usług związanych z pobytem turystów. Osoby rozpoczynające świadczenie usług agroturystycznych nie podlegają zatem przepisom ustawy o swobodzie działalności gospodarczej, w związku z czym agroturystyka nie wymaga zgłoszenia do ewidencji gospodarczej. Zakres usług obejmuje wynajmowanie pokoi, nie odrębnych miejsc noclegowych, całych domów czy domków turystycznych, sprzedaż posiłków domowych, nie zaś prowadzenie innych ogólnodostępnych usług gastronomicznych. Wymienione możliwości powinny być świadczone w gospodarstwie rolnym i związane z pobytem turystów w tym gospodarstwie. Rozumianym jako grunty rolne wraz z gruntami leśnymi, budynkami lub ich częściami, urządzeniami i inwentarzem, który faktycznie służy produkcji rolnej, bez zmiany ich charakteru i naruszenia podstawowej funkcji czyli zachowania zdolności do produkcji rolnej. Budynki i obszary o zmienionej trwale funkcji nie mogą być uznane za część gospodarstwa rolnego. Jest to podstawowe kryterium w odniesieniu do innych usług turystycznych, jako przykład można wymienić tu usługi rekreacyjne, jazdę konną czy wynajem łódek. Wynajmowanie pokoi oraz sprzedaż posiłków domowych może odbywać się w oparciu o inne zasoby niż grunty i budynki służące produkcji rolnej. Musi być jednak świadczona przez rolnika czyli osobę realnie prowadzącą działalność rolniczą, która ze względu na swój rozmiar nie spowoduje utworzenia nowego przedsiębiorstwa.

Świadczenie usług turystycznych podlega regulacji ustawy z dnia 29 sierpnia 1997 roku o usługach turystycznych (Dz. U. z 2004 r. Nr 223 poz. 2268), najistotniejsze są przepisy określające warunki świadczenia usług hotelarskich, w tym rozporządzenie Ministra Gospodarki i Pracy z dnia 19 sierpnia 2004 roku w sprawie obiektów hotelarskich i innych, w których świadczone są usługi hotelarskie (Dz. U. 2006 r. Nr 22 poz. 169). Warto zaznaczyć, iż wspomniane przepisy uzupełniają podstawowe zasady wynikające z regulacji budowlanych, sanitarnych i przeciwpożarowych. Mają one na celu przede wszystkim zapewnienie bezpieczeństwa osób korzystającym z zakwaterowania w obiektach, niezależnie od ich standardu. Zgodnie z art. 1a ustawy o usługach turystycznych od 1 maja 2004 roku omawiane przepisy odnoszą się również do rolników wynajmujących pokoje i miejsce na ustawienie namiotów w gospodarstwie rolnym. W przypadku usług agroturystycznych rolnik ma obowiązek dokonać wpisu do ewidencji innych obiektów, w których świadczone są usługi hotelarskie, prowadzona przez wójta, burmistrza bądź prezydenta.

5. Podsumowanie

Agroturystyka to jedna z form turystyki wiejskiej, która odpowiada współczesnym trendom rynku usług turystycznych charakteryzujących się rozwojem turystyki alternatywnej, przyjaznej środowisku, wykorzystującej naturalne walory dziedzictwa kulturowego i różnorodności przyrodniczej. Jest to wynik procesów, które odzwierciedlają interesy ekonomiczne oraz socjalne ludności miejskiej i wiejskiej. Gospodarstwa agroturystyczne proponując zróżnicowaną ofertę dla turystów jak również możliwość obcowania z przyrodą, zajmują ważne miejsce na wspomnianym rynku. Podjęcie i prowadzenie tego typu działalności wymaga posiadania odpowiedniego kapitału jak również spełnienia licznych warunków, w tym również czynników naturalnych.

6. Literatura

(Dz. U. Nr 173 poz.1807)

(Dz. U. z 2004 r. Nr 223 poz. 2268)

(Dz. U. 2006 r. Nr 22 poz. 169)

Jalinik M (2007) Typologia gospodarstw oraz rozwój usług agroturystycznych, [w:] Roczniki Naukowe SERiA, Warszawa – Poznań – Kraków, 56

Kamińska W, Wilk – Grzywna M (2015) Turystyka wiejska i agroturystyka nowe paradygmaty dla XXI wieku, Warszawa, 85

Majewski J (2000) Agroturystyka to też biznes, Fundacja Wspomagania Wsi Warszawa, 42

Sikora J (2012) Agroturystyka – przedsiębiorczość na obszarach wiejskich, C.H. Beck, Warszawa, 16,17, 137

16. Rola instytucji doradczych w funkcjonowaniu i rozwoju gospodarstw agroturystycznych

The role of advisory institutions in the functioning and development of agritourism farms

Krystian Strojny, Sylwester Walczak, Paulina Główka

Sekcja Hodowli Owiec i Kóz, Sekcja Doradztwa Rolniczego, Studenckie Koło Naukowe Biologów i Hodowców Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

Słowa kluczowe: doradztwo rolnicze, PROW

Streszczenie

Agroturystyka która jest źródłem dodatkowych dochodów dla gospodarstwa stwarza nowe perspektywy dla ludności wiejskiej oraz przyczynia się do hamowania tendencji wyludnienia. Nakłady ponoszone na rozwój związanej z turystyką infrastruktury podnoszą komfort życia na wsi.

Rozwój agroturystyki uwarunkowany jest wieloma czynnikami ekonomicznymi i pozaekonomicznymi, wśród których ważne znaczenie ma wsparcie ze strony instytucji o zasięgu krajowym, a także lokalnym.

Celem pracy było sprawdzenie roli różnych instytucji w zakresie usług doradczych świadczonych właścicielom gospodarstw agroturystycznych. Badania ankietowe przeprowadzono w 156 gospodarstwach agroturystycznych w woj. Lubelskim i Podkarpackim na terenie gmin: Wola Uhruska, Sanok, Komańcza, Bukowsko, Besko, Wiązownica, Zwierzyniec, Krasnobród, Susiec, Szczebrzeszyn, Adamów, Próchnik, Pawłosiów, Laszki, Tereszpol, Frampol, Końskowola, Kazimierz Dolny, Wąwolnica, Wojciechów, Jastków.

Respondenci w zakresie prowadzenia i funkcjonowania gospodarstwa agroturystycznego najczęściej korzystali z usług Zrzeszenia/Stowarzyszenia Agroturystycznego. Inną instytucją z której korzystali kwaterodawcy to ODR-y. Pomoc świadczona przez pozostałe instytucje miała charakter marginalny.

1. Wstęp

Agroturystykę możemy nazwać turystyką wiejską. Jej prymarnym podmiotem jest pozostanie w ścisłej korelacji z środowiskiem wiejskim oraz jego wszelkimi urozmaieniami takimi jak: przyroda, struktura budowlana, otaczający nas krajobraz wiejski oraz codziennymi zwyczajami czy też świętami.

Tak więc agroturystykę cechuje powiązanie usług turystycznych z codziennym życiem na gospodarstwie rolnym.[Przezbórska, Sznajder 2006]

Okolicznościami protegującymi rozwój gospodarstw agroturystycznych w Polsce mogą być: dobry stan środowiska przyrodniczego- czyste powietrze, różnorodność flory i fauny, urozmaicenie krajobrazu- różnorodność bonitacyjna oraz geograficzna środowiska, możliwość spożywania nisko przetworzonej żywności, czy też bodźcem do uprawiania takiej formy wypoczynku jest spokojniejsze jak i wolniejsze tok życia na wsi.[Kutkowska 2003]

Turystyka wiejska formuje atrakcyjne możliwości dla mieszkańców wsi oraz wiejskich miasteczek. Wpływa na zahamowanie wyludnienia się wsi, może stanowić dodatkowe źródło dochodu niskotowarowych gospodarstw. Rozwój nowo powstałej infrastruktury na rzecz agroturystyki przyniesie wiele pozytywnych korzyści dla społeczności lokalnej. Na niekorzyść tego rodzaju wypoczynku mogą przemawiać takie czynniki jak zmiana kulturowa oraz zmiana otoczenia środowiskowego poprzez nie szanujących tych wartości przyjezdnych. (Młynarczyk 2002)

Do jednych z cenniejszych wartości, które niesie wypoczynek na łonie wiejskim są:

- wypoczynek w środowisku nisko zurbanizowanym
- kontakt ze skrajnie nie zanieczyszczoną przyrodą
- wyciszenie

- styczność i możliwość poznania życia wiejskiego oraz poznanie i kontakt ze zwierzętami domowymi czy gospodarskimi
- szansa na pozyskanie oraz odżywianie się żywnością, która została wyprodukowana w obrębie gospodarstwa agroturystycznego (Godlewski 2004)

Jednakże okazuje się, że dobra infrastruktura jest często nie wystarczająca aby zatrzymać wczasowiczów na dłużej. Występuje więc konieczność urozmaicenia oferty gospodarstw aby zwiększyć ich atrakcyjność. (Tyran 2006) Jednakże do tego potrzebne są środki finansowe po które kwatery dawcy sięgają z wielu źródeł (Rys.1)

2. Ośrodki doradcze wspierające rozwój rynku agroturystyki

Rozwój turystyki wiejskiej uwarunkowany jest czynnikami ekonomicznymi jak również pozaekonomicznymi. Ważną rolę dla wspierania tej działalności mają jednostki o zasięgu ogólnokrajowym jak i lokalnym. Do obecnej chwili rozwój agroturystyki na terenie kraju uczestniczyły organizacje oraz organy takie jak:

- Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi
- Ośrodki Doradztwa Rolniczego
- Agencja Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa
- Centrum Edukacji i Doradztwa Rolniczego
- Stowarzyszenia Agroturystyczne
- Urzędy Gmin
- Polska Agencja Rozwoju Agroturystyki
- Fundacje (Fundacja im. Rataja, Fundacja „Agroturystyka” Fundacja Spółdzielczości Wiejskiej i inne jednostki rozlokowane na terenie kraju)

Pierwszoplanowe znaczenie w rozwoju obszaru agroturystycznego na terenach wiejskich oraz miast do pięciu tysięcy mieszkańców mają władze lokalne oraz lokalne stowarzyszenia agroturystyczne jak również ośrodki doradztwa rolniczego rozlokowane w obrębie każdego województwa oraz występujące na terenach powiatowych filie tych ośrodków.

Najbliższą rolnikowi organizacją zajmującą się wspieraniem działalności agroturystycznej są stowarzyszenia agroturystyczne oraz państwowe instytucje działające w obszarach wiejskim, którymi są między innymi ośrodki doradztwa rolniczego tak zwane ODR-y. Jednakże stowarzyszenia nie obejmują całości gospodarstw agroturystycznych, a co za tym idzie dane na temat dostępnej bazy noclegowej mogą być nie wystarczające. Dlatego znaczącą rolę w uzyskiwaniu rzetelnych danych o występowaniu oraz możliwościach gospodarczych gospodarstw możemy uzyskać w placówkach ośrodków doradztwa rolniczego, co ważniejsze odegrały one duże znaczenie w powstawaniu oraz rozwijaniu się gospodarstw agroturystycznych. (Korbowski, Wiatrak 2000)

2.1 Działalność władz lokalnych

Rozwój agroturystyki jest w znacznej mierze zdeterminowany poprzez zaangażowanie władz najniższego szczebla jakimi są władze gmin czy powiatów. Bez wsparcia tych instytucji samorządowych nie byłby możliwy rozwój wymaganej infrastruktury niezbędnej do poprawy atrakcyjności ofert gospodarstw, które chcą się rozwijać w tej dziedzinie gospodarczej. Władze gmin w swych indywidualnych planach rozwoju lokalnego regionu powinny stanąć na wysokości zadania oraz spełnić oczekiwania gospodarstw poprzez promowanie inicjatyw i stwarzać przyjazne środowisko dla tych działań, jak również powinny:

- powołać osobę (zespół) odpowiedzialną do prowadzenia w imieniu samorządów działań rozwijających proekologiczny rozwój regionu
- prowadzić akcję informacyjną wśród mieszkańców społeczności lokalnej na rzecz ekorozwoju.

Rozwój turystyki agrarnej uzależniony jest od właściwego ukształtowania świadomości lokalnej w sferze istniejących wartości turystycznych gmin, powiatów. Popularyzowanie idei agroturystyki, poprzez pokazywanie oraz propagowanie jej dodatnich aspektów dla rodzinnych gospodarstw, wsi oraz regionu. Rolą władzy lokalnych powinno przejawiać się w dobrej współpracy z kwaterydawcami, stowarzyszeniami czy również ośrodkami doradztwa rolniczego w zakresie między innymi organizowania oraz prowadzenia szkoleń. Władze również mogą

prować pomoc w postaci otwierania oraz prowadzenia biur agroturystycznych przy urzędach gmin, jak również poprzez podpisywanie oraz wspieranie inicjatyw z sąsiadującymi gminami w zakresie organizacji konsorcjów partnerskich. Na barkach władz gminnych spoczywa obowiązek prowadzenia ewidencji gospodarstw agroturystycznych i innych obiektów turystyki wiejskiej (Kutkowska 2003)

2.2 Rola Ośrodków Doradztwa Rolniczego

Na terenie kraju ODR-y były pierwszymi jednostkami, które rozpowszechniały ten rodzaj działalności na wsiach oraz gminach miejsko-wiejskich poprzez prowadzenie licznych szkoleń, akcji informacyjnych z zakresu organizacji oraz prowadzenia gospodarstw agroturystycznych, doradztwo w zakresie prowadzenia działalności pozarolniczej, pomoc w zakresie opracowaniu broszur reklamowych, prezentacji i sprzedaży produktu agroturystycznego, opracowaniu programów pomocowych z funduszy zagranicznych. Rola doradców powinna mieć szeroki zakres, ale w pierwszej kolejności powinna skupiać się nad aspektem ekonomicznym całego przedsięwzięcia. Cel ten wymaga pogłębiającego się rozwoju doradztwa agroturystycznego, które świadczyłoby pomoc związaną z przygotowaniem dokumentacji potrzebnej do stworzenia takiego przedsięwzięcia, poprawą jakości oferowanych przez gospodarstwa agroturystyczne, racjonalnym gospodarowaniem i wykorzystywaniem posiadanych zasobów, efektywnym wykorzystaniem pracy oraz kapitału, a co za tym idzie poprawą ekonomiczną gospodarstw, które podejmą się prowadzenia gospodarstwa agroturystycznego.

Dla osób chcących poszerzać ofertę swoich gospodarstw, dla władz gmin i doradców w celu poszerzenia swojej wiedzy z zakresu agroturystyki Ośrodki Doradztwa Rolniczego prowadzą szkolenia wojewódzkie. Kursy prowadzone są najczęściej jednokrotnie w ciągu roku w zakresie agroturystyki dla osób chcących rozpocząć swą działalność, a także obejmują podstawy prawne, żywienia i pozyskiwanych źródeł finansowania.

Organizowane są także dla zainteresowanych wyjazdy grup studyjnych do gospodarstw agroturystycznych w celu poszerzenia oraz zdobycia wiedzy praktycznej z zakresu turystyki wiejskiej. (Kutkowska 2003)

2.3 Wsparcie stowarzyszeń

Stowarzyszenia agroturystyczne działają na zasadzie dobrowolnych, samorządnych i trwałych zrzeczeń, których celem nie jest zarobek, ale działalność opierająca się na pracy społecznej jej członków. Za cel obrany mają podnoszenie kwalifikacji zawodowych członków oraz rozpowszechnianie wiedzy na tematy marketingowe oraz organizacyjne.

Określa je ustawa Prawo o stowarzyszeniach z dnia 7 kwietnia 1989 roku, dziennik ustaw nr 20 pozycja 104 z późniejszymi zmianami. Prekursorem w powstawaniu w Polsce stowarzyszeń była Suwalska Izba Turystyczno-Rolnicza, która swą działalność zapoczątkowała w 1991 roku. W kolejnych latach ich ilość wzrastała aby już w 2003 roku przekroczyć liczbę 120 (Wiatrak 2003)

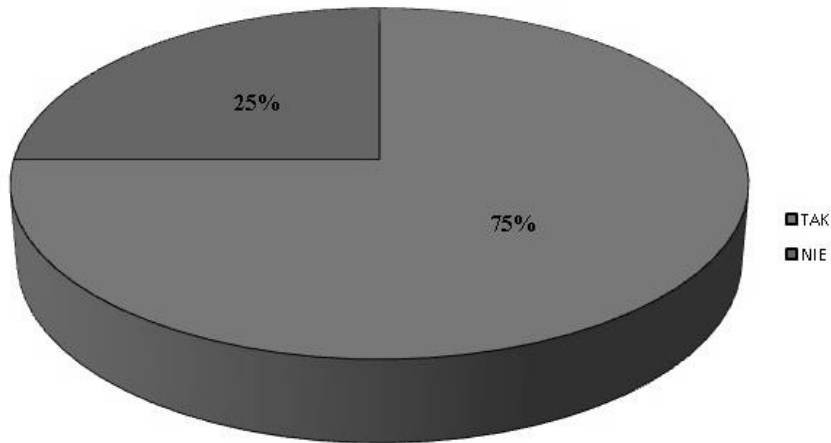
Konieczność realizacji różnorodnych zadań społecznych o zasięgu lokalnym jak i ogólnokrajowym większość stowarzyszeń określiła w swych statutach. Do ich głównych zadań należy:

- zapewnienie pomocy podczas przygotowywania produktu turystycznego
- wytworzenie towaru o określonej jakości i standardzie
- prowadzenie wspólnej promocji, reklamy i wprowadzanie do obrotu produktu agroturystycznego
- reprezentowanie rolników zrzeszonych w stowarzyszeniu
- prowadzenie stałego poradnictwa dla osób zainteresowanych rozpoczęciem działalności noclegowej i żywieniowych na obszarach wiejskich
- prowadzenie ewidencji aktualnej bazy noclegowej.

Istotną sprawą jest pozyskanie funduszy na działalność organizacji. Są to przede wszystkim wpływy z wpisowego i składek członkowskich, wpływy z darowizn, zapisów, spadków i inne. Większość badanych należy do Polskiej Federacji Turystyki Wiejskiej „Gospodarstwa Gościnne” Wzrastająca liczba działających stowarzyszeń agroturystycznych stanowi bodziec, który determinuje i umacnia agroturystykę. (Wiatrak 2003).

Korzyści jakie płyną z przynależności do stowarzyszeń to dostęp do kursów, reklama jak i promocja gospodarstw agroturystycznych, a także możliwość promowania ruchu turystycznego.(Dębniowska 2000)

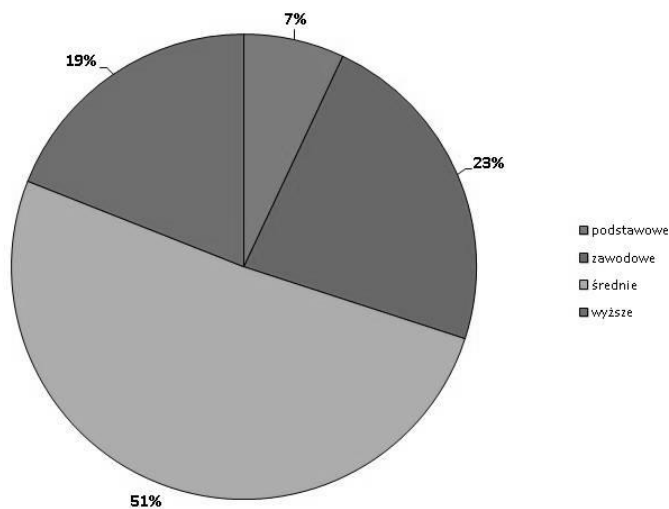
3. Wyniki przeprowadzonych ankiet



Rys. 1. Czy gospodarstwo należy do stowarzyszenia zrzeszającego gospodarstwa agroturystyczne.

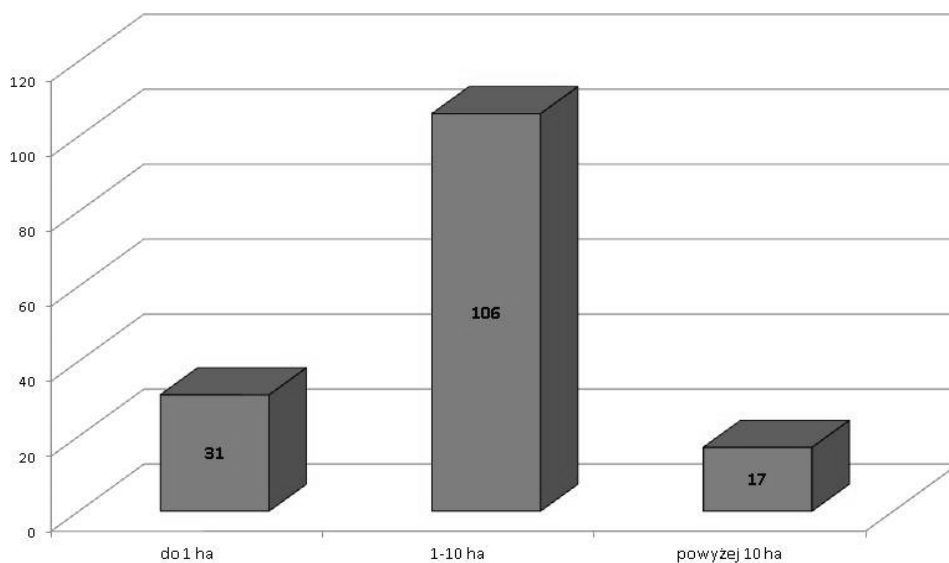
Zdecydowana większość [75%] gospodarstw zadeklarowała przynależność do organizacji zrzeszających.

Korzyściami jakie płyną z przynależności do zrzeszeń są ułatwiony dostęp do kursów i promocja oraz reklamy działalności agroturystycznej, jak również wspieranie ruchu turystyki wiejskiej (Dębniowska 2000).



Rys. 2. poziom wykształcenia właścicieli gospodarstw agroturystycznych.

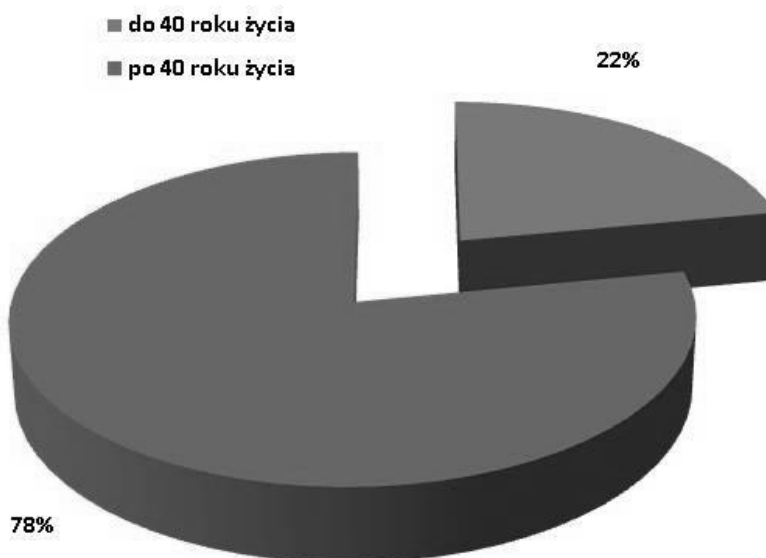
Ponad połowa respondentów [51%] posiadała wykształcenie średnie. Na kolejnej pozycji możemy dostrzec właścicieli gospodarstw z wykształceniem zawodowym [23%] oraz nieco mniejszą grupę, bo [19%] kwaterodawców z wykształceniem wyższym. Najmniej liczną grupę stanowiły osoby z wykształceniem podstawowym [7%].



Rys. 3. Areal objętych ankietą gospodarstw agroturystycznych

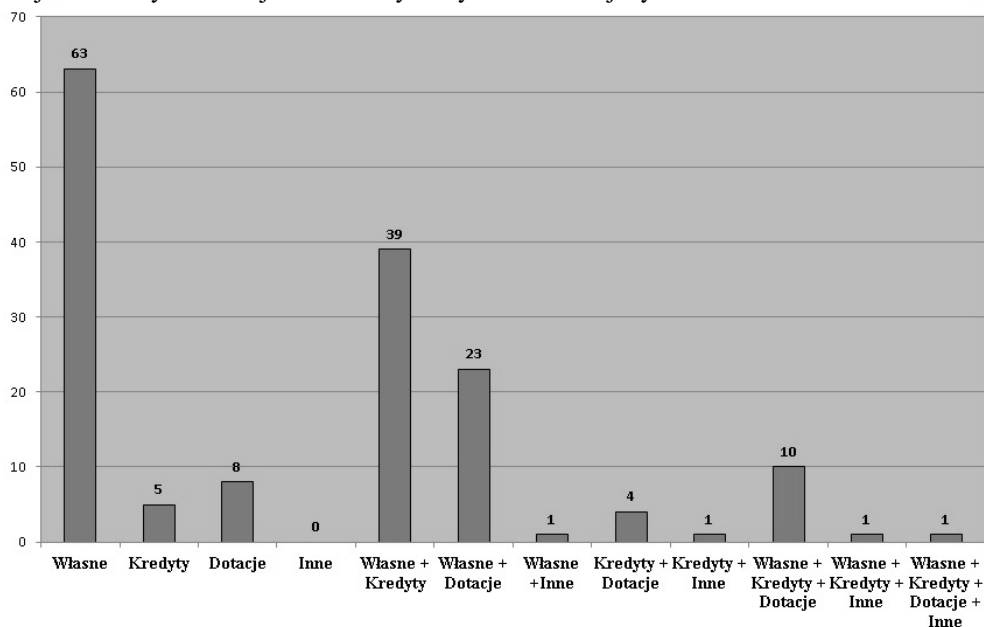
Średnia powierzchnia gospodarstwa rolnego w Polsce wynosiła w 2017 roku 10.65 ha (ARiMR).

Wśród ankietowanych gospodarstw agroturystycznych najliczniejszą grupę stanowiły gospodarstwa o powierzchni od 1 do 10 ha [106]. Gospodarstw powyżej 10 ha w przeprowadzonych ankietach było jedynie [17]

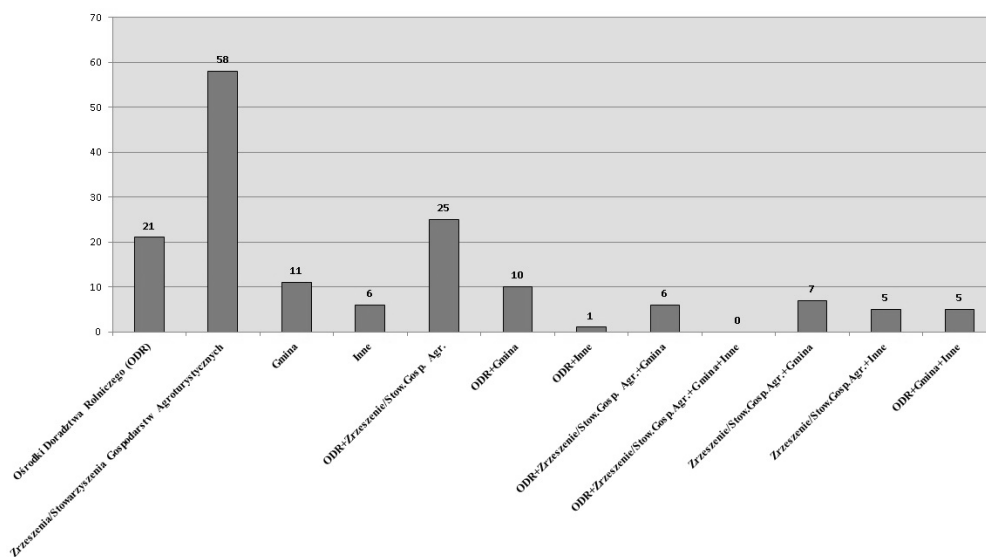


Rys. 4. Wiek ankietowanych kwaterodawców.

Struktura wiekowa właścicieli jest typowa dla całej Unii Europejskiej. Zdecydowaną większość stanowią osoby po 40 roku życia [78%]. Jak podaje EUROSTAT w roku 2015 rolnicy poniżej 40 roku życia w krajach stowarzyszonych stanowili jedynie 24%.



Rys. 5. Środki wykorzystywane na modernizację do celów agroturystycznych.



Rys. 6. Sposób zdobywania przez respondentów wiedzy na temat działalności i funkcjonowania gospodarstw agroturystycznych.

4. Literatura

Dębnińska M (2000) Rozwój agroturystyki i jej wpływ na przeobrażenia w rolnictwie i na wsi: Uwarunkowania ekonomiczne, organizacyjne i prawne. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn 1-319,

- Godlewski G (2004) Społeczno-ekonomiczne aspekty działalności gospodarstw agroturystycznych na przykładzie południowego Podlasia. Akademia Ekonomiczna. Poznań nr 19: 21-43,
- Karbowiak K. , Wiatrak A.P (2010) Rozwój organizacji agroturystycznych w Polsce, Wieś Jutra 10: 43-44,
- Kutkowska B (2003) Podstawy rozwoju agroturystyki: ze szczególnym uwzględnieniem agroturystyki na Dolnym Śląsku, Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Wrocław: 1-115,
- Młynarczyk K. (2002) Agroturystyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Olsztyn: 1-236,
- Przezbórska L., Sznajder M (2006) „Agroturystyka” Polskie Wydawnictwo Ekonomiczne, Warszawa: 1-257,
- Tyran E (2006) Produkty regionalne i tradycyjne jako atrakcja w turystyce wiejskiej. Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu, Kraków 8: 346-350,
- Wiatrak A.P (2003) Baza agroturystyczna w Polsce i uwarunkowania jej rozwoju. Zeszyty Naukowe AR im. H. Kołłątaja, Kraków 90: 9-18

17. Drób jako atrakcja w gospodarstwach agroturystycznych

Poultry as an attraction in agritourism farms

Kostiantyn Vasiukov⁽¹⁾, Kamil Drabik⁽¹⁾, Patrycja Chabroszewska⁽¹⁾, Adrian Pluta⁽¹⁾, Katarzyna Olszak⁽¹⁾, Justyna Batkowska⁽²⁾, Antoni Brodacki⁽²⁾.

⁽¹⁾Sekcja Hodowli Drobiu Studenckiego Koła Naukowego Biologów i Hodowców Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie*

⁽²⁾Instytut Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Opiekun naukowy: dr Justyna Batkowska

Kostiantyn Vasiukov: kostyavasyukov1999@gmail.com

Słowa kluczowe: agroturystyka, drób ozdobny.

Streszczenie

Ze względu na rosnące zainteresowanie agroturystyką, obszary wiejskie zdobyły uznanie wśród urlopowiczów, zwłaszcza od momentu, gdy podróżowanie stało się zjawiskiem ogólnodostępnym. Na wsiach, gdzie prowadzone są ośrodki agroturystyczne wczasowicze mogą odpocząć, zwiedzać okolice oraz aktywnie spędzać czas. Oprócz tego właściciele wprowadzają do swoich gospodarstw takie atrakcje jak możliwość karmienia i wyprowadzania zwierząt na pastwisko, własnoręczna produkcja nabiału czy zbieranie jaj. W gospodarstwach są użytkowane zwierzęta wielu gatunków i ras, tak aby przyciągnąć jak największą liczbę wypoczywających. Najłatwiejszy w utrzymaniu jest drób, a ptaki oraz pozyskiwane od nich surowce, stanowią atrakcję dla konsumentów ze względu na swoje oryginalne walory smakowe i estetyczne. Celem pracy jest przybliżenie możliwości zwiększenia atrakcyjności gospodarstw agroturystycznych, w tym także ekologicznych, poprzez utrzymanie gatunków ptaków zaliczanych do drobiu.

1. Wstęp

Z roku na rok zmienia się kierunek rozwoju turystyki. Słabnące trendy w stosunku do wyjazdów do nadmorskich kurortów czy popularnych ośrodków narciarskich zmuszają do zmian w zakresie organizacji czasu czy form wypoczynku. Konieczność podążania za zmieniającym się rynkiem doprowadziła do rosnącego popytu na stosunkowo nową formę turystyki jaką jest agroturystyka. Pod tym pojęciem należy rozumieć turystykę wiejską – na wsiach, w gospodarstwach, w domach chłopskich, w gospodarstwach rolnych. W takich miejscowościach turyści przez pewien okres czasu prowadzą wiejski tryb życia, zapoznają się z lokalną kulturą, zwyczajami, biorą udział w tradycyjnej wiejskiej pracy. Agroturystyka to szczególna forma wypoczynku, która jest powiązana z wsią i rolnictwem. Korzystają z niej najczęściej mieszkańcy dużych miast, znużeni wielkomiejskim życiem, hałasem i zanieczyszczeniami. Agroturystyka staje się zatem niepowtarzalną możliwością odpoczynku w ciszy i spokoju (Balińska 2002). Duża część gospodarstw agroturystycznych ma niepowtarzalny charakter, na który składają się między innymi: niezwykła oferta przygotowana specjalnie dla turystów, infrastruktura turystyczna oraz zaangażowanie gospodarzy (Nowogródzka i Pieniak-Lendzion 2014). Dopuszcza się stwierdzenie, że gospodarstwo agroturystyczne jest działającym gospodarstwem rolnym, w którym realizowane są usługi turystyczne, gdzie wykorzystuje się zabudowania, użytki rolne i zasoby ludzkie w celu poprawy funduszu rodzinnego (Jalinik 2004). W Europie Zachodniej moda na wakacje agroturystyczne narodziła się wcześniej niż w Polsce. Dochody z agroturystyki stanowią około 15% udziału całego unijnego rynku turystycznego (Przezbórska - Skobieł 2015).

* Sekcja działa pod patronatem Krajowej Rady Drobiarstwa

2. Opis zagadnienia

Obecna agroturystyka jest pojęciem szerokim, gdyż oprócz zwykłego wypoczynku obejmuje ona swoim zasięgiem szereg innych usług towarzyszących. Rosnące zainteresowanie tą formą działalności pozarolniczej jest związane z obowiązującymi przepisami prawa, które traktują działalność agroturystyczną jako świadczenie usług turystycznych w gospodarstwie rolnym oraz w jego najbliższym otoczeniu. Ma to na celu przede wszystkim podniesienie dochodów osób związanych produkcją rolniczą. Badania dowodzą, że 81% osób prowadzących zakwaterowanie na terenach rolniczych odnotowało wzrost dochodów po uruchomieniu działalności agroturystycznej (Krzyżanowska 2005).

Zwykle wyróżnia się trzy podstawowe rodzaje agroturystyki:

1. turystykę na terenach wiejskich, rozumianą jako wszelkie formy rekreacji w rejonie niezurbanizowanym,
2. turystykę związaną z rolnictwem, gdzie poza produktem turystycznym oferuje się możliwości poznawania specyfiki zawodu rolnika łącznie z wykonywaniem pewnych funkcji produkcyjnych,
3. turystykę wiejską z uwzględnieniem elementów kultury lokalnej i formami integracji ze społecznością obszarów wiejskich (Spychalski 1998).

Gospodarstwa agroturystyczne zyskują poparcie ze strony miejscowej ludności. Pozwalają na utrzymanie niezależności finansowej poprzez tworzenie nowych miejsc pracy dla osób starszych, bądź niedostatecznie wykształconych. Jest to szansa do odtworzenia zanikających zawodów takich jak: wikliniarstwo, hafciarstwo, kowalstwo, bądź ludowa ceramika artystyczna. Wzrost miejsc pracy dla miejscowych to szansa na rozwój innych inicjatyw gospodarczych na wsi (Knecht 2009). W przypadku kiedy nie ma naturalnych i tradycyjnych atrakcji, tworzone są one „sztucznie”. Proponowane jest wtedy zbieranie grzybów i ziół, ogniska na których jest pieczony baran, bądź noclegi na sianie (Ziernicka – Wojtaszek i Zawora 2011). Do zalet gospodarstwa należą: rodzinna atmosfera, życzliwość w kontaktach międzyludzkich, sposobność uczęszczania na zajęcia sportowe oraz hipoterapii i dogoterapii. Dodatkowym atutem jest nauka małych dzieci obchodzenia się ze zwierzętami gospodarskimi. Jeszcze innym aspektem jest możliwość poznania regionalnych, często już zapomnianych potraw i przysmaków z warzyw i owoców (Kostuch 2009). Obcowanie ze smakami ściśle związanymi z danym regionem pozwala na rozwój nowego trendu jakim staje się dziś turystyka kulinarna (Pisarek i Lechowska 2014). Gospodarstwa agroturystyczne stają się dodatkowo miejscem spotkania kultur oraz wymiany wartości między turystami a społecznościami lokalnymi (Chojka 2008). Przyjezdni mają szansę zapoznać się z miejscową tradycją, niekiedy także z regionalną sztuką ludową.

Przemysł turystyczny umożliwia odczucie różnorodności kultur, codziennych zwyczajów okolicznych mieszkańców, tradycji, oraz poznania folkloru. Przebywanie w innym otoczeniu i poznanie nowego stylu życia pozwala na odrzucenie uprzedzeń wpływając na światopogląd oraz urozmaica życie w doświadczenia emocjonalne i estetyczne (Orzechowska-Kowalska 2003). Masowa produkcja żywności, ujednolicanie smaków, zapachów przyczyniło się do tego, że turysta-konsument przybywający do gospodarstwa agroturystycznego zaczął poszukiwać nowych wrażeń smakowych i zapachowych, bądź tych zapamiętanych z dzieciństwa. Większego znaczenia zaczęła nabierać wysoka jakość i bezpieczeństwo żywności. Odmienny smak zakupionych na targu czy w gospodarstwie potraw lub produktów staje się czynnikiem powodującym, że uchodzą one za wyjątkowe specjalty. Produkty rolno - spożywcze pochodzące z konkretnych regionów Unii Europejskiej, jak też charakteryzujące się tradycyjną metodą produkcji, są wyróżniane specjalnymi znakami, które potwierdzają ich wysoką jakość (Czarnecki 2007).

W zakresie wyboru żywności konsument kieruje się także znajomością jej producenta. Rozwój agroturystyki połączony z prowadzonym w gospodarstwie ekologicznym systemem produkcji daje realne nadzieje na zdobywanie przez rolników nowych nabywców dla wytwarzanych produktów. Turyści natomiast mają okazję obserwować proces produkcyjny, a zarazem być pewni jakości oferowanej żywności ekologicznej. Teorie tą popierają badania ankietowe, gdzie na

odповідź o motyw wyboru gospodarstw agroturystycznych, najczęściej wybieraną była zdrowa żywność (Sokół i Kołoszko-Chomentowska 2010). Rolnictwo ekologiczne w dzisiejszych czasach zyskuje na znaczeniu z uwagi na stale rosnące zainteresowanie konsumentów żywnością naturalną, powszechnie uważaną za zdrowszą. Dodatkowo dzisiejszy konsument dostrzega zagrożenia związane z intensyfikacją rolnictwa, a co za tym idzie będzie zwracał istotnie większą uwagę na systemy produkcji dbające o stan środowiska naturalnego (Kawa i Cywan 2005). Rolnictwo ekologiczne wymaga niestety znacznie większych nakładów pracy w stosunku do metod konwencjonalnych, co przez część autorów uznawane jest za cechę niezwykle pozytywną z uwagi na możliwość ograniczenia stopnia bezrobocia polskiej wsi. W związku z licznymi ograniczeniami produktywność tego systemu jest niższa o niemal 20% (Żelezik 2009). Rolnictwo ekologiczne dba również o zachowanie naturalnej estetyki krajobrazu polskiej wsi, który jest jednym z elementów dominujących przy doborze miejsca na urlop. Zwraca się uwagę na konieczność ochrony zadrzewień śródpolnych czy naturalnych oczek wodnych jako elementów wpływających na ekosystemy, a jednocześnie urozmaicających krajobraz (Szałda 2002).

3. Przegląd literatury

Dzisiejszy konsument mając do wyboru pełen wachlarz możliwości wyboru miejsc spędzenia urlopu będzie poszukiwał miejsc zaspokajających jego potrzeby w różnych aspektach. Mając to na uwadze gospodarstwa agroturystyczne, także ekologiczne, uznając produkcję roślinną za niewystarczającą wprowadzają coraz częściej uatrakcyjnienia swoich gospodarstw w postaci zwierząt gospodarskich. Możliwość chowu zwierząt, poza oczywistym zainteresowaniem ze strony turystów, umożliwia także pozyskanie od nich produktów, jak mleko czy jaja będące podstawą agroturystycznego menu. W zakresie zwierząt pełniących rolę atrakcji turystycznych doskonale wpisuje się drób. Zgodnie z definicją do drobiu zaliczane są ptaki gospodarskie hodowane w celu uzyskania od nich jaj, mięsa i pierza (Obrzut i in. 2014). Mnogość ras i gatunków sprawia, że przy znacznie mniejszych nakładach pracy, niż na przykład przy chowie bydła, można urozmaicić otoczenie gospodarstw agroturystycznych. Z uwagi na mnogość ras różniących się między sobą wielkością, kształtem, kolorem, a nawet elementami budowy anatomicznej konieczne jest jednak wprowadzenie podziału ptaków w celu opisanie ich roli w gospodarstwach agroturystycznych.

Ptaki grzebiące

Do tej grupy ptaków zaliczamy kury, perlice, bażanty, przepiórki, indyki oraz pawie. Najpopularniejsze są zdecydowanie kury, choć obserwuje się stały wzrost zainteresowania niegdyś niezwykle popularnymi na polskich wsiach perlicami. Rasy kur utrzymywanych w gospodarstwach agroturystycznych różnią się znacząco od tych utrzymywanych w celach produkcyjnych. Dla turystów nie jest istotna ilość pozyskanych produktów, ale efekt estetyczny. Dotyczy to zarówno samych ptaków, wśród których przede wszystkim samce charakteryzują się często bardzo bogatym upierzeniem, jak również pozyskiwanych od nich produktów, jak jaja czy mięso. W poszukiwaniu niecodziennych ras rolnicy często prócz ras rodzimych, jak zielononóżka kuropatwiana czy karmazyny, sięgają po egzotycznie wyglądające ptaki pochodzące z odległych niekiedy zakątków świata. W ostatnim czasie obserwuje się wzmożone zainteresowanie araukanami bezogoniastymi. Oprócz wielobarwnego upierzenia i faktycznego braku ogona, co nadaje tym ptakom bardzo ciekawego wyglądu, na uwagę zasługują znoszone przez nie jaja. Ich skorupa ma barwę seledynową (Brzóska i in. 2012). Pozostając przy kolorowych jajach nie sposób nie wspomnieć o maransach niosących jaja w kolorze czekoladowym. Do pełni palety barw można dodać śnieżnobiałe jaja leghornów (Krawczyk 2017), czy żółte pochodzące od kur yokohama.

Ze względu na upierzenie na uwagę zasługują przede wszystkim kury jedwabiste. Ptaki te wyróżnia brak twardego pierza okrywowego, przez co całe ich ciało pokrywa jedynie puch sprawiający wrażenie „sierści”. Dodatkowo badania wykazują, że ptaki te bardzo szybko nawiązują kontakt z człowiekiem, co sprawia, że stają się dodatkową atrakcją gospodarstwa. Mówiąc o upierzeniu należałoby także wspomnieć o kurach szurpatych. Szurpatość jest cechą genetyczną powodującą brak przylegających do siebie piór, co w efekcie końcowym upodabnia upierzenie do loków. Kury szurpate występują w obrębie wielu ras i odmian barwnych, jednak zawsze ich charakterystyczny wygląd przyciąga uwagę turystów. Rzadko spotykana, choć niezwykle pożądana

jest rasa kur ayam cemani, która staje się wielką atrakcją nie tylko gospodarstw agroturystycznych, ale i wystaw ptaków ozdobnych. Ptaki te są całkowicie czarne (od upierzenia po mięso), co jest ewenementem zarówno w świecie drobiu, jak i gastronomii (Łukasiewicz i in. 2009).

Rozważając drób w aspekcie podniesienia atrakcyjności gospodarstw agroturystycznych nie sposób nie wspomnieć o ptakach, które swoim upierzeniem czy charakterystycznym zachowaniem w trakcie zalotów wzbudzają podziw wśród przyjezdnych. Pawie indyjskie były atrakcją już na dworach szlacheckich jednak wielobarwne upierzenie samców wciąż wzbudza zachwyt. Ptaki te zadomowiły się na dobre w naszych warunkach i objęte właściwą opieką doskonale radzą sobie w chowie wolnowybiegowym. Niestety poza majestatycznym wyglądem nie przejawiają one innych cech pozwalających na poszerzenie ich przydatności w gospodarstwie (Dzięgielewska i in. 2013).

Zupełnie inaczej wygląda sytuacja w przypadku indyka. Samce osiągające znaczne rozmiary, a w czasie toków przejawiają podobne zachowania jak pawie. Prezentują ogon zalecając się do samicy. Indyk nie jest co prawda równie pięknie ubarwiony, jednak występuje w licznych odmianach kolorystycznych. Dodatkową zaletą chowu indyków jest możliwość pozyskania od nich mięsa, które wśród konsumentów uchodzi za najdelikatniejsze wśród drobiu. Niestety wśród ludzi istnieje przeświadczenie o agresywnym usposobieniu tych ptaków. Oczywiście, jak w każdej populacji zdarzają się wyjątkowe sytuacje, jednak generalnie ptaki te nie są agresywne i mimo udomowienia tolerują człowieka, zachowują jednak przy tym bezpieczny dystans (Damaziak i Michalczyk 2012).

Ptactwo wodne

Gospodarstwa agroturystyczne poza ptakami grzebiącymi sięgają także po ptaki wodne. Coraz częściej można spotkać gęsi czy kaczki (Kozuszek i Witkiewicz 2004). Dodatkowym atutem chowu tych ptaków jest możliwość pozyskania od nich poza mięsem także pierza, co w połączeniu z zapomnianą już tradycją jego darcia daje prócz atrakcji turystycznej również możliwość pozyskania cennego surowca. Wśród ras wymienia się między innymi gęsi regionalne (biłgorajska, lubelska, kartuzka), kubańskie czy zyskujące na popularności gęsi landes. Ciekawą rasą zyskującą w ostatnim czasie na popularności jest gęś sewastopolska charakteryzująca się lokowanym upierzeniem (Książkiewicz 2004).

Ptaki egzotyczne

Kiedy rodzime gatunki drobiu nie wystarczają właściciele gospodarstw sięgają po ptaki egzotyczne, a wybór ten staje się coraz bardziej powszechny. Dzięki takiemu kierunkowi rozwoju możemy już spotkać gospodarstwa prowadzące chów strusi czy emu. Trzeba jednak zwrócić uwagę, że przy bardzo dużych rozmiarach ptaki te potrzebują odpowiednio dużego wybiegu, dodatkowo często nie tolerują one innych gatunków, co często prowadzi do występowania agresji i może stanowić zagrożenie dla ludzi i innych zwierząt (Sammel i Dańczak 2007).

4. Podsumowanie

Drób jako element produkcyjny gospodarstwa może pełnić także funkcję dodatkowej atrakcji turystycznej. Dzięki mnogości ras i gatunków każde gospodarstwo może zachować przy tym swój indywidualny charakter. Dodatkowo większość ptaków poza walorem estetycznym przynosi dodatkowe zyski w postaci mięsa, jaja czy pierza. Podejmując decyzję o wprowadzeniu do gospodarstwa, stanowiących atrakcję, gatunków drobiu należy jednak pamiętać, że przy wyborze ras lub mieszańców należy przeanalizować ich zdolność adaptacji do miejscowych warunków środowiskowych, odporność na choroby i aktywność (Calik 2009).

Z uwagi na rosnące zapotrzebowanie na usługi agroturystyczne, chów i hodowla drobiu ozdobnego rozwija się bardzo dynamicznie na znacznie szerszą niż dotychczas skalę, co pozwala wprowadzić do gospodarstw całą paletę barw i kształtów, ale także rozwój tej gałęzi drobiarstwa.

5. Literatura

Balińska A (2002) Znaczenie rozwoju agroturystyki w zaspokajaniu potrzeb klientów (na przykładzie regionu nadbużańskiego). *Problemy Turystyki* 3-4(25): 63-80.

- Brzóska F, Dobrowolska D, Kłopotek E, Pietras M (2012) Drób ozdobny – hodowany przez człowieka dla przyjemności. *Wiadomości Zootechniczne* 50(4): 67-76.
- Calik J (2009) Charakterystyka kur nieśnych objętych programem ochrony zasobów genetycznych w Polsce. *Zeszyty Naukowe Południowo-Wschodniego Oddziału Polskiego Towarzystwa Inżynierii Ekologicznej* 11: 21–26.
- Chojka K (2008) Turystyka i dziedzictwo kulturowe jako wyróżnik regionu w warunkach integracji europejskiej. *Ochrona środowiska, turystyka i dziedzictwo kulturowe Pogórza Dynowskiego*, Materiały konferencyjne V Konferencji Naukowo-Technicznej "Błękitny San": 9-24.
- Czarnecki W (2007) Rekreacja, turystyka i agroturystyka w gospodarce przestrzennej - wyzwanie XIX wieku. Wydawnictwo Wyższa Szkoła Finansów i Zarządzania, Białystok.
- Damaziak K, Michalczuk M (2012) Różnice w zachowaniu indyków Big-6 i prymitywnych w warunkach chowu półintensywnego. *Przegląd Hodowlany* 80 (3-4): 20-22.
- Dzięgielewska Ż, Barszcz K, Kupczyńska M (2013) Pawie indyjskie – środowisko życia w hodowli wolnowybiegowej. *Dawna medycyna i weterynaria*, 57 - 74.
- Jalinik M (2004) Kontrowersje wokół pojęć i definicji w agroturystyce. *Zeszyty Naukowe Politechniki Białostockiej. Ekonomia i Zarządzanie* 9: 97-105.
- Kawa M, Cyran K (2015) Wiedza konsumentów jako determinanta decyzji zakupowych na rynku żywności ekologicznej. *Zeszyty Naukowe SGGW w Warszawie. Ekonomia i Organizacja Gospodarki Żywnościowej* 112: 63-74.
- Knecht D (2009) Agroturystyka w agrobiznesie. Wydawnictwo C.H. Beck.
- Kostuch R (2009) Perspektywy agroturystyki. *Aura* 1: 17-19.
- Kożuszek R, Witkiewicz K (2004) Amatorskie rasy kaczek i gęsi w gospodarstwach agroturystycznych. *Wiadomości Rolnicze. Wojewódzki Podlaski Ośrodek Doradztwa Rolniczego w Szepietowie*, 06: 25.
- Krawczyk J (2017) Wpływ genotypu i wieku kur na jakość jaj kur Leghorn (rody G-99 i H-22) oraz Sussex (ród S-66). *Aparatura Badawcza i Dydaktyczna* 22: 94-100.
- Krzyżanowska K (2005) Ekonomiczne efekty prowadzenia działalności agroturystycznej [W:] Kryński Z, Kmita-Dziasek E (red.) *Turystyka wiejska a rozwój i współpraca regionów*.
- Książkiewicz J (2004) Sewastopolska, szurpata albo kędzierzawa czyli ges fiokowana. *Polskie Drobiarstwo* 10: 7-9.
- Łukasiewicz M, Michalczuk M, Pietrzak D, Adamczak L (2009) Chemical composition and physico-chemical properties of meat of Ayam cemani hens and cocks. *Animal Science* 46: 307-313.
- Nowogródzka T, Pieniak-Lendzion K (2014) Propozycje ofert gospodarstw agroturystycznych a oczekiwania konsumentów. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczo-Humanistycznego w Siedlcach. Seria: Administracja i Zarządzanie* 27(100): 97-108.
- Obrzut J, Pasternak M, Krawczyk J (2014) Możliwości wykorzystania krajowych populacji kur objętych ochroną do produkcji pulard. *Wiadomości Zootechniczne* 52: 66–75.
- Orzechowska –Kowalska K (2003) *Zasady tworzenia szlaków kulturowych. Turyzm* 13(2): 69-78.
- Pisarek M, Lechowska J (2014) Nowoczesne formy turystyki szansą zrównoważonego rozwoju obszarów wiejskich Podkarpacia. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie* 14(4): 63-76.
- Przebórska - Skobiej L (2015) Polityka rozwoju obszarów wiejskich Unii Europejskiej a rozwój turystyki wiejskiej [W:] Kamińska W, Wilk-Grzywna M (red.): *Turystyka wiejska i agroturystyka. Nowe paradygmaty dla XXI wieku*, Warszawa.
- Sammel A, Dańczak A (2007) Dobrostan zwierząt w gospodarstwach agroturystycznych w województwie zachodniopomorskim. *Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis, Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica* 255(2): 109–118.
- Sokół JL, Kołozsko-Chomentowska Z (2010) Produkty zwierzęce jako atrakcja w gospodarstwach agroturystycznych. *Ekonomia i Zarządzanie* 3: 137-146.
- Spychalski G (1998) Agroturystyka jako element przedsiębiorczości pozarolniczej na obszarach wiejskich [W:] Pałasz L (red.): *Agrobiznes – pozarolnicze przedsięwzięcia gospodarcze na obszarach wiejskich*, Wyd. AR w Szczecinie.

- Szałda M (2002) Działalność WODR Modliszewice w zakresie rozwoju rolnictwa ekologicznego w województwie świętokrzyskim. Ogólnopolska konferencja Naukowa nt. Perspektywy rozwoju regionu w świetle badań krajobrazowych. Kielce – Sandomierz, 3–4.10.2002
- Ziernicka - Wojtaszek A, Zawora T (2014) Wybrane metody oceny atrakcyjności agroturystycznej. Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich 2: 235–245.
- Żelezik M (2009) Dlaczego rolnictwo ekologiczne. Rocznik Świętokrzyski, Seria B-Nauki Przyrodnicze 30: 155-166.

18. Rekonstrukcje paleośrodowiskowe z wykorzystaniem dewońskich palinomorf.

Devonian palynomorphs in palaeoenvironmental reconstructions.

Kondas Marcelina

Katedra Paleontologii i Stratygrafii, Wydział Nauk o Ziemi, Uniwersytet Śląski w Katowicach
Opiekun naukowy: dr hab. Paweł Filipiak

Paweł Filipiak: pawel.filipiak@us.edu.pl

Słowa kluczowe: palinologia, palinofacje, dewon, palinomorfy

Streszczenie

W artykule przedstawiono przykłady praktycznych zastosowań palinomorf dewońskich w rekonstrukcjach paleośrodowiska. Analiza zespołów mikroskamieniałości pozwala między innymi na odtworzenie warunków depozycji i transportu, głębokości zbiornika i na wyznaczenie odległości od obszaru lądowego. Szczegółowo omówione zostały spory i pyłki (jako wyznaczniki odległości od obszaru lądowego) oraz akritarchy (jako wyznaczniki warunków morskich).

1. Wstęp

Palinologia jest nauką przyrodniczą o interdyscyplinarnym charakterze. Pozwala ona na rekonstrukcje dawnych zbiorowisk roślinnych oraz dostarcza informacji na temat ewolucji świata roślin. Jest to także użyteczne narzędzie stosowane do określania wieku względnego skał (od prekambriu po czwartorzęd). Służy także do rekonstrukcji dawnych środowisk depozycji osadów. Nauka ta posiada także użytkowy charakter, jest wykorzystywana przy ocenie dojrzałości materii organicznej, co ma zastosowanie w poszukiwaniach węglowodorów. Palinologia sprawdza się również w medycynie (alergologia), archeologii, czy w niektórych naukach rolniczych (badania miodów). Badania palinologiczne pozwalają także na korelację osadów nieraz pochodzących ze znacznie od siebie oddalonych obszarów Europy i świata.

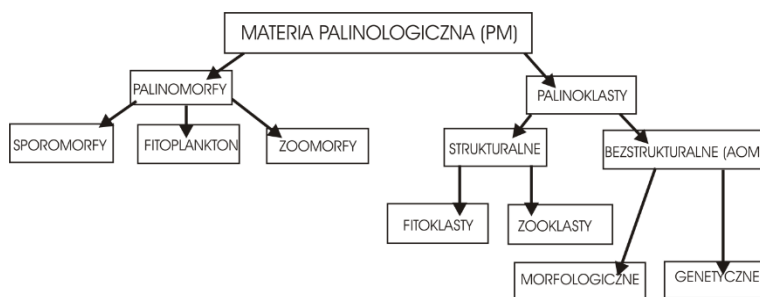
W artykule przedstawiono zastosowanie wybranych palinomorf dewońskich w rekonstrukcjach paleośrodowiska. Dewon jest okresem, w którym rośliny rozpoczęły intensywną kolonizację lądów, co zupełnie zmieniło funkcjonowanie ówczesnych ekosystemów. Jest to okres szczytowego rozwoju raf koralowych oraz fauny morskiej, jak również okres w którym miejsce miał szereg globalnych zdarzeń biotycznych, prowadzących do serii wymierań, zakończonej wielkim kryzysem na granicy dewon/karbon. Stąd osady tego wieku stanowią szczególnie interesujący obiekt badań.

2. Analiza palinofacyjna – zarys problemu

Termin palinologia pochodzi od dwóch greckich wyrazów *παλύνω* (*palynejn* – rozsiewać) oraz *λογία* (*logia* – nauka), Wprowadzony został do literatury przez Hydea i Williamsa (1944). Palinologia jest dziedziną zajmującą się badaniami zarodników oraz ziaren pyłków znajdujących się poza rośliną, która je wytworzyła.

Z kolei pojęcie palinofacji wprowadzone zostało do literatury po raz pierwszy przez Combaza (1964). W ten sposób opisywał on pozostałości organiczne, uzyskane po chemicznej maceracji skały, które możliwe były do obserwacji w mikroskopie świetlnym (Wood i in. 1996). Z pojęciem palinofacji ściśle wiąże się zagadnienie środowiska depozycji. W takim rozumieniu poszczególnym środowiskom sedymentacji odpowiada określony zespół materii organicznej (palinolitofacje, palinobiofacje). Pojęciem zbliżonym są palinofacje środowiskowe, obejmujące fizyczne cechy materiału roślinnego, środowisko depozycji i sposób jego transportu (Słodkowska 2003). Dla potrzeb analizy palinofacyjnej wprowadzony został termin materia palinologiczna (Batten 1996). W pojęciu materii palinologicznej zawierają się dwa rodzaje mikroszczątków: palinomorfy oraz palinoklasty (Rys.1). Palinomorfy to mikroskamieniałości dla których możliwym jest określenie

ich przynależności taksonomicznej. Palinoklasty nie są taksonomicznie oznaczalne. W obrębie palinomorfów wydzielić można komponenty morskie (fitoplankton), szczątki pochodzenia roślinnego (sporomorfy) i zwierzęcego (zooklasty). Z kolei palinoklasty mogą być dzielone na strukturalne i bezstrukturalne. Te posiadające strukturę można zaklasyfikować jako elementy pochodzenia roślinnego (fitoklasty), bądź zwierzęcego (zooklasty). Istotnym składnikiem materii palinologicznej jest bezstrukturalna materia organiczna (AOM), której geneza wciąż pozostaje niejasna (Batten 1996). Wszystkie te komponenty pozwalają na rekonstrukcję środowiska depozycji osadów.



Rys. 1. Klasyfikacja materii organicznej (źródło: Słodkowska 2003).

Podczas wykonywania rekonstrukcji paleośrodowiska w oparciu o materiał palinologiczny, pod uwagę należy wziąć szereg różnorodnych cech tego materiału. Kluczowe znaczenie ma ocena pochodzenia materiału (jeżeli jest ona możliwa) i przypisanie go do środowiska np. rozróżnienie na morskie, słodkowodne i lądowe palinomorfy, a także wyznaczenie taksonów wskaźnikowych danego środowiska. Pod uwagę wziąć także należy morfologię i stan zachowania materiału, na który wpływ mają takie czynniki jak długość transportu, czy środowisko depozycji. Istotny jest także wiek analizowanego materiału i stopień jego dojrzałości oraz różnice w składzie chemicznym. W oparciu o te cechy powstał szereg klasyfikacji materii palinologicznej (Staplin 1969; Tyson 1993). Każda z nich kładzie nacisk na inne cechy i w oparciu o nie wprowadza coraz bardziej złożone podziały organiki.

2.1 Zawartość fitoklastów oraz amorficznej materii organicznej, a warunki depozycji osadów.

W ujęciu teoretycznym zdecydowana większość fitoklastów pochodzi ze środowiska lądowego. Ich wysoka zawartość spowodowana jest głównie przez ich dużą dostawę, warunki sprzyjające ich zachowaniu lub warunki dogodne dla sedymentacji tych cząstek. To, jaką rolę odegrał każdy z tych parametrów zależy w dużym stopniu od rodzaju materiału (Tyson 1993). W środowiskach dewońskich wysoka dostawa fitoklastów wynikała najczęściej z obecności ich bezpośredniego źródła w pobliżu zbiornika sedymentacji. W przypadku gdy transport nie trwał długo sortowanie materiału miało miejsce w ograniczonym zakresie, skutkiem czego deponowane były cząstki o różnych wielkościach i różnego rodzaju. Niemalże cały materiał organiczny pochodzenia lądowego transportowany był rzekami, a jego depozycja miała miejsce najczęściej w pobliżu ich ujść w obrębie wewnętrznej części szelfu. Pewne ilości fitoklastów mogły osiągnąć szelf zewnętrzny w przypadku gdy ładunek niesiony przez rzeki był bardzo duży, lub też gdy szelf był bardzo wąski. W wielu estuariach sedymentacja rozpoczynała się zanim zasolenie osiągnęło 3-10 % (Tyson 1993). W opinii Degensa i Moopera (1976) jedynie osady deponowane w estuariach lub blisko linii brzegowej odzwierciedlają wpływy środowiska lądowego, bez względu na przebieg cyklu transgresywno - regresywnego. Jednak powszechnie przyjmuje się, że wpływ ten związany był z globalnym poziomem morza i zwiększał się gdy ten poziom był niski, a szelfy wąskie (Tyson 1993). Najbardziej odpowiednie dla depozycji fitoklastów były środowiska rzeczne oraz deltowe (część dystalna delty), gdzie poziom wody ulegał znacznym wahaniom.

Fitoklasty mogły także gromadzić się w oddalonych od brzegu środowiskach, jeśli zdołały przetrwać proces transportu (głównie były to fragmenty drewna), jednak ich ilości w tego typu dystalnych osadach były z reguły niskie. Na obecność fitoklastów wpływ miała także równowaga

hydrodynamiczna. Szczątki roślinne były relatywnie duże i o dużej gęstości, stąd koncentrowały się często w osadach bogatych w gruboziarniste iły lub drobnoziarniste piaski (Tyson 1993).

Depozycja w pobliżu źródła materiału miała miejsce także w przypadku kutikul, które w zdecydowanej większości pochodzą z liści (Tyson 1993). Kutikule znajdowane były najczęściej w środowiskach rzeczno- deltowych i deltowych i są elementem charakterystycznym dla facji prodelty (Tyson 1993). Kutikule w osadach głębokomorskich mogły się znaleźć w przypadku gdy zostały one pochwycone przez gwałtowną sedymentację podczas spływów grawitacyjnych, stąd pojawiać się mogły w obrębie kanałów rozprzewadzających podmorskiego stożka (Tyson 1993). Drobne szczątki pochodzące ze zniszczonych w transporcie liści mogły być przenoszone w zawieszynie również przez stosunkowo słabe prądy, co powodowane było ich dużą wypornością.

Fitoklasty mogły być także deponowane w utleniających warunkach jako nieprzezroczysty materiał pochodzący głównie z oksydacji przeświecających fragmentów drewna podczas wydłużonego transportu. Taki stan ich zachowania mógł także wynikać z różnego rodzaju zmian post-depozycyjnych. Częste występowanie nieprzezroczystych fitoklastów powiązано z facjami reprezentującymi środowiska wysoko energetycznie, w których osady mają relatywnie grubsze ziarno. Duże ilości nieprzezroczystych fitoklastów znajdowano także w środowiskach deltowych. Materiał ten prawdopodobnie reprezentuje post-depozycyjne utlenianie fragmentów drewna podczas sezonowych zmian poziomu wody. Tego typu utlenianie zachodziło także w osadach litoralnych, gdzie poziom wody regulowany był pływami (Tyson 1993). W osadach oceanicznych obecne są małe (>20 µm) nieprzezroczyste i półprzezroczyste cząstki, których obecność wzrastała zwłaszcza podczas transgresji morskich, gdy ograniczona była dostawa materii lądowej. Utlenione fragmenty drewna są także charakterystyczne dla stoków kontynentalnych (Tyson 1993). W osadach deponowanych bliżej brzegu materiał nieprzezroczysty również jest obecny, jednak jest on rozproszony pośród obficie występujących, większych fitoklastów.

Istotnym komponentem w odniesieniu do którego ustalana jest ilość palinomorf jest amorficzna substancja organiczna (AOM). Duża zawartość AOM odzwierciedla warunki redukujące (Tyson 1993). Obecność amorficznej materii organicznej w osadach morskich najczęściej jest związana z fitoplanktonem (Tyson 1993), jednak jej geneza ciągle pozostaje niewyjaśniona. W zbiornikach ubogich w tlen, zasobnych w AOM, allochtoniczny materiał lądowy był zachowany tylko w najbliższym sąsiedztwie źródła tego materiału lub też w obszarach występowania prądów zawieszinowych (Tyson 1993).

2.2 Zawartość poszczególnych palinomorf, a środowisko depozycji

Zawartość palinomorf ograniczana jest przez ilość amorficznej materii organicznej oraz fitoklastów. Spośród tych komponentów, palinomorfy stanowią najmniej liczną grupę. Ich zawartość wzrasta w osadach w których maleje zawartość AOM oraz w osadach deponowanych w dużej odległości od źródła fitoklastów. Również w sytuacji kiedy produkcja i transport fitoklastów maleje, ilość palinomorf wzrasta.

Określenie środowiska depozycji jest możliwe na podstawie analizy zespołów palinomorf. Jeżeli dominują sporomorfy prawdopodobnie środowisko depozycji było środowiskiem nisko-energetycznym, w stosunkowo niewielkiej odległości od obszaru lądowego, o umiarkowanie utleniających warunkach, w którym mogły się koncentrować unoszone wiatrem pyłki lub cząstki o dużej wyporności. Materiał o grubszej frakcji (fitoklasty) zdeponowany został prawdopodobnie jeszcze przed tą strefą, stąd procentowa zawartość palinomorf była w stanie relatywnie wzrosnąć.

Obecność sporomorf w odniesieniu do innych palinomorf (np. fitoplanktonu) w dużym stopniu wskazuje na zmiany środowiska depozycji, zwłaszcza na zakres oddziaływania środowiska lądowego i morskiego.

Głównym wektorem wskazującym kierunek rozproszenia dewońskich spor był kierunek ujścia wód rzecznych, stąd duże ilości sporomorf można znaleźć w facjach prodeltowych, gdzie stanowią średnio zróżnicowane grupy, jednak ich całkowita ilość jest wysoka. W środowiskach otwartego morza ilość sporomorf spadała, zaś wzrastała ilość fitoplanktonu (Tyson 1993). Różna w zależności od środowiska jest także relacja pomiędzy ilością pyłków, a spor. Ponieważ wilgotne warunki były konieczne do wzrostu paprotników, spory produkowane były głównie w nisko

położonych, bagnistych obszarach, stąd też wiąże się je ze środowiskami deltowymi. Ich obecność może służyć za wskaźnik wilgotnego klimatu oraz wskazuje na osady, które deponowane były we względnie niedużej odległości od brzegu. Stosunek ilości spor do pyłków jest użytecznym wskaźnikiem odległości od rzeczno-deltowych obszarów źródłowych, ponieważ spory były wytwarzane w mniejszych ilościach niż pyłki i transportowane były na mniejsze odległości.

Podczas transportu sporomorfy rozdzielane były według wielkości oraz gęstości. Duże, gęste, bogato urzeźbione spory o grubej ścianie transportowane były mniej efektywnie, stąd ich ilość oraz różnorodność wraz z odległością od źródła spadała. Ilości oscylujące wokół 500 spor na gram są charakterystyczne dla obszarów rzecznych, bagnistych oraz dla facji lagunowych (Tyson 1993).

Pyłki, zwłaszcza wyposażone w worki powietrzne transportowane były na dalsze odległości. Pomimo, że ich całkowita ilość wraz z odległością od brzegu spada, ich procentowa zawartość w stosunku do pozostałych sporomorf wzrastała. Z tego powodu pyłki są istotnym wskaźnikiem odległości od rzeczno-deltowego obszaru źródłowego. Jednak pod uwagę należy brać fakt, że niektóre pyłki nasiąknięte wodą zachowywały się podobnie do cięższych cząsteczek. Ponadto, w obrębie tej grupy sporomorf również zarysowują się różnice wielkości, stąd nie wszystkie pyłki były jednakowo łatwo przenoszone w kierunku otwartego morza.

Wskaźnikiem odległości od lądowego źródła sporomorf jest także obecność tetrad oraz zbitych mas pyłkowych. Są one często spotykane w facjach prodelty, a ich ilości wzrastają w kierunku brzegu zbiornika (Tyson 1993). Jednak to, czy tetrazy ulegały szybkiej sedymentacji nie było zależne jedynie od ich gęstości i ciężaru właściwego. Wpływ miały także inne czynniki, które decydowały o integralności tetrad i mas pyłkowych. Im mniejsza była energia transportu i depozycji, tym większa była szansa, że tetrazy lub masy pyłku pozostaną nienaruszone, dlatego niskoenergetyczne, dystalne, hemipelagiczne facje mogą zawierać duże ilości tetrad i mas pyłków, zaś turbidyty mogą być zubożone w tego typu asocjacje sporomorf (Tyson 1993).

Podsumowując całkowita ilość spor i pyłków w osadach morskich logarytmicznie spada w kierunku otwartego morza. Jednak zależy to przede wszystkim od rozmiaru i charakteru zbiornika oraz charakteru jego zasilania. Największe ilości, wynoszące od około 15 000 do 100 000 sporomorf na gram znajdują się w obszarach delt i spadają one gwałtownie w kierunku otwartego morza. Koncentracje na sąsiadujących szelfach są też związane z rozmiarami ziaren w osadzie, ponieważ sporomorfy podlegają sortowaniu według rozmiarów. Ich zwiększona obecność ma miejsce w osadach frakcji ilastej oraz drobniejszej, a także w wysortowanych piaskach. Ilości jakie znajdują się na stoku kontynentalnym, w dużej odległości od obszaru wpływów rzeki, oscylują wokół kilku tysięcy na gram (Tyson 1993). Jeszcze niższe zawartości obserwowane są dla osadów abysalu i wynoszą one od 10 do 500 ziaren na gram (Tyson 1993). W okresach, kiedy poziom morza był stosunkowo niski sporomorfy znajdowane były w większych ilościach nawet na obszarach daleko położonych od lądu, co spowodowane jest ich zwiększoną dostawą.

Jednym z najbardziej znaczących środowiskowo elementów jest fitoplankton, w obrębie którego wyróżnić można polifiletyczną grupę organizmów zwaną akritarchami. Grupa ta ma duże znaczenie zwłaszcza w środowiskach marginalnych facji płytkomorskich. Znaczenie akritarch w paleozoiku porównywane jest do znaczenia dinocyst zarówno mezozoicznych jak i kenozoicznych.

Istotnym czynnikiem do oceny środowiska jest morfologia akritarch. Akritarchy wyposażone w kolce są wskaźnikami energii środowiska. We względnie blisko-brzeżnych zbiorowiskach dominują dłuższe i bardziej delikatne kolce, zaś akritarchy o kolcach krótszych i grubszych charakterystyczne są dla płytszych środowisk o wyższej energii (Batten 1996).

Fitoplankton został również uznany jako użyteczny komponent do korelacji osadów, zarówno w skali lokalnej jak i globalnej (Wicander 1975). Na podstawie analizy fitoplanktonu późnodewońskiego z Barberton (Ohio, Stany Zjednoczone) stwierdzono na tym obszarze wystąpienie płytkiego morza (Wicander 1975). Ponadto w badanych próbkach zaznaczył się gwałtowny spadek ilości oraz różnorodności akritarch wraz z końcem dewonu i początkiem karbonu.

Istotne obserwacje dotyczące akritarch poczynione zostały przez Dorninga (1981). Badał on liczne zespoły akritarch pochodzące z osadów południowo-wschodniego wybrzeża Wielkiej Brytanii. Mimo że jego badania dotyczyły sylurskich akritarch, to pewne ustalenia mają charakter uniwersalny i mogą być stosowane również dla akritarch występujących w późniejszych okresach (Wicander

1975). Dorning wskazał na małą różnorodność akritarch z obszarów szelfu oraz środowisk głębokomorskich (Dorning 1981). W obrębie płytszego szelfu obserwowane było nie tylko niskie zróżnicowanie, ale także niewielka ilość akritarch wynosząca od 5 do 15 gatunków na próbkę. W większości przypadków były one sferyczne. Często występowały gatunki o cienkiej ściance takie jak *Protoleiosphaeridium*. Również licznie pojawiały się *Veryhachium* (wyposażone w 3 krótkie wyrostki), *Micrhystridium* i *Diexallophasis*. Pozostałe gatunki występowały w niewielkiej ilości (Dorning 1981). Zbiorowiska przypisywane głębszemu szelfowi były bardziej zróżnicowane jednak ilość akritarch pozostawała na średnim poziomie i wynosiła od 10 do 90 gatunków (przeciętnie od 25 do 60 gatunków). Brak było dominującego taksonu. Od 4 do 8 rodzajów stanowiło około 70-90 % ilości wszystkich akritarch w próbce. Najczęściej występującymi rodzajami, których ilości wynosiły od 5 do 20 % w próbce były: *Cymatiosphaera*, *Diexallophasis*, *Micrhystridium*, *Multiplicisphaeridium*, *Protoleiosphaeridium* i *Veryhachium*. Inne rodzaje, których ilość nie przekraczała 20 % to *Ammonidium*, *Cymbosphaeridium*, *Dateriocradus*, *Dilatisphaera*, *Eupoikilofusa*, *Leiofusa*, *Oppilatala*, *Perultisphaera*, *Pterospermella*, *Salopidium* i *Visbysphaera*. W niewielkich ilościach pojawiały się: *Carminella*, *Dictyotidium*, *Duvernaysphaera*, *Electoriskos*, *Florisphaeridium*, *Helosphaeridium*, *Leoniella*, *Lophosphaeridium*, *Onodagella*, *Psenotopus*, *Quadratum*, *Schismatosphaeridium*, *Solita* i *Tunispheeridium* (Dorning 1981). Środowiska głębokomorskie charakteryzują się zbiorowiskami akritarch o niskim zróżnicowaniu i niskiej lub średniej liczebności wynoszącej od 2 do 15 gatunków na próbkę. Dominowały sferoidalne akritarchy – *Protoleiosphaeridium*. Pozostałe akritarchy obecne w mniejszych ilościach to: *Cymatiosphaera*, *Diexallophasis*, *Lophosphaeridium*, *Micrhystridium*, *Pterospermella* i *Veryhachium* (Dorning 1981). Dorning odnotował także różnice w morfologii akritarch występujących w dalszej i bliższej odległości od obszaru lądowego. Akritarchy występujące w środowisku głębokomorskim miały proste, dłuższe wypustki i cienką ściankę, natomiast te występujące bliżej brzegu miały mniejszą ilość wypustek lub kołców i były one krótsze (Dorning 1981).

Ustalenia te odnoszą się jak wspomniano do akritarch sylurskich, jednak ich znaczenie polega głównie na wskazaniu, że możliwa jest rekonstrukcja paleośrodowiska w oparciu o stwierdzenie obecności poszczególnych grup akritarch w próbkach, oraz na podkreśleniu znaczenia ich morfologii dla interpretacji środowiskowych.

Przykładów praktycznych zastosowań palinomorf w badaniach paleośrodowisk jest wiele. Wicander i Playford (1985) opisali dobrze zachowane zbiorowisko akritarch i spor z profilu górnego dewonu (fran) formacji Lime Creek (Iowa, Stany Zjednoczone). Rozpoznane zostały 23 rodzaje i 43 gatunki akritarch oraz 12 rodzajów i 12 gatunków spor. Analizy palinologiczne wykazały ilościową przewagę akritarch nad sporami. Te pierwszy prezentowały także większą różnorodność. Różnorodność, ilość oraz cechy morfologiczne akritarch wykazały średnie zróżnicowanie, żaden takson nie dominował pośród pozostałych. Taki zespół w klasyfikacji Dorninga (1981) wskazywać miał na środowisko otwartego morza, jednak w relatywnie niewielkiej odległości od brzegu. Na takie warunki wskazywała także obecność akritarch o kształtach innych niż kuliste. Rozpoznano także akritarchy *Leiosphaeridia*, *Tasmanites* oraz *Lophosphaeridium*. Ich obecność zinterpretowana została jako wskaźnik głębokości, w tym przypadku miały odpowiadać środowiskom płytkomorskim. Sporomorfy pojawiały się w tym profilu rzadziej, jedyny wyjątek stanowiła *Geminospora lemurata*. Obecna także w profilu fauna muszlowa oraz konodonty wskazywały na środowisko otwartego morza i niedużej odległości od brzegu.

Podobna zgodność pomiędzy analizami palinologicznymi, a wcześniejszymi ustaleniami wykonanymi w oparciu o makroskamianiałości została zanotowana dla skał środkowego dewonu

formacji Cedar Valley (Iowa, Stany Zjednoczone). W próbkach stwierdzona została obecność spor, akritarch oraz chitinozoa. Pod uwagę wzięte zostały: różnorodność morfologiczna, zróżnicowanie gatunkowe oraz stosunek ilości mikrofitoplanktonu do spor. Stwierdzono obecność 28 rodzajów akritarch, które obejmowały 40 gatunków oraz 10 gatunków chitinozoa (Wicander i Wood 1997). Największe zróżnicowanie mikrofitoplanktonu zostało zaobserwowane w początkowych 14 metrach profilu wskazując na depozycję w środowisku otwartego morza lub też w strefie do niej zbliżonej (Wicander i Wood 1997). Górna część profilu była zasobna w spory, tym samym odzwierciedlając zmniejszającą się odległość do brzegu. Zróżnicowane ilości chitinozoa zdawały się

nie być powiązane z ilościami spor i akritarch, jednak obecność tych organizmów łączona jest ze środowiskiem otwartego morza. Najczęściej występującymi chitinozoa były *Angochitina*, *Ancyrochitina* oraz *Alpenachitina*. Zmiany ilości i rodzaju palinomorf zinterpretowane zostały jako odzwierciedlenie regresji, która rzutowała na zmiany położenia linii brzegowej. Pozwoliło to na szczegółowe określenie warunków depozycji. Zmniejszająca się procentowa zawartość akritarch wyznaczyła przybliżoną odległość od obszaru lądowego. Osady stropowej części profilu interpretowane były jako bliższe obszarowi lądowemu, niż osady części spągowej. Zjawisko to podkreślone było wzrastającą ilością spor (Wicander i Wood 1997).

3. Podsumowanie

Sposób zachowania materii palinologicznej zależy od sposobu jej transportu, odległości od brzegu, dynamiki zbiornika i głębokości (Słodkowska 2003).

W odniesieniu do okresu dewonu, za najbardziej użyteczne uznać można spory i akritarchy. Pozostałe opisywane palinomorfy mają mniejsze znaczenie z uwagi na ich mniej liczną obecność w próbkach. Dodatkowo, organizmy te wywarły ogromny wpływ na ówczesne środowisko. Wraz z kolonizacją lądów przez rośliny i ich gwałtowną dywersyfikacją doszło do zmian w zakresie klimatu, a w konsekwencji do zmian w procesach wietrzenia, co znacząco odbiło się na organizmach morskich i być może przyczyniło do ich wymierania.

Na podstawie wybranych przykładów zaobserwować można kilka najważniejszych zależności pokazujących w jaki sposób w okresie dewonu zmianom ilościowym i jakościowym palinomorf odpowiadają zmiany środowiska.

4. Literatura

- Batten DJ (1996) Palynofacies and palaeoenvironmental interpretation. [w:] Jansonius J i Mc Gregor DC (Red.) Palynology: Principles and applications (3) American Association of Stratigraphy Palynologists Foundation, Salt Lake City: 1011-1064.
- Combaz A (1964) Les palynofacies: Revue de Micropaleontologie 7: 205-218.
- Degens ET i Mopper K (1976) Factors controlling the distribution and early diagenesis of organic material in marine sediments: Chemical Oceanography 6: 59-113.
- Dorning KJ (1981) Silurian acritarch distribution in the Ludlovian shelf sea of South Wales and the Welsh Borderland. [w:] Brasier MD (Red.) Microfossils from Recent and Fossil Shelf Seas, Ellis Horwood Ltd, Chichester: 31-36.
- Hyde HA i Williams DA (1944) The right word?: Pollen Analysis Circular 8: 6.
- Słodkowska B (2003) Analiza palinofacjalna. [w:] Dybowa-Jachowicz S i Sadowska A (Red.) Palinologia, Instytut Botaniki PAN, Kraków: 316-326.
- Staplin F (1961) Reef – controlled distribution of Devonian microplankton in Alberta: Paleontology 4: 392-424.
- Tyson RV (1993) Palynofacies analysis. [w:] Jenkins DG (Red.) Applied micropaleontology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 153-191.
- Wicander R (1975) Fluctuations in a Late Devonian – Early Mississippian phytoplankton flora of Ohio, U. S.A.: Paleogeography, Paleoclimatology, Paleocology 17: 89-108.
- Wicander R i Playford G (1985) Acritarchs and spores from the Upper Devonian Lime Creek Formation, Iowa, U.S.A.: Micropaleontology 31: 97-138.
- Wicander R i Wood GD (1997) The use of microphytoplankton and chitinozoans for interpreting transgressive/regressive cycles in the Rapid Member of the Cedar Valley Formation (Middle Devonian), Iowa: Review of Palaeobotany and Palynology 98: 125-152.
- Wood GD, Gabriel AM, Lawson JC (1996) Palynological techniques — processing and microscopy. [w:] Jansonius J i McGregor DC (Red.) Palynology: Principles and applications (1) American Association of Stratigraphy Palynologists Foundation, Salt Lake City: 29-50.

19. Fizykochemiczne własności nanostruktur stosowanych do transportu leków

Physicochemical properties of nanostructures used in drugs transport

Ploch Anna, Pentak Danuta, Szkudlarek Agnieszka, Maciążek-Jurczyk Małgorzata

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Pentak Danuta: dpentak@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: transport leku, nanocząstki, liposomy.

Streszczenie

Podstawowym elementem strukturalnym błon komórkowych jest dwuwarstwa lipidowa. Najbardziej znany i powszechnie akceptowany model błony komórkowej, nazwany modelem płynnej mozaiki, został opublikowany w 1972 r. przez Singera i Nicholsona. W budowie strukturalnej błon biologicznych główny element stanowią lipidy. Jedną z klas lipidów stanowią fosfolipidy. Charakterystyczna budowa fosfolipidów – hydrofilowa „głowa” i hydrofobowy obszar łańcuchów węglowy – pozwala na tworzenie struktur zamkniętych oddzielających rdzeń takiej struktury (najczęściej mikrokropelkę wody) od roztworu zewnętrznego. Ze względu na swój charakter fosfolipidy mogą tworzyć micelle, odwrócone micelle lub nanostruktury fosfolipidowe.

W dobie szybko rozwijających się nowych technologii nietrudno zauważyć wzrost zainteresowania nanotechnologią, w którą tematyka struktur fosfolipidowych (nanostruktur) mogących enkapsulować i transportować różne substancje lecznicze wpisuje się idealnie.

1. Ogólna charakterystyka liposomów

Liposomy są zamkniętymi strukturami uzyskiwanymi podczas hydratacji fosfolipidów. Rozmiary liposomów zależą od techniki ich formowania i wahają się od 0.025 do 10 μm . Koncentrycznie ułożona membrana fosfolipidowa składająca się z pojedynczej dwuwarstwy o grubości około 4 nm lub też kilka takich dwuwarstw, stanowi ścianę pęcherzyka fosfolipidowego. Wnętrze liposomu wypełnia woda, która jest rdzeniem pęcherzyka. Woda rozdziela także dwuwarstwę między sobą (Lasic 1998).

Amfifilowy charakter fosfolipidów czyni liposomy wyjątkowo dobrymi nośnikami leków. Substancje lecznicze w zależności od swoich właściwości fizykochemicznych mogą znajdować się w fazie wodnej wewnątrz liposomu lub wbudowywać się do błon liposomu (Storm 1998). Ścianę liposomu tworzy pojedyncza dwuwarstwa lipidowa zbudowana z dwóch lub trzech elementów:

- a) fosfolipidu - w praktyce najczęściej stosowanymi składnikami błon są fosfolipidy naturalne takie jak fosfatydylocholina, fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol lub fosfolipidy syntetyczne takie jak dipalmitoylofosfatydylocholina, distearylofosfatydylocholina;
- b) steroidu - najczęściej stosowany jest cholesterol, którego zawartość w błonie liposomu może dochodzić nawet do 50%;
- c) substancji amfifilowej obdarzonej ładunkiem takiej jak diacetylofosforan (o ładunku ujemnym) lub stearyloamina (o ładunku dodatnim).

2. Błona biologiczna

Błony biologiczne zawierają wiele różnych lipidów. Główne ich klasy to: fosfolipidy, glikolipidy i sterole. Ich budowa i skład zależą od typu błony. W błonach *Prokaryota* głównymi lipidami są fosfolipidy, natomiast błony *Eukaryota* zawierają również sterole (w roślinach jest to zazwyczaj ergosterol, u zwierząt cholesterol). W błonach *Eukaryota* głównymi fosfolipidami są fosfolipidy glicerolu: fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol i kardiolipina. Występują też fosfolipidy oparte na sfingozynie np. sfingomielina i glikosfingolipidy (Lasic 1993).

2.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy (pochodne glicerolu - fosfoglicerydy) składają się z reszty glicerolu stanowiącej szkielet cząsteczki, dwóch hydrofobowych łańcuchów kwasu tłuszczowego oraz fosforylowanego alkoholu. Do powszechnie występujących w fosfoglicerydach alkoholi należą reszty seryny, etanoloaminy, inozytolu i choliny. W skład fosfolipidów wchodzi kwas tłuszczowy nasycony lub nienasycony, przeważnie o parzystej liczbie atomów węgla, na ogół od 14 do 24. Najczęściej występują łańcuchy kwasów o 16 lub 18 atomach węgla. W zwierzęcych kwasach tłuszczowych łańcuchy węglowodorowe są nierozgałęzione. W nienasyconych kwasach tłuszczowych łańcuchy z podwójnym wiązaniem przyjmują prawie zawsze konfigurację *cis* (Olbrich 2000).

2.1.1. Fosfolipidy jako cząsteczki amfifilowe

Amfifilowość odgrywa kluczową rolę w organizowaniu cząsteczek lipidów w dwuwarstwy (Lasic 1998). Cząsteczki hydrofilowe łatwo rozpuszczają się w wodzie, i mogą tworzyć wiązania elektrostatyczne lub wiązania wodorowe z cząsteczkami wody. Cząsteczki hydrofobowe są w wodzie nierozpuszczalne i nie mogą tworzyć takich wiązań z cząsteczkami wody. W cząsteczkach amfifilowych hydrofilowe fragmenty tych cząsteczek są przyciągane przez cząsteczki wody, natomiast hydrofobowe ogony stronią od cząsteczek wody i dążą do agregacji z innymi cząsteczkami hydrofobowymi. Przy takim ich zachowaniu tworzy się dwuwarstwa lipidowa jako forma najbardziej korzystnego energetycznie uporządkowania. Hydrofilowe głowy są zwrócone ku wodzie po obu stronach dwuwarstwy, a hydrofobowe ogony są osłonięte przed wodą i ułożone we wnętrzu dwuwarstwy. Skupienie hydrofobowych łańcuchów węglowodorowych lipidów w niepolarnym wnętrzu dwuwarstwy uwalnia cząsteczki wody, powodując jednocześnie zwiększenie entropii całego układu. Ponadto, między łańcuchami węglowodorowymi występują przyciągające siły Van der Waalsa, ułatwiające ich ścisłe upakowanie (Kusube 2005). Taka budowa liposomów powoduje, że między grupami polarnymi fosfolipidów a cząsteczkami wody występują oddziaływania elektrostatyczne i wodorowe. Tak więc dwuwarstwy lipidowe są stabilizowane przez te same siły, które występują w molekularnych oddziaływaniach w układach biologicznych. Wymienione czynniki energetyczne decydują o zasadniczych właściwościach dwuwarstw lipidowych: a) mają one naturalną tendencję do tworzenia struktur o dużej powierzchni; b) dążą do zasklepienia się w taki sposób, aby nie pozostawiać krawędzi, z których wystawałyby łańcuchy węglowodorowe, co prowadzi do tworzenia przedziałów zamkniętych błoną; c) mają zdolność samouszczelniania się, ponieważ otwór w dwuwarstwie jest energetycznie niekorzystny.

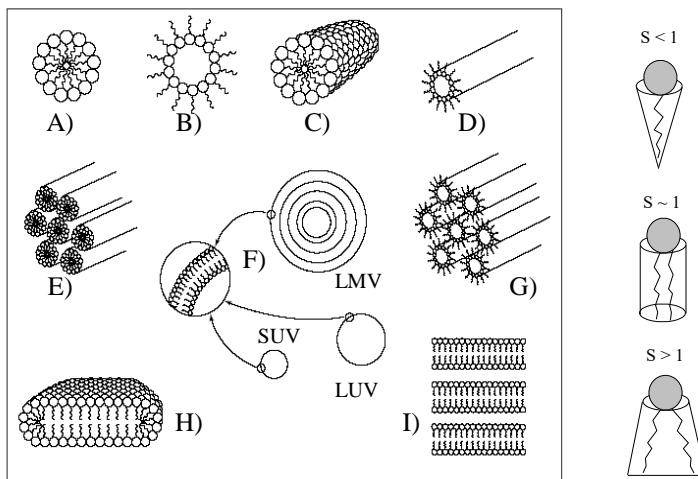
2.1.2. Struktury agregacyjne

Badania wykazały, że istotną rolę w procesie agregacji cząsteczek amfifilowych ma ogólny ich kształt (Rys. 1), który zależy nie tylko od ich struktury pierwotnej, ale również od stopnia jonizacji i uwodnienia. Parametr upakowania w agregacie definiuje się jako:

$$S = \frac{v}{a * l}$$

gdzie: v - objętość części hydrofobowej cząsteczki amfifilowej, a – powierzchnia przekroju poprzecznego części polarnej cząsteczki amfifilowej, l – długość łańcucha(ów) węglowodorowych cząsteczki amfifilowej (Isrealachvili i in. 1976).

Dla cząsteczek o wartościach $S = 1$ preferencyjną formą agregacji jest dwuwarstwa. Przy $S > 1$ preferowana jest struktura odwróconej miceli i faza heksagonalna H_{II} , natomiast gdy $S < 1$ powstają struktury micelarne i faza heksagonalna H_I (Rys. 1) (Isrealachvili i in. 1976).



Rys. 1. Formy agregacji fosfolipidów: A) micela, B) odwrócona micela, C) wydłużona micela, D) odwrócona-wydłużona micela, E) faza heksagonalna H_I , F) liposom: SUV – mały jednowarstwowy, LUV – duży jednowarstwowy, LMV – duży wielowarstwowy, G) faza heksagonalna odwrócona H_{II} , H) spłaszczona micela, I) faza wielobłonowa (Lasic 1998); Wpływ kształtu cząsteczki amfifilu na parametr upakowania w agregacie S (Lasic 1993).

2.1.3. Polimorfizm termotropowy a zawartość wody w układzie

Fosfolipidy w dwuwarstwie ulegają zmianom strukturalnym (fazowym) wraz ze zmianą temperatury, czyli wykazują tzw. polimorfizm termotropowy (Kusube 2005). W błonach dwuwarstwowych, zbudowanych z czystych, identycznych cząsteczek fosfolipidowych, obserwuje się różne termotropowe przejścia fazowe. Istnieje wiele metod fizycznych pozwalających na obserwację tych procesów m. in.: różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC) (Kusube 2005), dylatomia (Heerklotz i in. 2002), dyfrakcja X-ray (Xiuhong i in. 2005), dyfrakcja neutronów (Ge i in. 2003), NMR (Pentak i in. 2008a), EPR (Pentak i in. 2008b), fluorescencja (Benatti i in. 1999). Pomimo istnienia tak wielu technik pozwalających na obserwację termotropowego zachowania się fosfolipidów, metoda DSC wydaje się być najczęściej stosowaną i dostarczającą najwięcej informacji.

Lipidy mogą tworzyć bardzo różnorodne liotropowe struktury ciekłokrystaliczne. Struktura powstającego ciekłego kryształu zależy od temperatury i zawartości wody w układzie oraz od właściwości samych lipidów. Spośród różnych właściwości lipidów istotne są natura i rozmiary grup polarnych oraz rozmiary i stopień nienasycenia łańcuchów węglowodorowych. Cechą wspólną wszystkich liotropowych struktur ciekłokrystalicznych w układzie lipid-woda jest maksymalnie możliwa hydratacja grup polarnych i separacja części polarnych cząsteczek lipidów od wody.

Tendencją do tworzenia struktur lamelarnych wykazują fosfatydylocholiny, które są głównym składnikiem błon komórkowych *Eukaryota*. Fosfatydylocholiny tworzą te struktury w szerokim zakresie temperatury. Warunkiem koniecznym powstawania ciekłych kryształów liotropowych fosfatydylocholin jest dostatecznie duża zawartość wody. W przypadku dipalmitoylofosfatydylocholiny (DPPC), w temperaturze niższej od 25°C i w obecności od 2 do 10 cząsteczek wody na 1 cząsteczkę fosfatydylocholiny, obserwuje się sytuację, kiedy to łańcuchy węglowodorowe ustawione są prostopadle do płaszczyzny warstwy, a ich grupy metylenowe są ściśle upakowane w sieci krystalicznej. Jest to tzw. faza L_C . Na jeden łańcuch węglowodorowy przypada w tej strukturze powierzchnia około 0.190 nm^2 . W temperaturze 25°C następuje przejście fazowe do struktury L_{β} , zwane podprzejściem. Łańcuchy są w tej strukturze upakowane luźniej, nachylone pod pewnym kątem do normalnej do płaszczyzny warstwy i tworzą dwuwymiarową sieć krystaliczną. Kąt nachylenia łańcuchów zależy od temperatury i stopnia hydratacji grup polarnych. Na jeden łańcuch węglowodorowy przypada powierzchnia 0.191 nm^2 . Dla tej struktury stwierdzono, że łańcuchy

węglowodorowe mogą rotować wokół ich długich osi. Przy dostatecznie dużej zawartości wody dwuwarstwy DPPC ulegają w temperaturze 35°C przejściu fazowemu do struktury $P_{\beta'}$, która różni się od struktury $L_{\beta'}$ tym, że dwuwarstwy nie są płaskie, lecz pofalowane. Amplituda pofalowania jest rzędu kilku dziesiątych nanometra, a jego okres wynosi 16.2 nm przy zawartości 21% wagowych wody i zmienia się liniowo do 14.0 nm przy zawartości 25% wagowych wody. Powierzchnia właściwa przypadająca na jeden łańcuch węglowodorowy wynosi 0.204 nm². Prawdopodobnie pojawienie się struktury $P_{\beta'}$, związane jest z obniżeniem energii swobodnej układu dzięki dodatkowej hydratacji grup polarnych DPPC, która jest możliwa wskutek zwiększenia powierzchni warstwy. W warstwach fosfatydylocholin zawierających nasycone łańcuchy węglowodorowe o długości ponad 20 atomów węgla faza $P_{\beta'}$ nie występuje. Pofalowanie warstwy związane jest z przesunięciem względem siebie łańcuchów acylowych, co powoduje obniżenie energii oddziaływań Van der Waalsa (Huang i in. 1999, Kriechbaum i in. 1996). W temperaturze 41.4°C w warstwach DPPC następuje główne przejście fazowe T_C , polegające na topnieniu łańcuchów acylowych. Powstaje przy tym struktura L_{α} . W strukturze tej łańcuchy nie są uporządkowane w sieć dwuwymiarową i ulegają pofalowaniu dzięki możliwości przejść konformacyjnych *trans-gauche*. Powierzchnia molekularna przypadająca na jeden łańcuch węglowodorowy zmienia się skokowo do 0.239 nm². Dzięki pofalowaniu łańcuchów węglowodorowych zmniejsza się grubość warstwy i okres powtarzalności struktury w ciekłym kryształ, co stwierdzono za pomocą pomiaru dyfrakcji promieniowania X (Kriechbaum i in. 1996). Strukturę L_{α} nazywa się często płynnym kryształem ciekłym, a struktury L_C , $L_{\beta'}$ i $P_{\beta'}$ – żel. Takie wyróżnienie fazy L_{α} znajduje uzasadnienie w tym, że w fazie tej płynność dwuwarstwy jest znacznie większa niż w pozostałych fazach. Faza L_{α} , w odróżnieniu od żelowych, charakteryzuje się dużym współczynnikiem dyfuzji lateralnej (dyfuzji w płaszczyźnie warstwy), małą lepkością i brakiem uporządkowania (pofalowaniem) łańcuchów acylowych. Przejście fazowe $P_{\beta'}$ – L_{α} jest zwane głównym przejściem fazowym, dla podkreślenia faktu przejścia do błony płynnej oraz ze względu na większą kooperatywność i ciepło tej przemiany w porównaniu z podprzejściem i przedprzejściem (Kriechbaum i in. 1996). Temperatury przejść fazowych zależą od długości łańcuchów węglowodorowych i od rodzaju grup polarnych lipidu. W przypadku fosfolipidów nasyconych temperatura przejścia fazowego wzrasta wraz z długością łańcuchów acylowych (Huang i in. 1999).

3. Transport leków w nanostrukturach

Konwencjonalna podaż leku, najczęściej w formie doustnej, to przyjęcie leku w dawce, która pozwala uzyskać pożądany efekt leczniczy w miejscu zmienionym chorobowo lub stanie zapalnym. Należy mieć jednak na uwadze fakt, iż każda taka forma przyjęcia leku wiąże się lub może się wiązać z wystąpieniem efektów ubocznych. Ponadto, kinetyka uwalniania leku w standardowym podejściu przyjmuje charakter sinusoidy w odróżnieniu od transportu leków w nanonośnikach.

Szybko rozwijające się nauki biomedyczne prześcigają się w tworzeniu nowych, doskonalszych form dostarczania substancji aktywnych biologicznie i postaci leków.

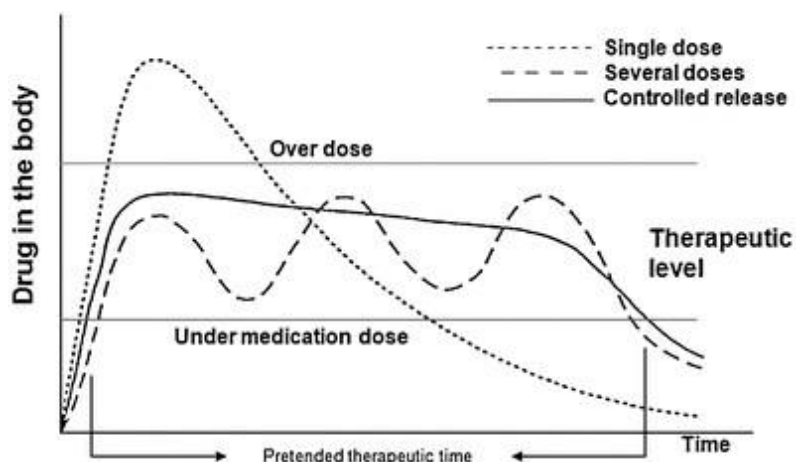
Nanomedycyna a w szczególności nanofarmakologia skupia się na celowanym dostarczaniu leku oraz sterowanym uwalnianiu leku w tkankach.

Nanomateriały charakteryzują się wymiarami ≤ 100 nm, dużym polem powierzchni właściwej i tendencją do agregacji. Warunkiem niezbędnym aby nanonośniki stosowane były w transporcie leków jest ich biogodność i biodegradowalność.

Do najczęściej stosowanych nano- nośników leków można zaliczyć polimerowe nanocząstki złota, srebra lub miedzi, kropki kwantowe, magnetyczne nanocząstki, micelle polimerowe, liposomy, dendrymery. Taka forma podażi leku (ang. drug delivery systems (DDS)) charakteryzuje się transportem celowanym oraz stopniowym i powolnym uwalnianiem leku. Bardzo istotny przy tej formie podażi leku jest fakt minimalizacji skutków ubocznych.

Przeciwbakteryjne właściwości srebra wykorzystuje się w leczeniu antybiotykami takimi jak amoksylicyna, erytromycyna, klindamycyna, penicylina G, wankomycyna przy wykorzystaniu właśnie nanocząstek tego metalu. Nanocząstki srebra znalazły również zastosowanie w diagnostyce

medycznej jako biosensory optyczne w leczeniu kolczystokomórkowego raka skóry głowy i szyi (Zhou i in. 2011).



Rys. 2. Kinetyka uwalniania leku (Jorge i in. 2010).

Nanocząstki złota wykorzystywane są w terapii fotodynamicznej. Promieniowanie elektromagnetyczne skierowane na nanocząstki złota dostarczone do tkanek zmienionych chorobowo przekształcane jest na energię ciepłą powodując wzrost temperatury i unicestwienie komórek w patologicznych tkankach.

Nanocząstki miedzi a dokładnie tlenku miedzi mogą być wykorzystywane w zwalczaniu wirusa grypy typu A oraz wirusa SARS (Ren i in. 2009).

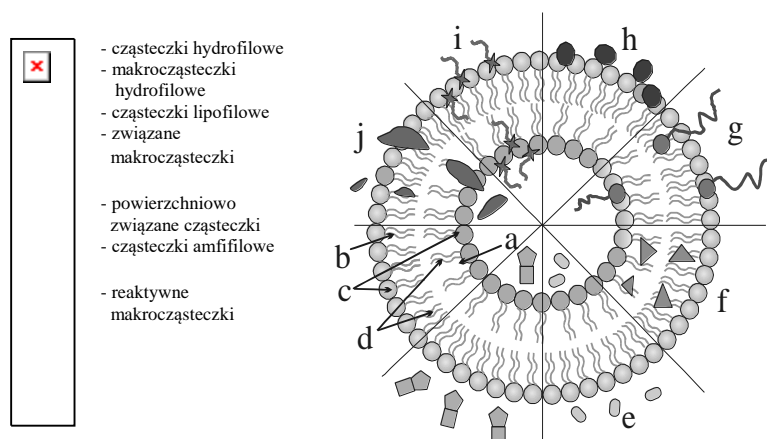
Kolejny rodzaj nowoczesnych form transportu leków prezentują półprzewodniki nanostrukturalne nazywane kropkami kwantowymi. Kropka kwantowa zbudowana jest z rdzenia, na który składa się od 100-100000 atomów, głównie tellurku lub selenku kadmu o charakterze półprzewodnika. Rdzeń otoczony jest siarczkiem cynku, do którego można przyłączyć ligandy takie jak kwasy nukleinowe, białka i przeciwciała o powinowactwie do danego np. rodzaju guza. Ponadto kropki kwantowe mogą być wykorzystywane do walki z pasożytami, wirusami i bakteriami. Wykorzystywane są do znakowania DNA i tworzenia nanosensorów w celu określenia kinetyki reakcji biochemicznych zachodzących w komórkach. Mogą być stosowane jako czynniki kontrastowe w tomografii komputerowej i rezonansie magnetycznym.

W klinicznych technikach diagnostycznych coraz częściej wykorzystywane są nanocząstki magnetyczne. Najważniejszą ich cechą jest superparamagnetyzm. Ulokowanie magnetycznych nanocząstek w badanej tkance wywołuje zmiany w lokalnym polu magnetycznym, co skutkuje zmianą czasu relaksacji. Własność ta znacznie usprawnia proces obrazowania, bowiem różnicuje tkanki zdrowe od chorych. Magnetyczne nanocząstki znalazły zastosowanie w obrazowaniu tkanek nowotworowych i układu sercowo-naczyniowego.

Obok wspomnianych struktur liposomy wydają się być strukturami całkowicie przyswajalnymi oczywiście pod warunkiem zastosowania do ich preparatyki naturalnych fosfolipidów. Liposomy stosowane są najczęściej w terapii nowotworów, cukrzycy, chorób reumatycznych, enzymopatii, schorzeń związanych z kumulacją metali. Transport w liposomach substancji leczących zwiększa ich stabilność i efekt farmakokinetyczny poprzez obniżenie procesu eliminacji leku z układu i wydłużenie okresu połowicznego zaniku leku (Ebrahim i in. 2005). Ma to istotne znaczenie w metodach diagnostycznych takich jak: tomografia komputerowa (TK), obrazowanie magnetycznego rezonansu jądrowego (MRI), ultrasonografia, jak również w medycynie nuklearnej (Phillips 1999).

Wbudowywane do liposomów leki w zależności od ich rozpuszczalności można podzielić na 4 kategorie: wysoko hydrofilowe, wysoko lipofilowe, amfifilowe i nierozpuszczalne w podwójnej

warstwie fosfolipidowej. Ogólnie przyjęty jest następujący sposób rozmieszczenia różnego rodzaju substancji w pojedynczych dwuwarstwach błon liposomalnych (Rys. 3):



Rys. 3. Sposoby rozmieszczenia substancji w błonie liposomalnej; a – wewnętrzna część błony liposomalnej, b - zewnętrzna część błony liposomalnej, c – grupy polarne fosfolipidów, d – łańcuchy węglowodorowe fosfolipidów; Części e – j przedstawiają potencjalne miejsca wiązania substancji (Gomez-Hens i in. 2005).

4. Podsumowanie

Uwzględniając powyższe informacje będące doniesieniami naukowymi z ostatnich kilku lat i bardzo szybko rozwijające się nowe kierunki badań, należy stwierdzić, że przyszłość w zakresie nowatorskich kierunków badań i schematów leczenia różnych jednostek chorobowych będzie w większości przypadków oparta na nanotechnologii. Należy mieć nadzieję, że coraz to częściej pojawiające się na rynku nowe postaci nano-leków w większości obciążone jeszcze wysoką ceną, na którą składają się innowatorskie badania, procesy technologiczne, patenty i wdrożenia będą coraz bliższe pacjentom.

5. Literatura

- Benatti CR, Tiera MJ (1999) Phase behavior of synthetic amphiphile vesicles investigated by calorimetry and fluorescence methods. *Thermochimica Acta* 328: 137-142.
- Coelho JF, Ferreira PC, Alves P, Cordeiro R, Fonseca AC, Góis JR, Gil MH (2010) Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *The EPMA Journal* 1:164–209.
- Ebrahim S, Peyman GA (2005) Applications of liposomes in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology* 50: 167-182.
- Ge M, Freed JH (2003) Hydration, Structure, and molecular interactions in the headgroup region of dioleoylphosphatidylcholine bilayers: An electron spin resonance study. *Biophysical Journal* 85: 4023-4040.
- Gomez-Hens A, Fernandez-Romero JM (2005) The role of liposomes in analytical processes. *Trends in Analytical Chemistry* 24: 9-19.
- Heerklotz H, Seelig J (2002) Application of pressure perturbation calorimetry to lipid bilayers. *Biophysical Journal* 82: 1445-1452.
- Huang Ch, Li S (1999) Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1422: 273-307.
- Isrealachvili JN, Mitchell DM (1976) Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions II* 72: 1525-1568.
- Kriechbaum M, Laggner P (1996) States of phase transitions in biological structures. *Progress in Surface Science* 51: 233-261.

- Kusube M, Matsuki H (2005) Thermotropic and barotropic phase transitions of N-methylated dipalmitoylphosphatidylethanolamine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1668: 25-32.
- Lasic DD (1993) *Liposomes: from physics to applications*, Amsterdam, Elsevier, 43-171.
- Lasic DD (1998) Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology* 16: 307-321.
- Olbrich K, Rawicz W (2000) Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. *Biophysical Journal* 79: 321-327.
- Pentak D, Sułkowski WW, Sułkowska A (2008a) Application of NMR and UV spectroscopy in the study of interactions between anticancer drugs and their phospholipid carriers. *Journal of Molecular Structure* 887: 187-193.
- Pentak D, Sułkowski WW, Sułkowska A (2008b) Calorimetric and EPR studies of the thermotropic phase behavior of phospholipid membranes. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 93 (2): 471-477.
- Phillips WT (1999) Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 37: 13-32.
- Ren G, Hu D, Cheng EW (2009) Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal Antimicrobial Agents* 33(6): 587-590.
- Storm G, Crommelin DJA (1998) Liposomes: quo vadis? *Pharmaceutical Science and Technology Today* 1: 19-31.
- Xiuhong Z, Bartel M (2005) Small angle X-ray scattering (SAXS) and differential scanning calorimetry (DSC) studies of amide phospholipids. *Chemistry and Physics of Lipids* 133: 79-88.
- Zhou WI, Ma Y, Yang H (2011) A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Nanomedicine* 6: 381-386.

20. Piezoelektryczność w nas

Piezoelectricity inside us

Ploch Anna, Szymczak-Mazur Lidia, Maciążek-Jurczyk Małgorzata

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny
Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Opiekun naukowy: dr hab. Maciążek-Jurczyk Małgorzata

Pentak Danuta: dpentak@sum.edu.pl

Słowa Kluczowe: prosty i odwrotny efekt piezoelektryczny, DNA, lizozym

Streszczenie

Obserwuje się prosty efekt piezoelektryczny polegający na powstawaniu na przeciwległych ścianach kryształów, poddawanych działaniu naprężeń mechanicznych, ładunków elektrycznych przeciwnego znaku. Efekt odwrotny to zjawisko fizyczne polegające na mechanicznej deformacji kryształu pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. Poddany działaniu pola elektrycznego materiał piezoelektryczny odkształca się. Piezoelektryki mają różne zastosowania, od rezonatorów kwarcowych, przez przetworniki gitarowe po sonary. Wiele materiałów biologicznych jak DNA, kolagen, lizozym czy kości również wykazuje własności piezoelektryczne. Interesujące wydaje się być poznanie istoty tego zjawiska po to aby w przyszłości wykorzystać np. lizozym jako zasilanie implantów czy sensorów umieszczanych w lub na ciele.

1. Wstęp

Źródłem zjawiska piezoelektrycznego jest budowa wewnętrzna kryształów. Ich elektryczne właściwości są silnie związane z symetrią. W morfologii kryształów wyróżnia się trzy główne typy symetrii: symetrię względem punktu, symetrię względem prostej i symetrię względem płaszczyzny. Elementami symetrii są odpowiednio: środek symetrii, oś symetrii i płaszczyzna symetrii. Każdy kryształ charakteryzuje się zespołem elementów symetrii pozwalających zaliczyć go do jednej z 32 grup punktowych nazywanych też klasami symetrii lub klasami krystalograficznymi (Bojarski i in. 2007). Analiza 32 klas symetrii wykazuje, że 11 z nich cechuje obecność środka symetrii. Pozostałe 21 klas stanowią kryształy nie posiadające środka symetrii, zwane niecentrosymetrycznymi. Wykazują one, z wyjątkiem klasy 432, właściwości piezoelektryczne, które uwidaczniają się w postaci polaryzowania się kryształu pod wpływem naprężeń mechanicznych lub jego deformacji w wyniku działania zewnętrznego pola elektrycznego.

Przyłożenie zewnętrznych naprężeń mechanicznych (np. ściskania, rozciągania) do kryształu o strukturze nie posiadającej środka symetrii prowadzi do indukowania na jego powierzchni ładunków elektrycznych. Efekt ten po raz pierwszy zaobserwowany przez braci Curie został nazwany zjawiskiem piezoelektrycznym prostym. Polaryzacja P_m powstała w kryształach w wyniku działania zewnętrznych naprężeń σ_{ij} , jest liniową funkcją naprężenia, stąd równanie definiujące prosty efekt piezoelektryczny ma postać:

$$P_m = d_{mij} \sigma_{ij} \quad m, i, j = 1, 2, 3$$

gdzie: P_m oznacza zmianę składowej polaryzacji elektrycznej,

d_{mij} - współczynnik proporcjonalności nazywany współczynnikiem piezoelektrycznym, pozwalającym w sposób ilościowy określić własności piezoelektryczne materiału.

Własność kryształu polegająca na jego deformacji w zewnętrznym polu elektrycznym określana jest mianem odwrotnego zjawiska piezoelektrycznego i można je opisać za pomocą równania:

$$\eta_{ij} = d_{mij} E_m \quad m, i, j = 1, 2, 3$$

gdzie: η_{ij} - składowe tensora odkształcenia kryształu,

E_m - składowe natężenia pola elektrycznego

d_{mij} - składowe tensora modułów piezoelektrycznych.

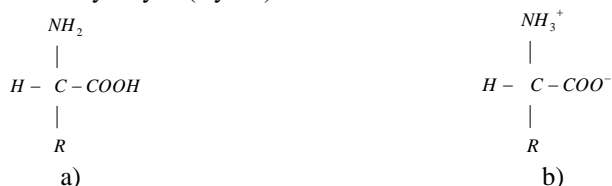
Najbardziej znanym piezoelektrykiem jest kryształ kwarcu, jednak materiały perowskitowe jak np. BaTiO₃ czy Pb(ZrTi)O₃, wykazują silniejszy efekt piezoelektryczny (50 – 100 razy). Piezoelektryki wykorzystywane są w różnych dziedzinach nauki i techniki. Stosuje się je np. w elementach elektronicznych (filtry, rezonatory), transformatorach piezoelektrycznych, w zapalarkach do gazu, zapalniczkach czy wagach analitycznych, do sterowania pomiarem w mikroskopach STM czy AFM. Mają zastosowanie w sondach USG, gdzie umożliwiają wytworzenie fali akustycznej i rejestrację echa, pochodzącego od granic struktur o różnych wartościach impedancji akustycznych wzdłuż jednego kierunku.

Wiele biologicznych materiałów jak kości, ścięgna (zwłaszcza kolagen), aminokwasy czy kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) wykazują właściwości piezoelektryczne w skali makroskopowej. Odkąd wykryto piezoelektryczność w materiałach biologicznych pojawiło się określenie *biopiezoelektryczność* jako zdolność biomateriałów do zamieniania energii mechanicznej na elektryczną. Występowanie własności piezoelektrycznych w żywych organizmach sugeruje, iż może to być efekt fizjologiczny. Poniżej przedstawione zostaną, w oparciu o dane literaturowe, próby wyjaśnienia przyczyn występowania własności piezoelektrycznych w podstawowych materiałach biologicznych, jakimi są aminokwasy, DNA czy kolagen, ale także w złożonym systemie, jakim są kości.

2. Opis zagadnienia i przegląd literatury

2.1 Aminokwasy

Aminokwasy to związki o dwóch podstawowych grupach funkcyjnych – karboksylowej i aminowej, które występują jako cegiełki budulcowe peptydów i białek w organizmach żywych. Tylko 20 spośród około 300 poznanych aminokwasów występuje powszechnie w białkach (aminokwasy białkowe). Każdy z nich (z wyjątkiem proliny) cechuje się jednakowym układem podstawników przy węglu α. Są to grupa aminowa, grupa karboksylowa, atom wodoru i łańcuch boczny o różnej budowie, oznaczany symbolem R. W fizjologicznym pH większość grup karboksylowych jest zdysocjowana, tworzy anion: -COO⁻, a większość grup aminowych wiąże H⁺, tworząc kation: -NH₃⁺. Dominującą formą aminokwasu jest więc jon obojnaczy, będący nośnikiem przeciwstawnych ładunków elektrycznych (Rys. 1).



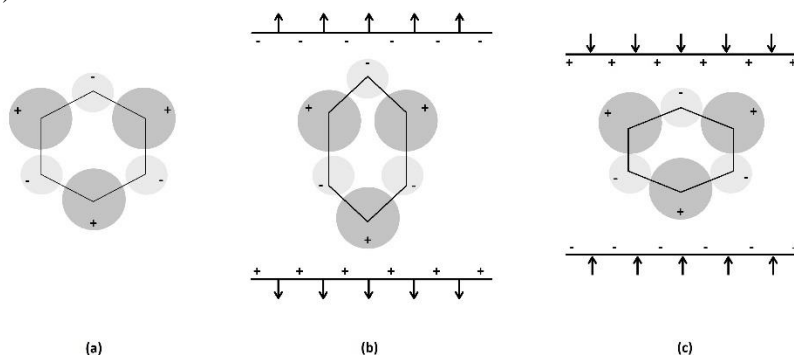
Rys. 1. Struktura aminokwasu w postaci niezjonizowanej a) i formie jonu obojnaczego b) (Stryer 1999).

Do najbardziej charakterystycznych właściwości chemicznych aminokwasów należy ich zdolność do reagowania między sobą i wiązania się wiązaniami peptydowymi (odłącza się wtedy cząsteczka wody). Grupa karboksylowa jednego aminokwasu w reakcji z grupą aminową drugiego aminokwasu tworzy dipeptyd. Połączenie kilku do kilkunastu aminokwasów daje oligopeptyd. Dłuższe peptydy, zawierające po kilkadziesiąt reszt aminokwasowych to polipeptydy (Bańkowski 2006).

Kryształy aminokwasów można hodować z nasyconego roztworu wodnego a ich struktura krystalograficzna może być wyznaczana metodą dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego lub za pomocą techniki rezonansu magnetycznego. Ponieważ we wszystkich aminokwasach-poza glicyną-węgiel α z grupą aminową jest węglem asymetrycznym, związki te wstępują w dwóch odmianach enantiomorficznych, będących względem siebie lustrzanymi odbiciami (symetria chiralna). Wg. międzynarodowej notacji grup przestrzennych Hermanna-Mauguina, kryształy takie mogą należeć do grup 1-4, 6, 222, 32, 422, 622, 23 i 432, i z definicji nie posiadają środka symetrii, są niecentrosymetryczne a jako takie mogą wykazywać własności piezoelektryczne. W roku 1970

Vasilescu wraz ze współautorami po raz pierwszy opublikowali pracę dotyczącą rezonansu piezoelektrycznego w sproszkowanych aminokwasach. Późniejsze prace (Lemanov i in. 2011) dotyczyły kryształów aminokwasów i ich związków. Stosując metodę spektroskopii jądrowego rezonansu kwadrupolowego (NQR) przykładano do kryształów impulsy napięcia o wysokiej częstotliwości, wzbudzając w nich wibracje, które następnie były mierzone. Średnia dokładność stosowanych technik była równa 10^{-4} piezoelektrycznej odpowiedzi obserwowanej dla kryształu kwarcu. W większości prac piezoelektryczna odpowiedź aminokwasów była podawana w jednostkach umownych. Jednakże Lemanov badając piezoelektryczne własności fosforanu L-argininy, wyznaczył wartość współczynnika piezoelektrycznego d_{25} równego 8.6 pC/N (Lemanov 2000).

Piezoelektryczne własności aminokwasów związane są z ich strukturą krystalograficzną tak jak to ma miejsce w przypadku ciał stałych. Jak pokazano na rys. 2 aminokwasy, które nie posiadają środka symetrii pod wpływem naprężenia mogą wykazywać własności piezoelektryczne (Fukada i Ando 1972).



Rys. 2. Mechanizm piezoelektryczności w kryształach aminokwasów: w niecentrosymetrycznym kryształach (a) pod wpływem rozciągania (b) lub ściskania (c) pojawia się polaryzacja na skutek prostego zjawiska piezoelektrycznego (Stapleton i in. 2016).

2.2 Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA)

DNA jest polimerem zbudowanym z deoksyrybonukleotydów. Każdy nukleotyd składa się z zasady azotowej (pochodne puryny lub pirymidyny), cukru oraz jednej lub więcej grup fosforanowych. Nośnikiem informacji genetycznej są zasady zawarte w cząsteczkach DNA, podczas gdy reszty cukrowe i fosforanowe pełnią rolę strukturalną. Skład nukleotydowy DNA jest stały i charakterystyczny dla danego gatunku, nie zależy od tkanki, narządu, wieku, stanu odżywienia ani warunków środowiskowych. Pokrewne gatunki zwierają podobne DNA. Piezoelektryczność DNA po raz pierwszy została zbadana przez Duchesne i współpracowników w 1955r. W przeprowadzonym eksperymencie próbki DNA umieszczano w elektrostatycznym superreakcyjnym generatorze, obserwowano absorpcję linii w 30 MHz, co wiązano z mechanicznymi drganiami wytwarzanymi w próbce DNA wskutek odwrotnego zjawiska piezoelektrycznego (Duchesne i in. 1955; Duchesne i in. 1960). Te wczesne eksperymenty miały bardziej jakościowy wymiar, niemniej jednak były obiecujące. Fukada i in. przeprowadzili ilościowe pomiary zorientowanych warstw DNA z grasicy cielęcej stosując techniki oparte na prostym zjawisku piezoelektrycznym. Dla kilku różnych temperatur, próbki DNA poddawane były naprężeniom ścinającym. Typowe wartości odpowiedzi piezoelektrycznej były rzędu $\sim 0.003\text{pC/N}$. Tak małe wartości odpowiedzi piezoelektrycznej związane były z niskim stopniem krystaliczności, co wykazały pomiary dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego. Piezoelektryczność makrocząsteczki DNA związana jest z orientacją grup polarnych zasad DNA pod wpływem przykładanego naprężenia.

Jak wiadomo względna wilgotność wpływa na własności piezoelektryczne biomateriałów. W celu wyjaśnienia tego efektu zbadano proste i odwrotne zjawisko piezoelektryczne dla zorientowanych warstw DNA uzyskanych ze spolimeryzowanego łosiosa (Ando i Fukada 1976). Sól sodowa DNA może istnieć w trzech różnych konfiguracjach w zależności od zawartości soli

i względnej wilgotności. Zawartość soli była stała (6-7 % wagi) zmieniano natomiast wilgotność. Powyżej 85% względnej wilgotności próbki DNA przyjmowały strukturę heliakalną postaci B. Pomiędzy 75-85% próbki miały postać A. Poniżej 55% względnej wilgotności próbki wykazywały strukturę nieuporządkowaną. Badania wykazały, że próbki DNA z niską zawartością wody wykazywały własności piezoelektryczne, mimo, iż wydawało się, iż to nieuporządkowana struktura próbek może przyczynić się do braku występowania piezoelektryczności. Badania przeprowadzone na próbkach jednoniciowego DNA wykazywały podobne rezultaty do odwodnionych próbek, dlatego wysunięto wniosek, że efekt piezoelektryczny w zdenaturowanym DNA pojawia się na wskutek orientacji łańcucha głównego. W przypadku uwodnionej podwójnej nici DNA struktura jest stabilizowana przez absorpcję cząsteczek wody. Przyczyną występowania zjawiska piezoelektrycznego w tych próbkach DNA są dipole zasady purynowej i pirymidynowej, zawierające grupy polarne CO i NH. Reorientacja tych grup polarnych z reorientacją łańcucha głównego były przyczyną pojawiania się piezoelektryczności w uwodnionych próbkach DNA.

2.3 Fosfolipidy

Lipidy stanowią ważny składnik budulcowy błon komórkowych będących elementami strukturalnymi, oddzielających komórkę od jej otoczenia i dzielącymi wewnątrz komórki na liczne przedziały. Elementy składowe błon pełnią funkcje transportowe, zapewniają selektywność oraz odpowiedni kierunek transportu. Różne błony biologiczne wykazują ten sam schemat budowy. Składają się najogólniej z lipidów i białek. Wśród składników lipidowych najobficiej występują fosfolipidy. Charakteryzują się one obecnością polarnej, hydrofilnej „głowy” i hydrofobowego „ogona”. Cząsteczki o właściwościach zarówno hydrofilnych, jak i hydrofobowych określa się jako amfipatyczne (Bańkowski 2006). Wszystkie błony biologiczne są zbudowane według tego samego schematu. Ich zasadniczy trzon stanowią cząsteczki lipidów ułożonych w dwie, ściśle do siebie przylegające, przeciwstawnie zorientowane warstwy lipidowe. Towarzyszą im białka błonowe. Podwójna warstwa lipidowa stwarza barierę ograniczającą przepuszczalność błon, natomiast białka pełnią funkcje receptorowe, rozpoznawcze, enzymatyczne, transportowe i inne.

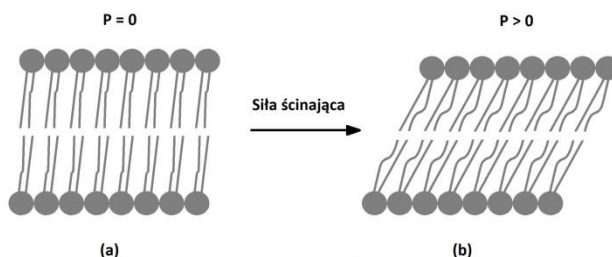
Fosfolipidy podobnie jak aminokwasy cechuje chiralność. Chiralność biologicznych materiałów jest często pomijana, przeciwieństwo do chiralnych ciekłych kryształów, gdzie ma to ogromne znaczenie z punktu widzenia zastosowań. Rozpatrując własności fosfolipidów jak ciekłych kryształów odkryto w nich własności piezoelektryczne (Jakli i in. 2008).

Ciekłe kryształy stanowią pośredni stan materii, któremu brakuje trójwymiarowego uporządkowania charakterystycznego dla kryształów a regularna budowa sieci krystalicznej sprowadza się tylko do pewnych obszarów, które względem siebie przesuwają się jak elementy cieczy. Taka budowa i związane z nią cechy cieczy, czyli brak sztywnej sieci krystalicznej powoduje brak sprężystości kryształu i jego płynność. Faza ciekłokrystaliczna posiada unikalne właściwości elektryczne, optyczne oraz wykazuje uporządkowanie dwuwymiarowe. Jest stanem, który łączy właściwości cieczy i ciała krystalicznego. Te nadzwyczajne własności pozwalają na mnogość zastosowań m.in. w różnego rodzaju wyświetlaczach stosowanych np. w kalkulatorach, zegarkach czy monitorach LCD. Kryształy ciekłokrystaliczne można podzielić na dwie główne grupy: smektyki i nematyki. Faza nematyczna jest najprostszą fazą ciekłego kryształu, gdzie wszystkie molekuly są w przybliżeniu równoległe względem siebie, lecz nie są zorganizowane w płaszczyznę. Nematyk jest optycznie jednoosiowy. Fazy smektyczne zbudowane są z równoległe uporządkowanych cząsteczek ułożonych w przylegające warstwy. Cząsteczki w fazach smektycznych mogą być ustawione prostopadle jak w fazie SmA lub skośnie jak w fazie SmC względem płaszczyzn uporządkowania smektycznego. Wyróżnia się również smektyki chiralne oznaczane symbolem Sm* (SmA*) oraz chiralne „skręcone” (np. SmC*), w których kąt azymutalny zamienia się przy przechodzeniu od warstwy do warstwy, co powoduje, że kierunek wersora zakreśla helisę (Genes i Prost 1993).

Odwrotny efekt piezoelektryczny obserwuje się w smektykach chiralnych po przyłożeniu pola elektrycznego prostopadle do direktora. Jest on związany z chiralnością związków i jest obecny nie tylko w ortogonalnych fazach smektycznych jak np. SmA* ale także w pochylonych chiralnych smektykach. Polega on na zmianie kąta pochylenia molekuł pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego. Pole to wywiera wpływ na rotację molekuł wokół ich długich osi powodując

ustawienie się poprzecznych momentów dipolowych wzdłuż tego pola, wywołując tym zmianę polaryzacji próbki, a poprzez jej sprzężenie z kątem pochylenia molekuł i on ulega nieznacznej zmianie (Meyer 1969).

Biorąc pod uwagę silne podobieństwa między chiralnymi ciekłymi kryształami i chiralnymi fosfolipidami ustalono (Harden i in. 2009), że dwuwarstwa fosfolipidowa może być rozpatrywana jako faza SmA^* o symetrii D_∞ lub faza SmC^* o symetrii C_2 , obie fazy wykazują piezoelektryczność pod wpływem naprężenia ścinającego (Rys. 3). Pod wpływem naprężenia ścinającego fosfolipidy w fazie SmA^* ulegają pochyleniu tak więc, polaryzacja jest prostopadła do płaszczyzny przechyłu. Siła ścinająca przyłożona do molekuł w fazie SmC^* zaburza symetrię obrotową polaryzacji i daje odpowiedź piezoelektryczną. Badane próbki syntetycznie otrzymanych fosfolipidów wykazywały polaryzację $300nC/cm^2$ (Harden i in. 2009).



Rys. 3. Ciekłokrystaliczne własności dwuwarstwy fosfolipidowej (a) piezoelektryczność pojawia się kiedy dwuwarstwa jest pod działaniem siły ścinającej (b) (Stapleton i in. 2016).

2.4 Białka fibrylarne (kolageny)

Białka fibrylarne to białka o strukturze włóknkowej, o wydłużonym kształcie mające stosunek długości do szerokości $>10:1$. Należy do nich fibrynogen-białko krzepnięcia krwi, białka strukturalne jak α -keratyna, kolagen, fibroina.

Występowanie własności piezoelektrycznych wykazano zarówno dla kolagenu, keratyny czy fibroiny. Jednakże własności piezoelektryczne kolagenu były i nadal są szerzej badane z uwagi na jego możliwy udział w piezoelektryczności kości. Białko to występuje w większości tkanek i narządów m.in. w kościach, chrząstkach, skórze, więzadłach, ścięgnach, rogówce. Jego podstawowym zadaniem jest utrzymanie integralności strukturalnej i sprężystości tkanki łącznej oraz jej wytrzymałości na rozciąganie. Kolagen charakteryzuje się unikatową strukturą bogatą w aminokwasy, takie jak glicyna i prolina oraz hydroksyprolina. Głównym elementem struktury kolagenów są trzy lewoskrętne polipeptydowe łańcuchy, nawijające się wokół siebie i tworzące prawoskrętną konformację liny superhelisowej, która utrzymywana jest dzięki obecności wiązań wodorowych (Czubak i Żbikowska 2014). Makrocząsteczki kolagenu łączą się tworząc fibryle, wykazujące poprzeczne prążkowanie o sekwencji co 64nm. Kolageny występujące w kościach tworzą heksagonalne układy sieciowe wewnątrz fibryli. Ta złożona struktura kolagenów sprawia, że niezwykle trudno jest określić przyczynę piezoelektryczności kolagenu. Wiąże się ją z heksagonalnymi układami sieciowymi kolagenu wewnątrz fibryli, którym może być przypisana grupa symetrii C_6 . Dla tej grupy symetrii własności piezoelektryczne mogą pojawić się pod wpływem naprężeń ścinających. Zakłada się, że własności piezoelektryczne mogą pojawiać się na wskutek polaryzacji lub przemieszczenia wiązań wodorowych w polipeptydowych łańcuchach poddawanych odpowiednio naprężeniom ścinającym lub działaniu pola elektrycznego (Fukada i Yasuda 1957; Yasuda i Fukada 1964). Wartości współczynnika piezoelektrycznego d_{14} zmierzonego dla kolagenu wynosi $\sim 2,64$ pC/N. Stosując technikę PFM (Piezoresponce Force Microscopy) dla pojedynczych fibryli uzyskano w nanoskali współczynnik piezoelektryczny równy około $1pm/V$ (Denning i in. 2014).

2.5 Białka globularne (Lizozym)

Lizozym należy do białek globularnych. Jest to białko występujące u zwierząt, roślin, bakterii i wirusów. Można je znaleźć w ziarnach neutrofilów, makrofażów, w surowicy krwi, ślinie,

mleku, miodzie, we łzach, śluzie nosa, w wielu tkankach i wydzielinach pochodzenia zwierzęcego oraz w białku jaj. Ze wszystkich przebadanych materiałów to właśnie białko jaja kurzego stanowiło najbogatsze źródło lizozymu. Jest bakteriobójczym enzymem posiadającym zdolność hydrolizy peptydoglikanu budującego ściany komórkowe bakterii. Ze względu na swoje właściwości oraz możliwość pozyskiwania z taniego surowca (białko jaja kurzego) lizozym znajduje zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym (Chang i in. 2000).

Z punktu widzenia wyznaczania własności piezoelektrycznych lizozym jest idealnym kandydatem. Jest stabilnym białkiem i krystalizuje w postaci tetragonalnej, rombowej czy heksagonalnej. Do badania własności piezoelektrycznych wykorzystano kryształ o symetrii układu tetragonalnego. Kryształy te wykazują grupę symetrii 422 i własności piezoelektryczne pojawiają się tylko pod wpływem naprężeń ścinających. Stosując technikę PFM mierzono proste zjawisko piezoelektryczne. Średnia wartość współczynnika piezoelektrycznego dla tetragonalnego kryształu lizozymu wynosiła 3.16 pC/N. Własności piezoelektryczne tetragonalnego kryształu lizozymu wynikają z faktu, iż należy on do grupy kryształów niecentrosymetrycznych (Stapleton i in. 2017).

2.6 Kości

Pojawianie się potencjałów elektrycznych podczas zginania kości suchej zaobserwował Yasuda (Yasuda 1977). Wskutek zginania kości długich powierzchnia rozciągana staje się elektrododatnia, a ściskana elektroujemna. Zaobserwowano również pojawianie się odwrotnego zjawiska piezoelektrycznego. Późniejsze badania potencjałów elektromechanicznych ujawniły niejednokrotnie anomalne własności piezoelektryczne w suchej kości. Pod wpływem odkształcenia powierzchnia rozciągana przybierała ujemny potencjał w stosunku do powierzchni ściskanej (Johnson 1980). Potencjał elektryczny indukujący się w suchej kości jest stały w czasie trwania obciążenia, a jego wielkość jest wprost proporcjonalna do wielkości obciążenia. W przypadku mokrej kości skokowe obciążenie powoduje wygenerowanie potencjału elektromechanicznego, który po osiągnięciu maksymalnej wartości ulega relaksacji do wartości początkowej, a następnie pozostaje stały w czasie trwania obciążenia (Basset i Becker 1962). W momencie zdjęcia obciążenia powstaje potencjał o tej samej wartości, lecz przeciwnym znaku w stosunku do powstałego podczas zadawania obciążenia. Następnie potencjał ten ulega relaksacji osiągając wartość początkową. W żywej kości oprócz zmiennych potencjałów elektromechanicznych występuje stały potencjał spoczynkowy, który jest wynikiem aktywności bioelektrycznej komórek otoczenia. Potencjał spoczynkowy trzonu kości piszczelowej jest dodatni w stosunku do nasady. Część przynasadowa charakteryzuje się największym ujemnym potencjałem. W wyniku złamania potencjał spoczynkowy kości przesuwają się w stronę potencjałów ujemnych, a w miejscu urazu pojawia się tzw. potencjałem złamania (ujemny) (Szewczenko 2005).

Stosując klasyczną teorię piezoelektryczności kryształów próbowano opisać polaryzację elektryczną tkanki kostnej w następstwie jej sprężystego, mechanicznego odkształcenia. Wyznaczone w oparciu o tą teorię wyniki, ze względu na złożoną strukturę kości, były w większości sprzeczne z wynikami otrzymanymi doświadczalnie. Interesującą hipotezę generacji potencjałów elektromechanicznych w kości przedstawił Korostoff. Wg. niego równoległe rozmieszczenie kolagenu w płytkach kostnych powoduje powstanie domen piezoelektrycznych o zmieniających się przeciwnie wektorach polaryzacji. Antyrównoległe ustawienie domen piezoelektrycznych w sąsiadujących płytkach nieodkształconej kości jest niestabilne. Pod wpływem odkształceń mechanicznych możliwa jest zmiana orientacji domen, z antyrównoległej na równoległą, w sąsiadujących płytkach, skutkiem czego jest generacja potencjału (Korostoff 1979). Jednakże, żadna ze zmodyfikowanych teorii opisująca zjawiska piezoelektryczne w kości nie została jednoznacznie eksperymentalnie potwierdzona. Dopiero łącząc mechanizm piezoelektryczny oraz elektrokinetyczny generacji potencjałów elektromechanicznych można wyjaśnić przebieg potencjału w mokrej kości, powstały w wyniku obciążenia i odciążenia. Badania przeprowadzone przez Yasudę, mające na celu określenie wpływu naprężeń ściskających na rozwój tkanki kostnej, doprowadziły do odkrycia zjawiska piezoelektrycznego w kości. Zwróciło to natomiast uwagę badaczy na elektryczność jako kolejny czynnik umożliwiający indukcję kostniny. W oparciu o dotychczas przeprowadzane badania można stwierdzić, że elektrostymulacja zrostu kostnego prowadzi do: przyspieszenia procesów

naprawczych, wzrostu unaczynienia kostniny, większej wytrzymałości kostniny oraz zahamowania rozwoju drobnoustrojów. Jednakże, pomimo wieloletnich badań nieznanym pozostaje mechanizm aktywizacji wzrostu kostnego za pomocą elektrostymulacji (Szewczenko 2005).

3. Podsumowanie

Od aminokwasów do kości, występowanie piezoelektryczności w żywych organizmach wskazuje, że być może jest to uniwersalna cecha. Jednakże zrozumienie i wyjaśnienie tego fenomenu wciąż stanowi wyzwanie dla naukowców. Teoria ta byłaby interesująca zwłaszcza z punktu widzenia biomedycznych zastosowań. Na przykład piezoelektryk zbudowany z lizozymu–enzymu naturalnie występującego w organizmie–mógłby w przyszłości znaleźć zastosowanie przy zasilaniu implantów czy sensorów umieszczanych w ciele lub na jego powierzchni. W takich wypadkach prąd mógłby być wytwarzany dzięki ruchom naszego ciała. A może kontrolowane uwalnianie leków w organizmie wykorzystujące lizozym jako zasilanie pompy, zbierającej energię z otoczenia (Stapleton i in. 2017)? Na razie to tylko pomysły, ale być może przyszłe eksperymenty pozwolą na zrozumienie mechanizmów rządzących biopiezoelektrycznością i pozwolą na ich realizację.

4. Literatura

- Ando Y, Fukada E (1976) Piezoelectric properties of oriented deoxyribonucleate films. *J.Polym.Sci.Polym.Phys. Ed. 14(1): 63-79*
- Bańkowski E (2006) *Biochemia. MedPharm Polska Wrocław*
- Basset C., Becker O (1962) Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress (1962), *Science 137:1063*
- Bojarski Z., Gigla M., Stróż K., Surowiec M (2007) *Krystalografia. Podręcznik wspomagany komputerowo. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN*
- Chang H-M., Yang C-C., Yung C-C (2000) Rapid separation of lysozyme from chicken egg white by reductants and thermal treatment. *J.Agric.Food Chem., 48*
- Czubak K., Żbikowska H. (2014) Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów. *Ann.Acad Med.Siles. 68(4): 245–254*
- Denning D., Paukshto M., Habelitz S. i in. (2014) Piezoelectric properties of aligned collagen membranes. *J.Biomed.Mater.Res. B Appl.Biomater. 102(2):284-292*
- Duchesne J., Monflis A (1955) Radio-frequency vibrational absorption in piezoelectric crystals. *J.Chem.Phys. 23(4): 762*
- Duchesne J., Depireux J., Bertinchamps A. i in. (1960) Thermal and electrical properties of nucleic acids and proteins. *Nature 188: 405-406*
- Fukada E., Yasuda I (1957) On the piezoelectric effect of bone. *J.Phys.Soc.Jpn. 12(10):1158-1162*
- Fukada E., Ando Y (1972) Piezoelectricity in oriented DNA films. *J. Polym. Sci.Part B Polym.Phys. 10(3): 565-567*
- Gennes P., Prost J (1993) *The physics of liquid crystals. Oxford Science Publications, Oxford*
- Jakli A., Harden J., Notz C. i in. (2008) Piezoelectricity of phospholipids: A possible mechanism for mechanoreception and magnetoreception in biology. *Liquid Crystals 35(4): 395-400*
- Johnson M., Chakkalakal D., Harper R. i in. (1980) Comparison of the electromechanical effects in wet and dry bone. *J.Biomech., 13: 437-442.*
- Lemanov V (2000) Piezoelectric and pyroelectric properties of protein amino acids as basics materials of soft state physics. *Ferroelectrics 238(1): 211-218*
- Lemanov V., Popov S., Pankova G (2011) Piezoelectricity in protein amino acids. *Phys.Solid State 53(6): 1191-1193*
- Meyer R (1969) Piezoelectric effects in liquid crystals. *Phys.Rev.Lett. 22:918-921*
- Stapleton A., Noor M., Soulimane T. i in. (2016) *Physiological role of piezoelectricity in biological building blocks. in Electrically active materials for medical devices, Tofail A., Bauer J.Imperial College Press, London 2016*
- Stapleton A., Noor M., Sweeney J (2017) The direct piezoelectric effect in the globular protein lysozyme. *App.Phys.Letters 111: 142902*

Stryer L (1999) Biochemia. Wydawnictwo naukowe PWN Warszawa

Szewczenko J (2005) Zjawiska elektryczne w kościach długich. Przegląd elektrotechniczny 12: 94-97

Vasilescu D., Cornillon R., Mallet G (1970) Piezoelectric resonances in amino-acids. Nature 225(5233): 635

Yasuda J., Fukada E (1964) Piezoelectric effects in collagen. Jpn.J.Appl.Phys. 3(2):117

Yasuda I (1977) The classic fundamental aspects of fracture treatment. Clin.Orthop. 124: 5

21. Wpływ autorytetu na posłuszeństwo i skłonności do oszustwa

The influence of authority on obedience and the tendencies to cheat

Klaudia Weronika Misiołek, Bartek Augustyn

Studenckie Koło Naukowe Fizjologów „Homunculus”
przy Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka Uniwersytetu Gdańskiego

Klaudia Weronika Misiołek: kl.misiolek@gmail.com

Słowa Kluczowe: Etyka behawioralna, psychologia szczerości, hierarchia społeczna

Streszczenie

Celem projektu było zbadanie wpływu autorytetu na ludzkie zachowanie oraz skłonności do oszustwa. Główną inspiracją do przeprowadzenia badania był eksperyment Stanleya Miligrama, który dał dowód na to, iż niezależnie od osobowości, ludzie podporządkowują się autorytetowi. Niniejsze badanie pozwoliło określić wpływ autorytetu, jako czynnika przeciwdziałającego oszustwu w przypadku obecności lub braku czynnika prowokującego do oszustwa. Eksperyment został przeprowadzony z udziałem 38 osób w wieku 19-25 lat. Polegał na wypełnieniu przez uczestników testu osobowości, a następnie odebraniu jednego biletu w ramach nagrody. Omówienie zasad testu zostało przeprowadzone przez Profesora uczącego na Uniwersytecie lub przez studenta, którzy następnie opuszczali salę, w której odbywał się eksperyment, pozostawiając uczestników doświadczenia bez nadzoru. W doświadczeniu dodatkowo występował student w roli oszusta, który raptownie przerywał pisanie testu i na oczach innych uczestników brał kilka nagród, po czym opuszczał salę. Zostały utworzone cztery grupy: grupa z udziałem autorytetu w obecności oszusta, grupa z udziałem studenta (osoba bez oznak autorytetu) w obecności oszusta oraz na każdą grupę została utworzona grupa kontrolna bez udziału oszusta. Badanie zostało nagrane ukrytą kamerą.. Ostatecznym wnioskiem płynącym z interpretacji wyników doświadczenia jest potwierdzenie założenia o tym, że istotnym czynnikiem wpływającym na skłonność do oszukiwania (liczbę pobieranych biletów) była obecność autorytetu lub jej brak. Obecność autorytetu ograniczała skłonność do oszustwa. Demoralizujący wpływ oszusta uwidaczniał się tym bardziej, im później osoba badana opuszczała salę. Wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy liczbą pobranych biletów, a kolejnością opuszczania sali w grupach, w których obecny był oszust. W przypadku obecności autorytetu korelacji takiej nie zauważono, co wskazywać może z jednej strony na ograniczającą oszustwo rolę autorytetu, a z drugiej strony ograniczającą oszustwo rolę dużej liczby osób będących potencjalnymi świadkami oszustwa. Największa skala oszustwa uwidoczniła się wśród osób prowokowanych przez oszusta przy braku obecności autorytetu i opuszczających salę w ostatniej kolejności.

1. Wstęp

Człowiek jest istotą społeczną, wchodzącą w skomplikowane relacje emocjonalne nie tylko z innymi ludźmi, ale także ze zwierzętami, przedmiotami, a nawet miejscami. Jednym z wytworów naszej skomplikowanej psychiki jest posłuszeństwo; z definicji: „w ludzkim zachowaniu, forma społecznego wpływu, w której osoba podporządkowuje się wyraźnym wskazówkom czy poleceniom od osoby obdarzonej władzą czy autorytetem” (Colman i in. 2009). Oznacza to, że do występowania zjawiska posłuszeństwa wymagany jest czynnik w postaci autorytetu.

W rzeczywistości posłuszeństwo i nieposłuszeństwo może zachodzić tylko w strukturze hierarchicznej – to w zasadniczo odróżnia je od konformizmu (Miligram 1974). Ten typ oddziaływań hierarchicznych posiada ogromne znaczenie w obliczu całego społeczeństwa na poziomie ekonomicznym czy politycznym. Rozpatrując problematykę z perspektywy jednostki – gdy jest ona słabiej kontrolowana, to znacząco będąca pod mniejszym wpływem autorytetu okazuje się, że więcej oszukuje (Shu i in. 2009). Ludzie podejmują się różnych działań w sytuacji, gdy mają możliwość oszukiwania i rozumieją występowanie konsekwencji dla całej grupy: „społeczeństwo dzieli się na dwie grupy, z których jedna wykorzystuje drugą poprzez oszustwo, co prowadzi do znacznego

wzrostu globalnej nierówności” (Antonioni i in. 2016). Logicznym więc jest tworzenie przez społeczeństwa instytucji kontrolujących oszustwo, jednak nie zawsze kontrola jest udana. Jednym z wyznaczników postępowania jest wewnętrzna uczciwość, która powstrzymuje ludzi przed oszustwami i naruszaniem zasad. Udowodnione zostało, że w populacjach w których występowało niskie naruszenie zasad, wewnętrzna uczciwość była największa (Gächter i in. 2016). Co ciekawe ludzie współpracują ze sobą nieprzerwanie zarówno w strategii oszustwa jak i uczciwości. Do chwili ujawnienia oszusta jest on w stanie czerpać takie same a nawet większe korzyści z sytuacji niż w przypadku osoby nie oszukującej. W momencie braku kontroli wzrastają szanse na zawładnięcie społeczeństwem przez oszustów (zmniejsza się ilość uczciwych osób) dlatego tak istotnym narzędziem prewencyjnym jest odpowiedni nadzór (Martinez-Vaquero i in. 2013).

Posłuszeństwo zostało zdefiniowane jako jednoczesna utrata indywidualności w poczuciu solidarności i chęci ochrony innych członków społeczeństwa. Natomiast nieposłuszeństwo wiąże się z brakiem zgodności z regulacjami tworzonymi przez autorytet, często charakteryzuje się wysokim stopniem refleksji na poziomie osobistym i wspólnotowym. Generalnie nieposłuszeństwo jest nacechowane negatywnie, lecz w niektórych sytuacjach lub kontekstach posłuszeństwo jest równie ważne jak i jego nieprzestrzeganie – przykładowo wykorzystanie go jako narzędzia obywatela do strajkowania przeciw aspektom wymagającym zmiany w państwie (Fattori i in. 2015).

Niniejszy artykuł przedstawia wpływ autorytetu na posłuszeństwo i skłonności do oszustwa. Dokonana zostanie analiza wpływu czynnika wywołującego zachowania nie pożądane w postaci oszusta na grupę badanych przy jednoczesnej obecności lub braku autorytetu.

2. Materiały i Metodyka

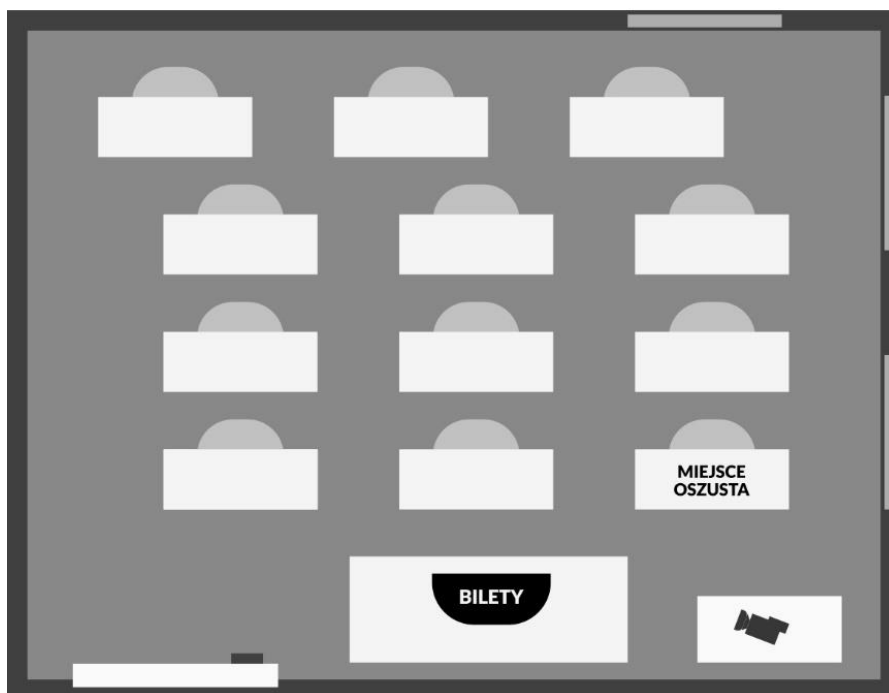
W badaniu wzięło udział 38 uczestników w wieku 19-25 lat.

Uczestnicy doświadczenia mieli za zadanie napisać test, a po jego ukończeniu odebrać nagrodę w postaci biletu do kina. Autorytet (profesor) lub osoba bez oznak autorytetu (student) zapoznawali uczestników z zasadami testu. Autorytet i student prosili uczestników, by po zakończeniu testu odebrali tylko jeden bilet, po czym opuszczali salę. Występowała dodatkowo osoba w roli oszusta, która ostentacyjnie brała dużą ilość biletów, a następnie opuszczała salę. Za pomocą filmu nagranej ‘ukrytą kamerą’ określano liczbę biletów pobranych przez poszczególne osoby badane (Ryc.1). Czas pisania testu był nieograniczony, po jego napisaniu i odebraniu biletu uczestnicy opuszczali salę. Nagroda (bilety do kina) zostały umieszczone w przezroczystej misie, w miejscu najbardziej widocznym przez wszystkich badanych. Osoba będąca oszustem miała za zadanie zachowywać się w rozprasający sposób (głośno odsunąć krzesło podczas wstawiania, stawiać głośne kroki), aby zwrócić na siebie uwagę uczestników badania, wziąć garść biletów i opuścić salę (jako pierwsza osoba, aby wpłynąć na wszystkich uczestników badania.



Ryc. 1. Miejsce eksperymentu przedstawione z perspektywy ukrytej kamery. Kołem oznaczone zostały bilety pobrane z misy przez uczestnika badania.

Osoba ta zajmowała ławkę oznaczoną „miejsce oszusta” (Ryc.2). Ławki zostały ustawione w taki sposób, aby kamera była w stanie ująć nie tylko misę z biletami, ale także uczestników podczas badania w celu dodatkowego zbadania reakcji na działanie oszusta.



Ryc. 2. Schemat sali eksperymetalnej. Zaznaczone zostało miejsce jakie zajmował oszust podczas doświadczeń, miejsce misy z biletami oraz ukryta kamera. Zastosowanie danego układu ławek.

Test, który pisali uczestnicy badania opierał się na pięcioczynnikowym modelu osobowości (FFM ang. five factor model) i miał dodatkowo za zadanie sprawdzić czy posłuszeństwo wobec autorytetu oraz skłonności do oszustwa zależą od osobowości.

Utworzone zostały 4 grupy:

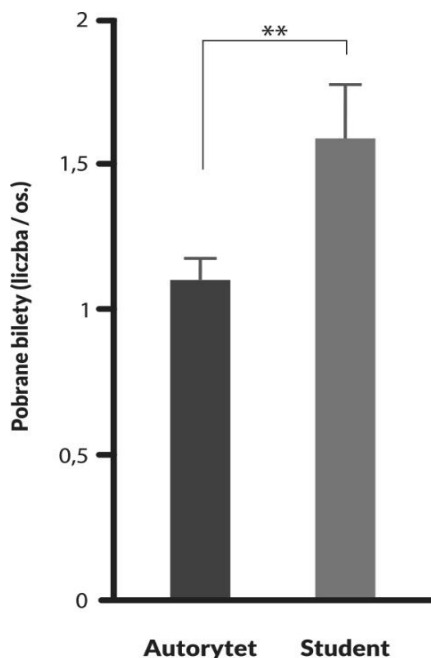
- (1) osoby poddane działaniu autorytetu oraz prowokacji ze strony oszusta (9 osób);
- (2) osoby poddane działaniu autorytetu bez prowokowania do oszustwa (12 osób);
- (3) osoby nie poddane działaniu autorytetu, ale prowokowane ze strony oszusta (10 osób);
- (4) osoby nie poddane ani działaniu autorytetu, ani nie prowokowane do oszustwa (7 osób).

3. Wyniki

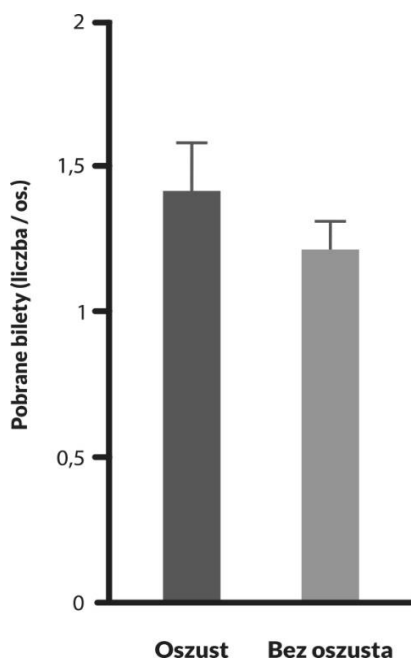
Sprawdzono ilość biletów przypadających na osobę w danej grupie, wyniki analizowano przy pomocy Testu U Manna-Whitneya oraz Kruskala-Wallisa.

Istotnym czynnikiem wpływającym na skłonność do oszukiwania (liczbę pobieranych biletów) była obecność autorytetu lub jej brak (Ryc. 3, 4). Obecność autorytetu ograniczała skłonność do oszustwa.

Widać wyraźnie, że brak czynnika ograniczającego w postaci autorytetu i jednoczesna obecność czynnika wyzwalającego w postaci oszusta sprawiła, że ilość oszustw popełnionych w grupie „student + oszust” była największa ze wszystkich grup, a różnica pomiędzy grupami „autorytet + oszust” i „autorytet bez oszusta” była istotna statystycznie. Największa istotność wystąpiła pomiędzy grupą nie zmanipulowaną przez oszusta z autorytetem, a grupą ze studentem i dodatkową manipulacją oszusta (Ryc.5).



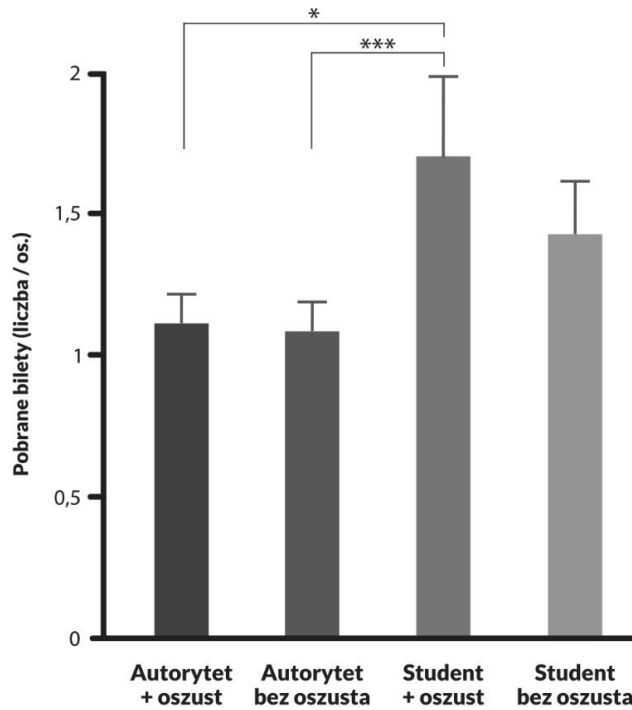
Ryc. 3. Wykres porównujący liczbę pobranych biletów przypadających na jedną osobę w grupach z autorytetem i z studentem (Test Kruskala-Wallisa, $**p < 0,01$).



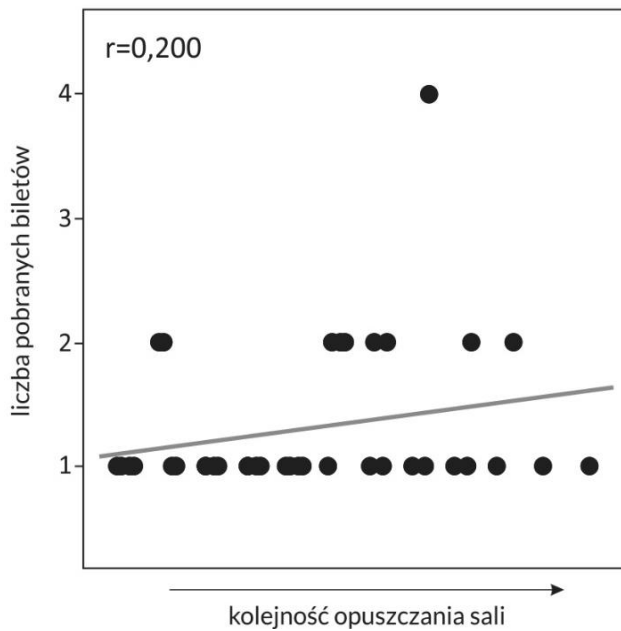
Ryc. 4. Wykres porównujący liczbę pobranych biletów przypadających na jedną osobę w grupach z oszustem i bez oszusta (Test Kruskala-Wallisa, nie wykazano istotności statystycznej).

Określono ponadto korelację pomiędzy kolejnością opuszczania sali, a ilością pobranych biletów w danych grupach z wykorzystaniem analizy Korelacji Pearsona.

Brak autorytetu spowodował, że im później ktoś opuszczał salę, tym więcej brał biletów.

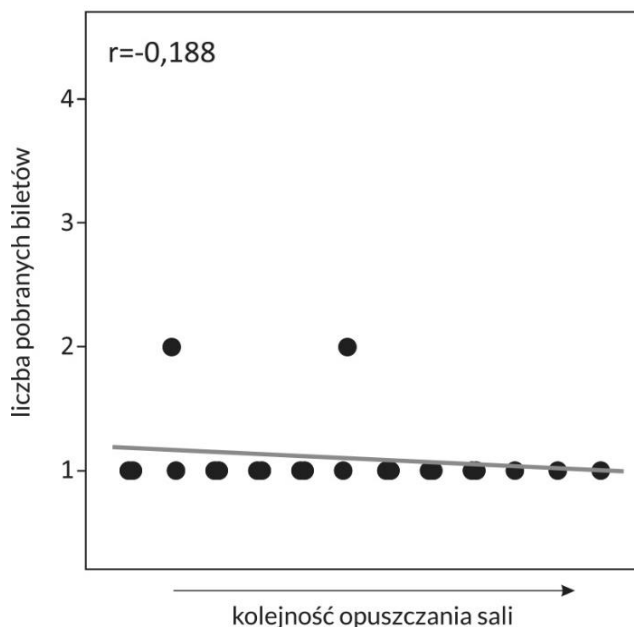


Ryc. 5. Wykres porównujący liczbę pobranych biletów przypadających na jedną osobę we wszystkich grupach doświadczalnych. (Test U Manna-Whitneya, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

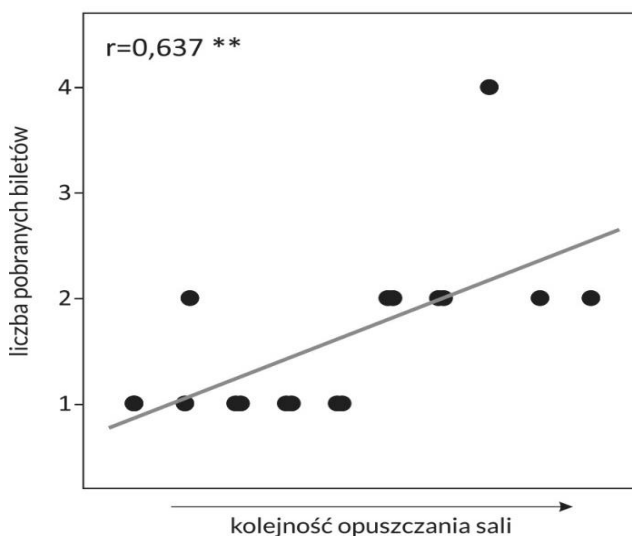


Porównując z całością populacji oraz z grupami z autorytetem – można zauważyć, że korelacja pomiędzy zwiększoną ilością dodatkowo branych biletów, a kolejnością opuszczania sali nie występowała (Ryc. 6, 7, 8).

Demoralizujący wpływ oszusta uwidaczniał się tym bardziej, im później osoba badana opuszczała salę. Wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy liczbą pobranych biletów, a kolejnością opuszczania sali w grupach, w których obecny był oszust (Ryc. 9, 10). Wskazuje to na ograniczającą oszustwo rolę dużej liczby osób będących potencjalnymi świadkami oszustwa.

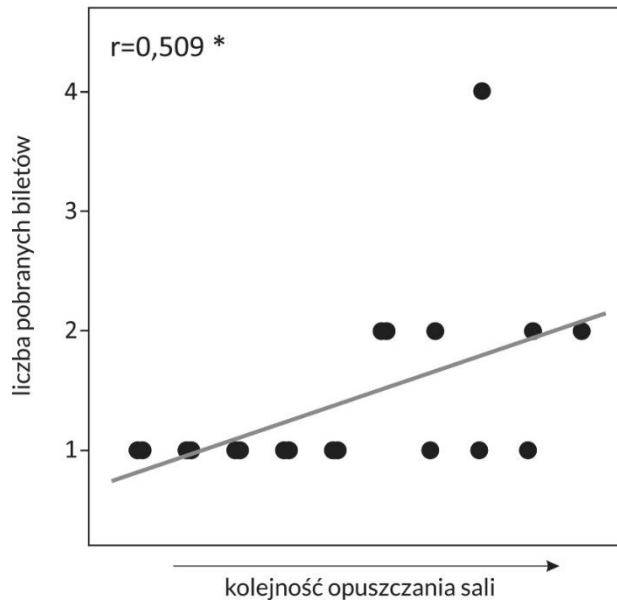


Ryc. 7. Wykres przedstawiający stosunek ilości pobranych biletów w zależności od kolejności opuszczania sali dla grup doświadczalnych z udziałem autorytetu (analiza Korelacji Pearsona).

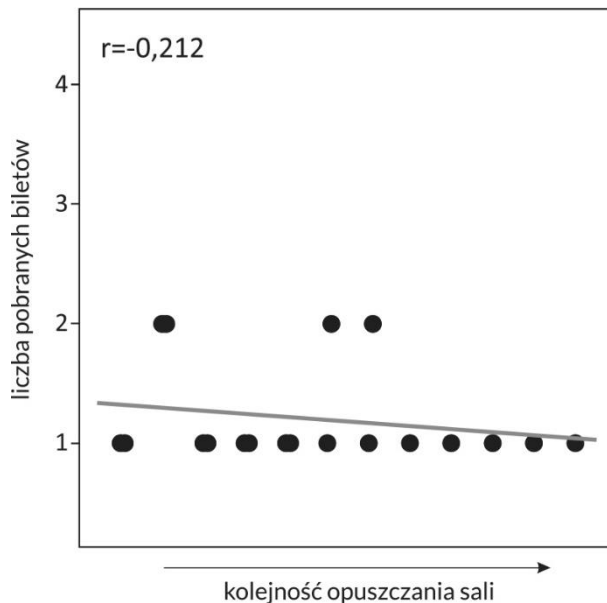


Ryc.8 Wykres przedstawiający stosunek ilości pobranych biletów w zależności od kolejności opuszczania sali dla grup doświadczalnych z udziałem oszusta (** $p < 0,01$)

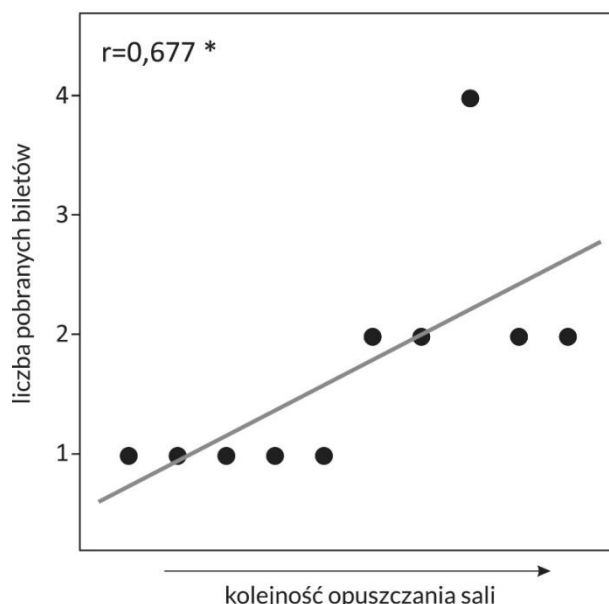
Typ, podtyp oraz wariant osoboości nie miały istotnego wpływu na ilość pobranych biletów. W przypadku obecności autorytetu korelacji takiej nie zauważono, co może wskazywać na ograniczającą oszustwo rolę autorytetu. Największa korelacja wystąpiła wśród osób prowokowanych przez oszusta przy braku obecności autorytetu i opuszczających salę w ostatniej kolejności (Ryc. 9).



Ryc. 9. Wykres przedstawiający stosunek ilości pobranych biletów w zależności od kolejności opuszczania sali dla grup doświadczalnych z udziałem oszusta (analiza Korelacji Pearsona, $*p<0,05$).



Ryc. 10. Wykres przedstawiający stosunek ilości pobranych biletów w zależności od kolejności opuszczania sali dla grup doświadczalnych bez udziału oszusta (analiza Korelacji Pearsona).



Ryc. 11. Wykres przedstawiający stosunek ilości pobranych biletów w zależności od kolejności opuszczania sali dla grupy doświadczalnej bez udziału autorytetu i z udziałem oszusta (analiza Korelacji Pearsona, $*p < 0,05$).

4. Dyskusja

Wiele badań wskazuje na ważny czynnik jakim jest reputacja (Antonioni i in. 2016). Ludzie bardzo obawiają się ryzyka związanego z negatywną oceną ze strony społeczeństwa – być może wysoki wpływ autorytetu na uczestników wynikał z obawy przed utratą dobrego imienia na szerszą skalę, niż tylko pomiędzy rówieśnikami: „dla koncepcji posłuszeństwa konieczne jest posiadanie osoby o wyższym statusie, autorytecie (pojęcie jądra), w przeciwnym razie mamy do czynienia z konformizmem, regulując wpływ społeczny między rówieśnikami” (Fattori i in. 2015).

Powstało wiele prac na temat posłuszeństwa wobec autorytetu i pewnym jest to, iż duży wpływ na jednostkę, oprócz sytuacji, w jakiej się znajduje, mają: wychowanie, kultura panująca w rodzinie/kraju oraz środowisko życia (Gächter i in. 2016).

Oszustwo, czy też skłonności do niego zdają się być jednym z nieodłącznych elementów naszego społeczeństwa, który pozwala często zapewnić taki sam, a nawet większy zysk w porównaniu z osobami, które są uczciwe (Antonioni i in. 2016). Wciąż stanowi to poważny problem, jednak jest szansa, że dzięki odpowiednio dobranej kontroli i nadzorowi (odpowiednik autorytetu) uda się zmniejszyć skłonności do oszustwa.

Chcąc wykorzystać w praktyce zdobytą dzięki licznym badaniom wiedzę możliwym będzie przykładowo zmniejszenie występowania zjawiska korupcji, uchylania się od opodatkowania, oszustw na tle politycznym czy zwiększenie bezpieczeństwa podczas robienia zakupów (zwłaszcza internetowych, gdzie nie występuje bezpośredni kontakt między kontrahentami, który sprawia, że oszuści czują się anonimowi w swoich czynach).

Prowadząc dalsze badania w tym zakresie, możliwe będzie znalezienie odpowiednich rozwiązań do tego problemu.

5. Wnioski

Wykazano pozytywny wpływ autorytetu na posłuszeństwo. Jego wpływ ma kluczowe znaczenie w utrzymaniu przestrzegania zasad oraz zapobieganiu oszustwu.

Skłonności do oszustwa są tym większe im mniejsze jest odczuwane poczucie nadzoru i kontroli przez jednostkę (im mniej osób może zostać świadkiem oszustwa, im mniejszy jest wpływ autorytetu).

Prawdopodobnie z powodu zbyt małej grupy badawczej i złożoności testu osobowości (FFM ang. five factor model), w przypadku typu, podtypu oraz wariantu osobowości - nie stwierdzono ich istotnego statystycznie wpływu na ilość pobieranych biletów w żadnej z grup doświadczalnych.

6. Literatura

- Alberto Antonioni, Angel Sánchez and Marco Tomassini (2016) Cooperation Survives and Cheating Pays in a Dynamic Network Structure with Unreliable Reputation; *Sci Rep.*; 6: 27160
- Fattori, curly, Jörchel i in. (2015) Authority Relationship From a Societal Perspective: Social Representations of Obedience and Disobedience in Austrian Young Adults; *Eur J Psychol.* May 29;11(2):197-213
- Lisa L. Shu, Francesca Gino, Max H. Bazerman (2009) Dishonest Deed, Clear Conscience: Self-Preservation through Moral Disengagement and Motivated Forgetting, Working Paper 09-078
- Luis A. Martinez-Vaquero and Jose A. Cuesta (2013) Evolutionary stability and resistance to cheating in an indirect reciprocity model based on reputation; *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* May;87(5):052810.
- Nestar John, Charles Russel (2011) Milgram's obedience to authority experiments: Origins and early evolution; *British Journal of Social Psychology*, 50, 140–162
- Simon Gächter and Jonathan F. Schulz (2016) Intrinsic Honesty and the Prevalence of Rule Violations across Societies; *Nature.* Mar 24; 531(7595): 496–499
- Stanley Miligram (1965) Liberating effects of group pressure; *Journal of Personality and Social Psychology*, Vol. 1, No. 2, 127-134
- Tomasz Grzyb, Dariusz Dolinski (2017) Beliefs about Obedience Levels in Studies Conducted within the Milgram Paradigm: Better than Average Effect and Comparisons of Typical Behaviors by Residents of Various Nations; *Front Psychol.*; 8: 1632

22. Wykorzystanie leczniczych właściwości egzokannabinoidów do przywrócenia sprawności funkcjonowania procesów kognitywnych nie tylko w chorobach neurodegeneracyjnych, ale także w naturalnie starzejącym się mózgu

The use of the therapeutic properties of exocannabinoids to restore the functioning of cognitive processes not only in neurodegenerative diseases, but also in the naturally aging brain

Klaudia Weronika Misiólek

Studenckie Koło Naukowe Fizjologów „Homunculus” przy Katedrze Fizjologii Zwierząt i Człowieka Uniwersytetu Gdańskiego

Klaudia Weronika Misiólek: kl.misiolok@gmail.com

Słowa Kluczowe: układ endokannabinoidalny, starzenie się neuronów, egzokannabinoidy

Abstrakt

Starzenie się układu nerwowego stanowi poważną przyczynę pogorszenia funkcji poznawczych: pamięci, nauki, uwagi, proces ten może także prowadzić do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Inne nie mniej ważne układy również podlegają temu procesowi w tym układ endokannabinoidalny, o którego działaniu wciąż nie wiemy wszystkiego, jednak pewnym jest to, iż jego podstawową funkcją jest regulacja komunikacji między neuronami oraz utrzymywanie homeostazy w danym obwodzie mózgu. Artykuł jest przeglądem literatury na temat powiązania działania układu endokannabinoidowego na zachodzenie procesów związanych z plastycznością i fizjologią mózgu, zwłaszcza hipokampa oraz korzyści leczniczych wynikających z wykorzystania leczniczego egzokannabinoidów objawiających się poprawą pamięci, polepszeniem zdolności do uczenia się nie tylko w chorobach neurodegeneracyjnych, ale także w naturalnie starzejącym się mózgu.

1. Wstęp

Do wielu chorób związanych z neurodegeneracją wciąż nie dopasowano odpowiedniego leczenia gwarantującego pełne zdrowie. Starzenie się organizmu jest podstawowym procesem, który zachodząc w sposób naturalny, wraz z wiekiem stopniowo upośledza wszelkie fizjologiczne aspekty naszego organizmu – nie oszczędzając układu nerwowego. Pograszające się pamięć, zdolności do uczenia się są objawami nie tylko w przypadku chorób neurodegeneracyjnych, ale w pewnym wieku będą w danym stopniu - mniejszym lub większym dotyczyć każdego z nas.

Artykuł jest przeglądem literatury na temat powiązania działania układu endokannabinoidowego na zachodzenie procesów związanych z plastycznością i fizjologią mózgu, zwłaszcza hipokampa oraz korzyści leczniczych wynikających z wykorzystania egzokannabinoidów objawiających się poprawą pamięci, polepszeniem zdolności do uczenia się.

2. Opis zagadnienia

Starzenie się neuronów

Starzenie się jest neutralnym procesem zachodzącym we wszystkich organizmach; w przypadku ludzi skutkuje nieodwracalnymi zmianami w układzie nerwowym, które prowadzą do powstawania licznych defektów w jego funkcjonowaniu. Objętość mózgu zmniejsza się, następuje demielinizacja zmielinizowanych włókien nerwowych. Wiadomym jest, że w starych neuronach wzrasta poziom stresu oksydacyjnego, zaburzona zostaje równowaga metaboliczna co rzutuje na pogorszenie zachodzenia procesów związanych z plastycznością i przekazywaniem synaptycznym specyficznie w zależności od obszaru mózgu (Piechota i Sunderland 2014). Oznacza to, że zdolności zmiany i reorganizacji po uszkodzeniach maleją wraz z upływem czasu. Hipokamp – struktura

odpowiedzialna między innymi za pamięć i uczenie się ulega szczególnie dużym zmianom podczas tego procesu. Na chwilę obecną znamy już wiele czynników świadczących o zachodzeniu procesu starzenia się. W obszarze CA1 hipokampa u starych szczurów obserwuje się wysoce podniesioną ekspresję genów związanych ze stanem zapalnym i sygnalizacją wapniową, które korelują ze spadkiem ich zdolności poznawczych, a także obniża się poziom czynnika troficznego BDNF (ang. brain-derived neurotrophic factor), który odgrywa istotną rolę w plastyczności synaptycznej (Piechota i Sunderland, 2014). W wyniku przeważania działania stresu na komórki w stosunku do działań neuroprotekcyjnych dochodzi do chronicznego stanu zapalnego, spada wrażliwość neuronów na czynniki troficzne oraz plastyczność synaps, co nieodwracalnie je uszkadza. Jednym z nowych podejść tłumaczących przyczynę starzenia komórek nerwowych jest teoria o nadmiernej stymulacji funkcji komórek – zamiast zatrzymania jej podziałów i obniżeniu metabolizmu, które powstały wskutek uszkodzeń. Możliwym jest, iż nadmierna i chroniczna stymulacja funkcji komórki prowadzi do powstawania nieprawidłowości w równowadze energetycznej – co za tym idzie zaburzeniu równowagi działania synaps hamujących i pobudzających. Zwykle uważa się, że niedostateczna aktywność mózgu, związana z demielinizacją włókien nerwowych, spadkiem ilości kolbek synaptycznych i podwojeniu liczby kolbek nie tworzących połączenia synaptycznego z żadnym z kolców dendrytycznych (w przypadku hipokampa) odpowiada to za pogorszone procesy uczenia się i zapamiętywania. Jest to prawdą, jednak okazuje się, że również nadaktywność neuronów w tym obszarze może być szkodliwa w skutkach. Biorąc pod uwagę wpływ lokalny i dystalny odhamowania w tej strukturze, postanowiono hipotezę, że inhibicja neuronów upośledza hipokampo zależną pamięć oraz oparte na łączności hipokampoprefrontalnej funkcje poznawcze, w tym atencja, skupianie uwagi (McGarrity i in. 2016). W takim przypadku, możliwe, iż zastosowanie w terapii środków przywracających odpowiedni poziom inhibicji i pobudzenia neuronów hipokampalnych pozwoliłoby na powrót jego odpowiedniego funkcjonowania. Jeśli teoria zyskałaby odpowiednio znaczące poparcie eksperymentalne mogłoby to oznaczać przełom nie tylko w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, ale także poprawy jakości działania funkcji poznawczych takich jak pamięć czy nauka u osób w podeszłym wieku.

Układ endokannabinoidowy (EKAN)

W jego skład wchodzi endokannabinoidy posiadające swoiste receptory w organizmie (CB₁ i CB₂), a także enzymy związane z ich biosyntezą i degradacją. Okazuje się, że endokannabinoidy biorą czynny udział w nieznanym dotychczas systemie komunikacji między neuronami. Bardzo interesujące są skutki pobudzenia receptorów CB₁ (występujących głównie presynaptycznie na powierzchni ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego): wykazują tendencje do hamowania uwalniania wielu neuroprzekaźników takich jak: noradrenalina, serotonina, dopamina, acetylocholina, glutaminian i kwas γ -aminomasłowy GABA. Ogólniej mówiąc wynikiem pobudzenia tych receptorów jest wielokierunkowa aktywacja różnych szlaków metabolicznych co m.in. wywołuje „odpowiedź komórkową na działanie neurotropowych czynników wzrostu, takich jak BDNF (ang. Brain Derived Neurotrophic Factor) czy GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor)” (Kazula 2009) - aktywacja ekspresji czynnika martwicy nowotworów.

Odnosząc się do struktury hipokampa – jest on jednym z miejsc, gdzie zagęszczenie receptorów CB₁ jest największe, zwłaszcza na neuronach uwalniających neuroprzekaźnik GABA (kwas γ -aminomasłowy). Neuroprzekaźnik ten jest najważniejszym neuromodulatorem, który blokuje przekaz sygnału przez neurony postsynaptyczne, czyli jest kluczowy w utrzymaniu odpowiedniej aktywności neuronów, uniemożliwiając ich zbytne wyzwalanie – czyli reagowanie na nieistotne bodźce. Nasuwa to hipotezę na temat kontroli komunikacji układu endokannabinoidowego pomiędzy synapsami, które wykorzystują neuroprzekaźnik w postaci kwasu γ -aminomasłowego. Udowodnionym jest, że naturalny agonista niespecyficzny tych receptorów (oddziałuje również na receptory CB₂) bierze aktywny udział w procesach związanych z pamięcią, nauką, a także przyjmowaniem pokarmu czy snem. Istnieje wiele przesłanek na podstawie licznych badań, iż można wykorzystać informacje na temat działania EKAN do zastosowania klinicznego w przypadkach leczenia chorób związanych z neurodegeneracją, ale także zaburzeniami apetytu czy nowotworami (Kazula 2009).

Wykorzystywanie lecznicze marihuany

Cannabis sativa L. jest gatunkiem rośliny z rodziny konopiowatych (łac. *Cannabaceae* Endl.), powszechnie najczęściej w postaci ususzonych i czasem sfermentowanych kwiatostanów żeńskich nazywana marihuaną. Jej lecznicze właściwości są wykorzystywane przez ludzkość od wieków do kurowania różnego rodzaju przypadłości; od zaburzeń żołądkowo-jelitowych poprzez łagodzenie bólu, bezsenności, aż do leczenia takich chorób jak anorexia nervosa, epilepsja czy choroba Parkinsona (Kogan 2007). Roślina zawiera substancje z grupy egzokannabinoidów, które działają agonistycznie na receptory kannabinoidowe (podobnie do ludzkiego kannabinoidu endogennego - anandamidu). Większość publikacji naukowych dotyczących *Cannabis sativa* L. skupia się na dwóch substancjach wchodzących w jej skład: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC; głównie on odpowiada za efekty psychotropowe) oraz cannabidiol (CBD). Marihuana wykazuje wiele różnych efektów swojego działania z których nie wszystkie są pożądane podczas leczenia. Wciąż potrzebna jest praca nad bardziej selektywnymi agonistami/antagonistami receptorów kannabinoidalnych, aby pozbyć się działań niepożądanych i wykorzystać w pełni spektrum możliwości jakie oferuje. Jednak niska toksyczność, łagodne efekty uboczne i ogromne walory medyczne sprawiają, że nie można odrzucać jej potencjału klinicznego (Guindon i Hohmann 2010).

3. Przegląd literatury

Neuroplastyczność - zachowanie równowagi w pobudzeniu i hamowaniu neuronów

Mózg jest strukturą dynamiczną, która w odpowiedzi na różne bodźce stymulujące pochodzące ze środowiska zewnętrznego ulega zmianom plastycznym. Wszelkie zmiany związane z reorganizacją, naprawą, neuroplastycznością w mózgu związane są z prawidłowym działaniem synaps pobudzających i hamujących. O występowaniu odpowiedniego pobudzenia neuronów do działania w zależności od potrzeb świadczy przykład doświadczenia przeprowadzonego na kociętach, w których wykazano, że zamknięcie jednego oka na kilka godzin powoduje pobudzenie większej liczby neuronów przez oko, które było otwarte. We wzgórzu aksony silnie rywalizują ze sobą o połączenie z korą wzrokową. Neurony oka zamkniętego niepobudzone światłem nie otrzymują sygnałów do rozwoju. Widoczną zmianą jest to, że aksony otwartego oka wrastają w ciało kolankowate boczne w miejsce aksonów z oka zamkniętego - te obkurczają się (Wójcik 2011). Podstawą generowania zmian plastycznych w mózgu jest długotrwałe wzmocnienie synaptyczne. „Receptor NMDA jest niezbędny do wywołania długotrwałego wzmocnienia i osłabienia synaptycznego w korze mózgowej, przypuszcza się więc, że te zjawiska, których mechanizmy są dość dobrze poznane, leżą także u podstaw plastyczności kolumn dominacji ocznej. Ważny jest także stan wzbudzenia mózgu. Zmiany plastyczne kolumn dominacji ocznej nie zachodzą w narkozie. Upośledza je także eliminacja z kory wpływów niespecyficznych układów aktywujących - cholinergicznego, noradrenergicznego i serotonergicznego. Aby wywołać tę zmianę plastyczną potrzebny jest więc pewien poziom mobilizacji kory, obecność receptora NMDA i nierównowaga pobudzenia wzrokowego z prawego i lewego oka.” (Kossut).

Okazuje się więc, że bardzo istotnym czynnikiem w plastyczności mózgu są także interakcje hamujące. Udowodniono, że w korze mózgowej podczas nauki przez doświadczenie, dużą rolę odgrywają synapsy hamujące z udziałem GABA. Początkowo po przeprowadzeniu warunkowania strachu na myszach z wykorzystaniem wibrysów zauważono wzrost liczby markerów inhibicji oraz wzrost powierzchni reprezentującej stymulowany rząd wibrysów w korze baryłkowej. Zauważono także, że warunkowaniu towarzyszył wzrost poziomu kwasu γ -aminomasłowego. Po zmniejszeniu produkcji GABA w korze baryłkowej, transmisji poprzez receptory GABAA (GABAAR), czy wstrzyknięciu kwasu 3-merkaptopropionowego (3-MPA - inhibitor dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD)) zaobserwowano brak powiększenia reprezentacji wibrysów pomimo przeprowadzenia uprzednio opisanego warunkowania (podobny efekt uzyskano po wstrzyknięciu gabazyny, antagonisty GABAAR). Behawioralna reakcja myszy była upośledzona, świadczy to o ważnej roli układu GABAergicznego w procesie neuroplastyczności oraz rozwoju odpowiedzi warunkowej.

W kwestii plastyczności hipokampa w badaniu (Bao i in. 2017) wykazano również bardzo istotną rolę sygnalizacji GABAergicznej. Najnowsze wyniki świadczą o tym, że w zakręcie zębatym

interneurony parwalbuminowe wśród kilku innych typów interneuronów, służą jako unikalny element obwodu lokalnego w regulacji dorosłych komórek macierzystych neuronów (NSC – ang. neural stem cells) i powstających z nich komórek potomnych poprzez sygnalizację GABA. Badania podkreślają kluczowe role tych obwodów w kontroli dorosłej neurogenezy hipokampa. Ta hamująca sieć połączeń obejmuje daleko-zasięgowe neurony GABAergiczne przyśrodkowej przegrody oraz niszę neuronów (interneuronów) parwalbuminowych zakrętu zębatego GABA-depolaryzujących, łączących globalną aktywność mózgu z niszą neurogeniczną. W ten sposób neurony GABA przyśrodkowej przegrody otrzymując bezpośrednie dane wejściowe z dystalnych obszarów mózgu mogą odpowiednio regulować NSC wykorzystując działanie neuronów parwalbuminowych. Wyjaśnia to dlaczego neurogeneza w hipokampie dorosłych osób jest szczególnie wrażliwa na wszelkie zaminy środowiska fizjologicznego oraz zmiany patologiczne. Dzięki tym informacjom można opracować nowe strategie leczenia zaburzeń wynikających z nieprawidłowej neurogenezy hipokampa, takiej jak przykładowo choroba Alzheimera czy schizofrenia.

Wiadomo, że w skrajnym przypadku upośledzona hamująca transmisja GABA może powodować napady padaczkowe, jednak dopiero niedawno uzyskano informacje o skutkach bardziej subtelnych upośledzeń tej transmisji (poniżej progu wywołującego napady padaczkowe). Powiązano je z szeregiem zaburzeń mózgu charakteryzujących się upośledzeniem funkcji poznawczych charakterystycznych nie tylko dla schizofrenii czy choroby Alzheimera, ale także zaburzeniami kognitywnymi związanymi z wiekiem (McGarrity i in. 2016). "Odhamowanie neuronów hipokampa powoduje niedobory uwagi i pamięci" (Bast i in. 2016). Badania przeprowadzone na szczurach sugerują, że pamięć zależy od dobrze zrównoważonej aktywności nerwowej w hipokampie - zbyt duża lub zbyt mała jest przyczyną upośledzenia działania. Jest to ważne odkrycie, ponieważ tradycyjnie upośledzenie pamięci kojarzone jest głównie ze zmniejszoną aktywnością hipokampa lub jego leżą. Zwiększona aktywność neuronów w obrębie hipokampa zakłóca uwagę (atencję), która normalnie zależy głównie od kory przedczołowej. Świadczy to o tym jak bardzo silne połączenia występują między korą przedczołową, a hipokampem oraz że patologicznie zwiększona aktywność w obrębie danego regionu mózgu może zaburzyć nie tylko funkcję samego regionu (tutaj pamięci zależnej od hipokampa), ale także funkcję innych regionów, z którymi jest powiązana (tutaj uwaga zależna od kory przedczołowej) (McGarrity i in. 2016). "Ponowne przywrócenie równowagi aktywności pobudzenia i hamowania działania neuronów może nie tylko przywrócić odpowiednie funkcjonowanie pamięci i uwagi, ale także zapobiec dalszemu ich upośledzeniu" (Bast i in. 2016).

Układ endokannabinoidowy – prawidłowa komunikacja kluczem do homeostazy neuronalnej

Uważa się, że główną funkcją układu endokannabinoidowego jest przekazywanie informacji między synapsami, przez co wpływają na zintegrowane działanie układu nerwowego i reguluje między innymi: apetyt, odpowiedź immunologiczną, procesy związane plastycznością mózgu - tym samym zdolności do nauki czy pamięć. Udowodniono, że aktywacja receptora CB₁ moduluje przewodność wapniową lub potasową; właściwości te związane są z tłumieniem pobudliwości neuronów i uwalnianiem neuroprzekazników. Przeprowadzono badania na mysim prądkowiu, w których wykazano, iż działanie N-palmitoiloetanoloaminy (PEA - endogenny składnik EKAN) moduluje GABAergiczne samoistne hamowanie postsynaptyczne, jednocześnie równolegle wyzwalając syntezę 2-arachidonoiylglicerolu (2-AG – endokannabinoid, agonista receptora CB₁) w miejscu postsynaptycznym, która z kolei działa odwrotnie do PEA hamując uwalnianie GABA poprzez stymulację presynaptycznych receptorów CB₁Rs. Badanie to potwierdza, jak istotną rolę w kontroli najważniejszego hamującego neurotransmitera (GABA) posiada układ endokannabinoidalny (Musella i in. 2017).

Innym przykładem oddziaływań układu endokannabinoidowego jest doświadczenie, w którym wyłączono receptory kannabinoidowe CB₁ na korowych zakończeniach glutamatergicznych (Glu-CB₁ - / -) lub na neuronach GABAergicznych (GABA-CB₁ - / -), badając poziom hamowania behawioralnego w reakcji ucieczki. Myszy Glu-CB₁ - / - posiadały wyższe poziomy hamowania, myszy GABA-CB₁ - / - znacznie niższe i więcej zachowań ucieczkowych w porównaniu z kontrolami typu dzikiego. Ostatecznie wykazano, że receptory CB₁ na korowych

zakończeniach glutaminergicznych są ważne dla uzyskania aktywnego unikania (ich brak wywołał tendencję do unikania hamowania), przeciwnie do receptorów CB₁ na neuronach GABAergicznych, które pośredniczą w nabywaniu biernego unikania (brak receptora wywołał silne nastawienie na ucieczkę) (Genewsky i Wotjak 2017). Podobnie w badaniu (Llorente-Berzal 2015), w którym udowodniono, że 2-AG wyzwała reakcję uwarunkowanego strachu działając na receptor CB₁ na neuronach GABAergicznych. Świadczy to o pośredniczeniu układu endokannabinoidowego w komunikacji komórek nerwowych i jego ważnym wpływie na integralność układu nerwowego i spójność reakcji behawioralnych.

Wykorzystanie egzokannabinoidów do przywrócenia sprawności upośledzonych funkcji poznawczych.

Podjęto liczne próby chemicznego zaklasyfikowania konopi indyjskich wedle ich właściwości, jednak ze względu na występowanie wielu odmian rośliny, a także wielu różnych substancji mogących wejść w skład wytwarzanych z niej leków - wciąż jest to trudne do określenia. Możemy jednak przytoczyć ogólny obraz składu chemicznego biorąc pod uwagę trzy główne substancje występujące we wszystkich odmianach w różnym stopniu: CBD, Δ⁹-THC i CBS. Na podstawie ilościowego składu danych substancji można w przybliżeniu określić fenotyp rośliny i efekty leku z niej wytworzonego (bazując na wiedzy na temat działania tych substancji na organizm) (Turner i in. 1980). Potencjał terapeutyczny ich działania jako agonistów CB₁ jest ogromny (z jego działaniem mogą wiązać się uboczne efekty psychoaktywne), a dodatkowym atutem są egzokannabinoidy działające specyficznie na receptory CB₂ lub na inne nowo odkrywane receptory, które nie powodują psychoaktywności jednocześnie nie tracąc działania terapeutycznego. Kluczem do sukcesu jest dostosowanie odpowiedniego składu leku do danego schorzenia z jak najmniejszym prawdopodobieństwem wystąpienia efektów niepożądanych (Kogan 2007).

Przełomowym doświadczeniem przekonującym o wykorzystaniu egzokannabinoidów do leczenia jest badanie (Bilkei-Gorzo i in. 2017). Podawano stałą niską dawkę (niewywołującą efektów psychotropowych) Δ⁹-tetrahydrocannabinol (THC) starym (12 miesięcy), w średnim wieku (8 miesięcy) i młodym (2 miesiące) myszom przez okres 28 dni. Zauważono, że myszy stare z aplikowanym THC uzyskały znacznie lepsze wyniki w testach sprawdzających pamięć i uczenie się niż próba kontrolna składająca się z myszy starych, którym podawana była sól fizjologiczna oraz od myszy młodych z aplikowanym THC (myszy młode z dozowaną substancją uzyskały gorsze wyniki od odpowiadającej im próby kontrolnej). Sugeruje to, że THC ma odmienny wpływ na organizm w zależności od wieku. Wniosek ten łączy się z faktem, iż działalność układu endokannabinoidowego zmniejsza się wraz z wiekiem organizmu, z przyczyn wiążących się z naturalnym starzeniem neuronów. Dodatkowo dowiedziono, że THC wpłynęło odmiennie na gęstość kolców dendrytycznych na neuronach GABAergicznych i glutaminergicznych w rejonie CA1 w zakręcie zębatym hipokampa u myszy starych i młodych. U starych myszy gęstość wzrosła znacząco w przypadku obu typów neuronów, natomiast u młodych nie stwierdzono statystycznie znaczącej zmiany. Badając markery pobudzające i hamujące synaps również w rejonie CA1, CA3 oraz w pobliżu komórek granularnych zakrętu zębatego hipokampa zauważono, że u myszy starych znacząco wzrosła aktywność pobudzająca synaps, a hamująca spadła – u myszy młodych wręcz przeciwnie, aktywność hamująca bardzo wzrosła. Wyniki doświadczenia potwierdzają, że układ endokannabinoidalny bierze udział w utrzymaniu równowagi w pomiędzy działaniem synaps pobudzających i hamujących. Zachowanie jej jest w dużej mierze mechanizmem homeostatycznym, mogącym determinować postępowanie starzenia neuronów. U myszy młodych z aplikowanym THC zauważono pogorszenie pamięci oraz możliwości nauki, prawdopodobnie dlatego, że działanie ich układu endokannabinoidalnego pozostaje nieupośledzone (w związku z procesami starzenia się), więc terapeutyczna dawka kannabinoidu doprowadziła do nadaktywności, która była szkodliwa w skutkach. A zatem, przywrócenie odpowiedniej sygnalizacji poprzez receptory CB₁ (THC jest ich agonistą) u osób starszych może być skuteczną strategią leczenia upośledzenia funkcji poznawczych związanych z wiekiem (Bilkei-Gorzo i in. 2017).

Wyniki badań (Tervo-Clemmens i in. 2017) udowodniły także, że wiek, w którym przyjmuje się egzokannabinoidy ma znaczenie. W doświadczeniu brały udział osoby dorosłe w wieku 28 lat.

Przykładowo uczestnicy, którzy wcześniej w ciągu swojego życia zaczęli używać marihuany mieli dłuższy czas reakcji od tych, którzy rozpoczęli użytkowanie w późniejszym wieku. Jednak najważniejszym wnioskiem płynącym z badania jest to, że na poziomie grupy osoby używające konopi indyjskich ogólnie osiągały lepsze wyniki niż uczestnicy, którzy zgłosili, że nigdy ich nie używali (szybszy czas reakcji, wyższa dokładność).

Kolejnym przykładem potwierdzającym odmienny wpływ egzokannabinoidów w zależności od wieku jest doświadczenie, w którym badano wpływ marihuany na nastolatków. Użytkownicy konopi wykonali prawidłowo zadania sprawdzające pamięć, jednak wykazywali nadmierną aktywność w regionach przedczołowych, kiedy zadanie było nowatorskie, a w przypadku występowania pewnej automatyzacji przy jego wykonywaniu, jego aktywność zmniejszyła się do tego samego poziomu u użytkowników i kontroli. Nie stwierdzono wpływu używania konopi indyjskich na funkcję mózgu związaną z pamięcią asocjacyjną. U nastolatków używających marihuany pamięć robocza była nadmiernie aktywna podczas nowego zadania, co sugeruje kompensację funkcjonalną. Nieefektywna rekrutacja pamięci roboczej nie była związana z niepowodzeniem automatyzacji, tylko z ciągłym przetwarzaniem stale zmieniających się informacji (Jager i in. 2011).

4. Podsumowanie i wnioski

Z każdymi wynikami doświadczeń dotyczącymi układu endokannabinoidowego dowiadujemy się coraz więcej o jego regulujących funkcjach związanych z utrzymaniem neuronalnej homeostazy. Posiadając coraz bogatszą wiedzę na temat fizjologii człowieka, w tym w szczególności układu nerwowego, jesteśmy w stanie podjąć odpowiednie kroki w kierunku wytwarzania medykamentów na liczne schorzenia neurodegeneracyjne oraz ubytki w funkcjonowaniu związane z wiekiem. Często opinie na temat egzokannabinoidów nie są oparte na racjonalności i powtarzalnych faktach naukowych, ale na emocjach związanych ze skojarzeniami z uzależnieniem od marihuany. Jednak należy pozostać czujnym i śledzić postępy w badaniach naukowych, aby kliniczny potencjał egzokannabinoidów został w miarę możliwości wykorzystany z najlepszym skutkiem dla ludzi.

5. Literatura

- Bao H, Asrican B, Li W i in. (2017), Long-Range GABAergic Inputs Regulate Neural Stem Cell Quiescence and Control Adult Hippocampal Neurogenesis, *Cell Stem Cell* 21, 604–617 November 2, 2017 Elsevier Inc.
- Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A i in. (2017), A chronic low dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice, *Nature Medicine*, vol.23, no.6, June 2017, 782-791
- Genewsky AJ i Wotjak CT (2017), The Endocannabinoid System Differentially Regulates Escape Behavior in Mice, *Front Behav Neurosci.* 2017; 11: 201.
- Guindon J i Hohmann AG (2010), The Endocannabinoid System and Pain, *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2009 Dec; 8(6): 403–421
- Jager G, Block RI, Luijten M i in. (2011), Cannabis use and memory brain function in adolescent boys: a cross-sectional multicenter fMRI study, *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010 Jun; 49(6): 561–572.e3.
- Joy JE, Watson SJ Jr., Benson JA Jr. (1999), *Marijuana and Medicine: Assessing the Science Base*, National Academies Press (US)
- Kazula A (2009), Zastosowanie naturalnych kannabinoidów i endokannabinoidów w terapii, *Tom 65, nr 2*, 2009
- Kogan NM (2007), Cannabinoids in health and disease, *Dialogues Clin Neurosci.* 2007 Dec; 9(4): 413–430
- Kossut M, *Nauka światowa i polska*, rozdział 9, str.285-306
- Llorente-Berzal A, Terzian AL, di Marzo V i in. (2015), *Psychopharmacology (Berl)*. 2015 Aug;232(15):2811-25

- McGarrity S, Mason R, Fone KC i in. (2016), Hippocampal Neural Disinhibition Causes Attentional and Memory Deficits, *Cerebral Cortex*, 2016; 1–16
- Musella A, Fresegna D, Rizzo FR i in. (2017), A novel crosstalk within the endocannabinoid system controls GABA transmission in the striatum, *Sci Rep*. 2017; 7: 7363
- Piechota M i Sunderland P (2014), Starzenie neuronów, *Postępy Biochemii* 60 (2)
- Posluszny A, Liguz-Lecznar M, Turzyska D i in. (2015), Learning-Dependent Plasticity of the Barrel Cortex Is Impaired by Restricting GABA-Ergic Transmission, *PLoS One*. 2015; 10(12): e0144415
- Tervo-Clemmens B, Simmonds D, Calabro FJ i in. (2017), Adolescent Cannabis Use and Brain Systems Supporting Adult Working Memory Encoding, Maintenance, and Retrieval, *NeuroImage* S1053-8119(17)31063-7
- Turner CE, Elsohly MA, Boeren EG (1980), Constituents Of Cannabis Sativa L. XVII. A Review Of The Natural Constituents, *Journal of Natural Products* VOL. 43, no. 2 169-234
- Wójcik K (2011), *Neurobiologia Rozwojowa i Inwolucyjna Plastyczności Mózgu, neurokognitywistyka w patologii i zdrowiu, 2009 – 2011*, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie 162–170

Recenzenci rozdziałów w monografiach z kolekcji ISBN 978-83-65677-93-8:

dr hab. Damian Absalon, dr Jan Andrzejewski, prof. dr hab. Krzysztof Anusz, dr hab. inż. Piotr Arlet, dr hab. Katarzyna Bagan-Kurluta, dr hab. Maciej Barczewski, dr inż. Jacek Bartman, dr hab. inż. Marian Bartoszek, dr inż. Justyna Batkowska, dr inż. Piotr Bąska, dr hab. Teresa Bednarczyk, dr Jerzy Bednarski, dr Katarzyna Bergier, dr inż. Agnieszka Bielaszka, prof. dr hab. inż. January Bień, dr Barbara Bilewicz-Kuźnia, dr inż. Mariola Błaszczyk, dr Tomasz Błądek, prof. dr hab. Jacek Błęszyński, dr hab. Adam Bobryk, dr Michał Borodo, dr inż. Marta Borowska, dr inż. Tomasz Brynk, prof. dr hab. Jarosław Całka, dr Beata Całyniuk, dr hab. Witold Chabuz, dr hab. Piotr Chęłpiński, dr Dorota Chrobak-Chmiel, dr Agnieszka Chruścikowska, dr hab. Andrzej Ciążela, prof. dr hab. Jan Cielichowski, dr hab. inż. Adam Cwudziński, prof. dr hab. inż. Anna Cysewska-Sobusiak, dr Paweł Czarniecki, dr hab. Ewa Katarzyna Czech, dr inż. Małgorzata Czichy, dr inż. Klara Czyńska, dr Krzysztof Damaziak, dr hab. Paweł Daniel, dr hab. Anna Doliwa-Klepcka, dr Wioleta Drobik-Czwaro, prof. dr hab. Leszek Drodz, dr Renata Dudziak, prof. dr hab. inż. Włodzimierz Dudziński, dr inż. Krzysztof Durka, dr hab. Marzena Dyjakowska, dr Gabriela Dyrda, dr Magdalena Dziedzic, dr hab. Małgorzata Dzierżęcka-Gappa, dr inż. Małgorzata Dzieciół, prof. dr hab. inż. Marek Dziubiński, dr Marcin Dziwisz, prof. dr hab. Leonard Etel, dr hab. Beata Feledyn-Szewczyk, dr Wiesław Fidecki, dr hab. Marek Figura, dr hab. Paweł Filipiak, dr Piotr Filipiak, dr Jarosław Frączak, dr hab. Magdalena Gajęcka, dr inż. Mariusz Gamracki, prof. dr hab. Ryszard Gerlach, dr Artur Giełdoń, dr Wojciech Glac, prof. dr hab. Tomasz Głowiński, prof. dr hab. Agnieszka Gmitrowicz, dr hab. Sławomir Gonkowski, prof. dr hab. Józef Górniewicz, ks. prof. dr hab. Krzysztof Gózdź, dr Marcin Grąz, dr hab. Joanna Hawlena, dr Iga Hołyńska-Iwan, dr Magdalena Jaciow, dr Magdalena Jankowska-Wajda, dr inż. Tomasz Jankowski, dr inż. Paweł Jelec, dr hab. Andrzej Junkuszew, dr Agata Kabała-Dzik, dr Alena Kacmarova, dr Marta Kaczmarek-Ryś, dr hab. Hanna Karakuła-Juchnowicz, dr inż. Robert Kasner, prof. dr hab. inż. Nina Kazhar, dr inż. Krzysztof Kaziński, dr inż. Agata Kiciak, dr Dominika Kidaj, prof. dr hab. Marek Klimek, dr Joanna Klonowska, dr hab. Zbigniew Kobus, dr hab. Beata Kolny, dr Przemysław Kołodziej, dr inż. Bogusław Kołodziejski, dr hab. Jerzy Kopyński, dr Agnieszka Korchut, dr Grzegorz Korcyl, dr Monika Kornacka, dr hab. inż. Marta Kosior-Kazberuk, dr inż. Łukasz Kotwica, dr hab. Małgorzata H. Kowalczyk, dr Kamil Kowalski, prof. dr hab. Wojciech Kowalski, dr hab. Katarzyna Kozłowicz, dr hab. Piotr Krakowiak, dr Marlena Krawczyk-Suszek, dr hab. Marta Krenz-Niedbała, ks. dr hab. Piotr Kroczek, dr inż. Karol Król, dr Celina Kruszniowska-Rajs, dr inż. Krzysztof Krzysztofowicz, dr Waldemar Kuczma, dr inż. Edyta Kudlek, dr Joanna Kula-Gradziak, dr hab. inż. Andrzej Kulig, dr inż. Tomasz Kulpa, dr Marcin Kunecki, dr hab. inż. Robert Kunkel, dr hab. Małgorzata Kwiecień, dr Marzanna Lament, prof. dr hab. Katarzyna Laskowska, dr inż. Magdalena Lech, dr inż. Justyna Libera, prof. dr hab. Tadeusz Linkner, prof. dr hab. Anna Lityńska, dr hab. Wiesław Lizak, dr inż. Aneta Lorek, dr hab. inż. Magdalena Janus, dr Tariq Mahmood, dr inż. Ewa Malczyk, dr hab. inż. Justyna Martyniuk-Pęczek, dr Sławomir Maślanka, dr hab. Jacek Matulewski, dr Artur Mazurek, dr Anna Michalska-Bañkowska, dr inż. Paweł Michalski, prof. dr hab. Jan Miciński, dr hab. ks. Bogusław Migut, dr hab. Krzysztof Mikołajczuk, dr Barbara Milewicz-Bednarska, prof. dr hab. inż. Piotr Miller, dr hab. Maria Mocarz-Kleindienst, dr Sylwia Mojsym-Korybska, dr Marta Mozgawa-Saj, dr inż. Adam Mroziński, dr hab. Dorota Narożna, dr hab. Oktawian Nawrot, prof. dr hab. Stanisław Sławomir Nicieja, dr Joanna Nieć, prof. dr hab. Mateusz Nieć, dr Jacek Niedźwiecki, dr hab. Jerzy Nita, dr Katarzyna Nowak, dr hab. Zbigniew Nowak, prof. dr hab. inż. Lucyna Nyka, dr hab. Ireneusz Ochmian, dr inż. Paweł Ogrodnik, dr hab. Dorota Olszewska-Słonina, dr hab. Krzysztof Oplustil, prof. dr hab. inż. Leszek Opyrchal, prof. dr hab. Lucjan Pająk, prof. dr hab. inż. Zbigniew Paszkowski, dr inż. Agnieszka Pawłowska, dr inż. Marek Piątek, dr inż. Paweł Pietrusiewicz, dr Karol Pilorz, dr hab. Monika Pitucha, dr hab. Magdalena Polak-Berecka, dr hab. Renata Polaniak, dr inż. Kornelia Polek-Dvraj, dr Piotr Pomorski, dr inż. Arkadiusz Popławski, dr Agnieszka Potyrańska, dr hab. Krzysztof Pudelko, dr Rafał Raczyński, dr hab. Zenon Rajfur, prof. dr hab. Konrad Rejda, dr hab. Piotr Romańczyk, dr inż. Andrzej Roszkowski, dr hab. Lucyna Rotter, dr Monika Różańska-Boczula, dr inż. Jarosław Rubacha, dr inż. Maciej Rumiński, dr inż. Bogdan Ruszczak, dr hab. Justyna Rybak, dr hab. Stanisław Rybicki, dr Liliana Rytel, dr inż. Martyna Rzelewska, dr inż. Beata Sadowska, prof. dr hab. Zygmunt Sadowski, dr Artur Sajnog, dr Rafał Sawicki, dr hab. inż. Gabriela Siawrys, dr hab. inż. Jarosław Sidun, dr Grzegorz Siebielec, dr hab. inż. Waldemar Skomudek, dr hab. Agnieszka Skowrońska, prof. dr hab. Wojciech Skóra, prof. dr hab. Elżbieta Skrzypek, dr inż. Grzegorz Sławiński, dr hab. Beata Smolik, dr Marta Sobańska, prof. dr hab. Wojciech Sońta, dr hab. inż. Michał Stosiak, dr hab. Maria Straś-Romanowska, dr hab. Alicja Sułek, dr hab. Lech Szczegół, dr inż. Mirosława Szewczyk, dr Sebastian Szklener, dr Agnieszka Szkuclarek, dr Łukasz Szleszkowski, dr hab. Magdalena Zulc-Brzozowska, dr hab. Józef Szymanski, dr Lidia Szymczak-Mazur, prof. dr hab. inż. Adam Maria Szymski, dr inż. Małgorzata Śmist, dr hab. Janusz Świniarski, dr hab. Bożena Targońska-Stępnia, prof. dr hab. inż. Elżbieta Trocka-Leszczynska, prof. dr hab. Paweł Turzyński, dr inż. Lechosław Tuz, dr hab. Witold Tyborowski, dr inż. Ewa Ura-Bińczyk, dr inż. Krystyna Urbańska, dr inż. Urszula Warzyńska, dr hab. Adam Waśko, dr inż. Dariusz Wawrentowicz, dr hab. Adrian Wiater, dr hab. Jacek Wilczyński, dr Lidia Anna Wiśniewska, dr hab. Piotr Wiśniewski, dr inż. Agnieszka Witecka, dr Wojciech Witkowski, dr inż. Alicja Wodnicka, dr Krzysztof Kamil Wojtanowski, dr hab. Filip Wolański, dr Łukasz Wolko, dr hab. Karolina Wójcik, prof. dr hab. Maria Wróbel, dr inż. Joanna Wyczarska-Kokot, dr Adrian Zajac, dr hab. Przemysław Zalewski, dr hab. Jerzy Zalewski, dr hab. Bożena Zawadzka, prof. dr hab. Anna Zdziennicka, prof. dr hab. Piotr Ziółkowski, prof. dr hab. Dariusz Zlotkowski, dr inż. Maciej Zwierzchowski

W kolekcji „Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce” (ISBN 978-83-65677-93-8) ukazały się:

1. Nauki przyrodnicze - Część I – Żywnienie i żywność
(online: ISBN 978-83-65917-96-6; druk: ISBN 978-83-65917-97-3)
2. Nauki przyrodnicze - Część II (online: ISBN 978-83-65917-99-7; druk: ISBN 978-83-65917-98-0)
3. Nauki przyrodnicze - Część III (online: ISBN 978-83-66139-00-8; druk: ISBN 978-83-66139-01-5)
4. Nauki przyrodnicze - Część IV (online: ISBN 978-83-66139-03-9; druk: ISBN 978-83-66139-02-2)
5. Nauki przyrodnicze - Część V (online: ISBN 978-83-66139-04-6; druk: ISBN 978-83-66139-05-3)
6. Nauki przyrodnicze - Część VI – Ochrona środowiska
(online: ISBN 978-83-66139-07-7; druk: ISBN 978-83-66139-06-0)
7. Nauki medyczne i nauki o zdrowiu - Część I (online: ISBN 978-83-65917-92-8; druk: ISBN 978-83-65917-93-5)
8. Nauki medyczne i nauki o zdrowiu - Część II (online: ISBN 978-83-65917-95-9; druk: ISBN 978-83-65917-94-2)
9. Nauki techniczne i inżynierskie - Część I – Budownictwo i architektura
(online: ISBN 978-83-66139-08-4; druk: ISBN 978-83-66139-09-1)
10. Nauki techniczne i inżynierskie - Część II (online: ISBN 978-83-66139-11-4; druk: ISBN 978-83-66139-10-7)
11. Nauki techniczne i inżynierskie - Część III (online: ISBN 978-83-66139-12-1; druk: ISBN 978-83-66139-13-8)
12. Nauki techniczne i inżynierskie - Część IV (online: ISBN 978-83-66139-15-2; druk: ISBN 978-83-66139-14-5)
13. Nauki techniczne i inżynierskie - Część V (online: ISBN 978-83-66139-16-9; druk: ISBN 978-83-66139-17-6)
14. Nauki humanistyczne i społeczne - Część I (online: ISBN 978-83-65917-83-6; druk: ISBN 978-83-65917-82-9)
15. Nauki humanistyczne i społeczne - Część II – Ekonomia, działalność gospodarcza i bankowość
(online: ISBN 978-83-65917-84-3; druk: ISBN 978-83-65917-85-0)
16. Nauki humanistyczne i społeczne - Część III (online: ISBN 978-83-65917-86-7; druk: ISBN 978-83-65917-87-4)
17. Nauki humanistyczne i społeczne - Część IV – Pedagogika, edukacja, rodzina
(online: ISBN 978-83-65917-89-8; druk: ISBN 978-83-65917-88-1)
18. Nauki humanistyczne i społeczne - Część V – Prawo i administracja
(online: ISBN 978-83-65917-90-4; druk: ISBN 978-83-65917-91-1)