

# **Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce**

## **Ochrona środowiska**



[www.mlodzinaukowcy.com](http://www.mlodzinaukowcy.com)

Poznań 2021

**Redakcja naukowa**

dr Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

**Wydawca**

Młodzi Naukowcy

[www.mlodzinaukowcy.com](http://www.mlodzinaukowcy.com)

[wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com](mailto:wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com)

**ISBN (całość 978-83-66392-91-5)**

**ISBN (wydanie online 978-83-66743-41-0)**

**ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-42-7)**

Ilość znaków w książce: 327 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 8.2

Data wydania: maj 2021

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

## Spis treści

<b>1. Nowe zastosowanie sinic <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002 w bioinżynierii</b>	<b>7</b>
<i>Paulina Siedlecka, Agata Goryluk-Salmonowicz</i>	
<b>2. Zastosowanie technik mikroekstrakcyjnych w oznaczaniu benzofenonów w próbach wody – część I</b>	<b>14</b>
<i>Narloch Izabela, Wejnerowska Grażyna</i>	
<b>3. Zastosowanie technik mikroekstrakcyjnych w oznaczaniu benzofenonów w próbach wody – część II</b>	<b>22</b>
<i>Narloch Izabela, Wejnerowska Grażyna</i>	
<b>4. Rozpraszanie fosforu narastającym zagrożeniem dla środowiska</b>	<b>29</b>
<i>Krzysztof Pawelec</i>	
<b>5. Popularne biotesty bakteryjne stosowane w badaniach ekotoksykologicznych</b>	<b>38</b>
<i>Damian Pielorz, Ewa Adamek</i>	
<b>6. Enzymy jako wyznaczniki jakości gleby</b>	<b>46</b>
<i>Rachwał Kamila, Skrzypczak Katarzyna</i>	
<b>7. Wpływ konwencjonalnego i ekologicznego systemu upraw na społeczność mikroorganizmów glebowych</b>	<b>52</b>
<i>Rachwał Kamila</i>	
<b>8. Functional hydrogels in agriculture and gardening</b>	<b>59</b>
<i>Paula Stachowska, Karolina Labus</i>	
<b>9. Ocena zanieczyszczenia osadów dennych metalami ciężkimi oraz analiza potencjalnego ryzyka ekologicznego stwarzanego przez te pierwiastki na przykładzie zbiornika zaporowego Kozłowa Góra (województwo śląskie, Polska) - studium przypadku</b>	<b>66</b>
<i>Tytła Malwina, Kernert Joanna</i>	
<b>10. Obecność w środowisku leków stosowanych w psychiatrii</b>	<b>74</b>
<i>Dawid Wardecki, Ewa Adamek</i>	
<b>11. Mikroorganizmy a zmiany klimatyczne - wpływ i zagrożenia</b>	<b>81</b>
<i>Aleksandra Wichrowska, Joanna Banasiewicz</i>	
<b>12. Zanieczyszczenie środowiska estrogenami</b>	<b>87</b>
<i>Marta Wiejak, Ewa Adamek</i>	



## Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika monografię dotyczącą prac badawczych związanych z ochroną środowiska. Prezentowana monografia składa się z 12 rozdziałów tematycznie związanych z funkcjonowaniem środowiska, a więc i także z jego ochroną.

Pierwszy z rozdziałów dotyczy bioinżynierii, a w szczególności bardzo interesującej technologii zastosowania sinic do tworzenia biobetonu. Jak wiadomo proces produkcji cementu jest źródłem ditlenku węgla, który ulatuje do atmosfery nasilając efekt cieplarniany. Zastąpienie zatem cementu i wytwarzanie betonu w inny sposób byłby bardzo korzystny dla środowiska. Takim właśnie materiałem, mógłby być składający się z piasku, żelatyny i cyjanobakterii „żywy beton”. Co prawda opisywana w artykule technologia wykorzystywana jest dotychczas tylko laboratoryjnie, jednak w przyszłości być może znajdzie masowe zastosowanie.

Wraz ze wzrostem dostępności leków i ilości ich produkcji pojawił się problem z występowaniem leków w środowisku, w tym w żywności i wodzie. Ten sam problem występuje w stosunku do leków psychoaktywnych, gdyż wzrost ich konsumpcji w ostatnich dziesięcioleciach przyczynia się do generowania coraz większej liczby odpadów farmaceutycznych. Nie są stosowane też skuteczne metody eliminacji farmaceutyków w oczyszczalniach ścieków. Leki psychoaktywne są szczególnie niebezpieczne, ponieważ negatywnie oddziałują na system nerwowy i zachowania gatunków. Problemowi poświęcono jeden z rozdziałów monografii, niestety nie ma jednego skutecznego sposobu na eliminację leków ze środowiska, działania muszą być wielotorowe i dotyczyć ścisłej kontroli odpadów jak i skuteczniejszej ich neutralizacji w ściekach.

W kolejnym rozdziale opisano problem bliźniaczo podobny do wspomnianego powyżej, a mianowicie rozprzestrzenianie się estrogenów w środowisku, które bardzo niekorzystnie wpływają na organizmy wodne. Ich działanie jest addytywne i skutki mogą się pojawić, nawet gdy stężenie poszczególnych związków jest poniżej możliwości wywołania zagrożeń.

Zmiany klimatyczne stanowią niewątpliwie wyzwanie obecnych czasów. Wpływają one na całe środowisko, wpływają także na mikroorganizmy, jak reagują, i to jak przystosują się one do nowego środowiska. Równowaga między wychwytywaniem, a produkcją przez mikroorganizmy gazów cieplarnianych może zostać łatwo zachwiana i może być czynnikiem nadającym zmianom klimatu szybsze tempo. Inna, związana ze zmianami klimatycznym jest możliwa coraz szybsza transmisja czynników zakaźnych. Drobnoustroje patogenne, zyskują odpowiednie środowisko do szybszego namnażania się i mogą stanowić istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Jak wynika z rozdziału o tej tematyce, brak przygotowania do szybkiej reakcji, może powodować skutki podobne do pandemii COVID-19.

Powyżej przedstawiłem tylko kilka wybrane zagadnienia poruszane w monografii z zakresu ochrony środowiska. Większość rozdziałów ma charakter przeglądowy, ale warto je przeczytać aby poznać najnowsze trendy w badaniach dotyczących ochrony środowiska. Ja uważam, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa Młodzi Naukowcy, pozwoli im efektywnie doskonalić swój warsztat pracy.

dr hab. Jacek Leśny  
prof UPWR



## **1. Nowe zastosowanie sinic *Synechococcus* sp. PCC 7002 w bioinżynierii**

New application of *Synechococcus* sp. PCC 7002 cyanobacteria in bioengineering

Paulina Siedlecka, Agata Goryluk-Salmonowicz

Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Słowa kluczowe: biotechnologia, sinice, *Synechococcus*, biobeton

### **Streszczenie**

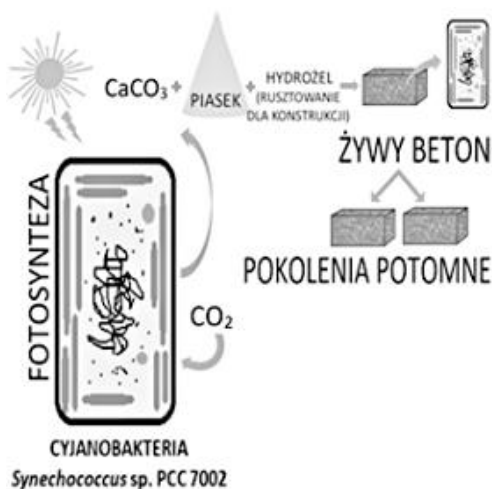
Istotnym ogólnosiwiatowym problemem jest globalne ocieplenie, do którego przyczynia się m.in. przemysł cementowy. Beton stosowany jest w budownictwie od starożytności, jednak wiadomo, że ma negatywny wpływ na środowisko. Nowym, obiecującym pomysłem jest żywy materiał budowlany skonstruowany z rusztowania piaskowo-żelatynowego oraz fotosyntetyzujących cyjanobakterii *Synechococcus* sp. PCC 7002. Sinice te cechuje wyjątkowa tolerancja na wysokie napromieniowanie światłem, szybki wzrost, zdolność do mikrobiologicznego wytrącania  $\text{CaCO}_3$ , co wzmacnia matrycę hydrożelową w biobetonie. Mikroorganizmy dodatkowo posiadają mechanizm koncentracji ditlenku węgla, pozwalający im na zwiększenie stężenia  $\text{CO}_2$  w miejscu występowania enzymu Rubisco. Biobeton reprezentuje nową klasę materiałów konstrukcyjnych i stanowi ekologiczną alternatywę dla betonu obecnie stosowanego w budownictwie. Dzięki obecności szczepu *Synechococcus*, biobeton zdolny jest do regeneracji i wytwarzania z jednego pokolenia rodzicielskiego co najmniej trzech kolejnych pokoleń potomnych. Udowodniono, iż mineralizacja  $\text{CaCO}_3$  jakościowo zwiększała się z każdym kolejnym pokoleniem. Wysoka energia pęknięcia biobetonu wskazuje na to, że materiały te mogą nadawać się w przyszłości do zastosowań, w których pożądana jest odporność na pęknięcie, np. w budownictwie. Potencjalne zastosowania obejmują: tymczasowe konstrukcje cywilne i wojskowe, kostkę brukową, okładziny elewacyjne i inne lekkie materiały nośne. Wprowadzenie żywych materiałów budowlanych na światowy rynek mogłoby skutkować zmniejszeniem zapotrzebowania na cement, w konsekwencji ograniczeniem zużycia energii oraz emisji ditlenku węgla.

### **1. Wstęp**

Niezwykle istotnym problemem światowym XXI wieku jest globalne ocieplenie. Nie jesteśmy już w stanie cofnąć procesów wynikających ze zmiany klimatu, zatem konieczne jest ograniczanie dalszej emisji gazów cieplarnianych, w tym ditlenku węgla, którego źródła emisji są różne. Emisja  $\text{CO}_2$  jest sumą emisji ze spalania paliwa oraz emisji wynikającej z procesu technologicznego wytwarzania betonu (Duda i in. 2015). Beton to materiał kluczowy dla światowej gospodarki stosowany do infrastruktury budowlanej. Przemysł cementowy, ze względu na wysokotemperaturowy proces wypalania klinkieru i znaczny udział energochłonnych procesów przemiału, należy do grupy przemysłów szczególnie energochłonnych i uciążliwych dla środowiska naturalnego. Emisja dużych ilości  $\text{CO}_2$  następuje podczas wydobycia surowców i ich przetwarzania, produkcji klinkieru i produkcji betonu, ponadto w trakcie budowy, rozbiórki i recyklingu oraz transportu. Produkcja cementu, która wykorzystuje ogromne ilości ciepła i energii, stanowi 5% całkowitej emisji  $\text{CO}_2$  do atmosfery (Środa 2019). Ograniczenie globalnego ocieplenia można osiągnąć poprzez recykling materiałów budowlanych i poszukiwanie ich ekologicznych odpowiedników. Emisje gazów cieplarnianych można zmniejszyć za pomocą materiałów budowlanych, które wymagają mniejszej ilości energii do ich produkcji. Koncepcja budownictwa przyjaznego dla środowiska opiera się na zasadach biomimetyki, czyli, w tym przypadku, na znalezieniu naturalnego materiału o dużej wytrzymałości i właściwościach samoczyszczących. Naukowcy z Uniwersytetu w Kolorado mają pomysł na możliwość uzyskania biologicznego materiału budowlanego. Do jego konstrukcji użyli piasku, żelatyny i cyjanobakterii, a uzyskany materiał nazwali „żywym betonem” (Heveran i in. 2020).

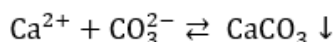
## 2. Opis zagadnienia – Metoda wytwarzania biobetonu

Biobeton, tzw. LBM (ang. Living building materials) skonstruowano z wykorzystaniem piasku, żelatyny oraz mikroorganizmów (Rys. 1). Jako żywy komponent, odporny na zmiany warunków środowiskowych (np. temperaturę, pH, światło, wilgoć, ciśnienie) zastosowano do tego doświadczenia szczep sinicy *Synechococcus* sp. PCC 7002. Rusztowania z piasku i hydrożelu strukturalnie podtrzymywało żywy składnik LBM - *Synechococcus* sp. PCC 7002. Żelatyna łączyła cząstki piasku i stanowiła podłoże do mineralizacji, natomiast szczep *Synechococcus* utwardzał matrycę hydrożelową poprzez biomineralizację  $\text{CaCO}_3$  tzw. strącanie indukowane mikrobiologicznie (MICP, ang. Microbiologically induced calcium carbonate precipitation) (Heveran i in. 2020; Zehner i in. 2020).



**Rys.1.** Wytwarzanie biobetonu przy udziale sinicy *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Mikrobiologiczne strącanie  $\text{CaCO}_3$  zachodzi w efekcie procesu fotosyntezy. Cyjanobakterie są organizmami fotosyntezującymi, zatem posiadają enzym RuBisCO (karboksylaza rybulozo-1,5-bisfosforanu) odpowiedzialny za katalizowanie reakcji wiązania  $\text{CO}_2$  do RuBP w pierwszym etapie cyklu Calvina-Bensona. Enzym ten wykorzystywany jest także przez cyjanobakterie z rodzaju *Synechococcus*. W środowisku o niskiej emisji  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$  konkuruje o miejsce aktywne enzymu i wiąże się z nim, przyczyniając się do zmniejszenia wydajności karboksylacji  $\text{CO}_2$ . *Synechococcus* sp. pokonuje ograniczenie koncentrując  $\text{HCO}_3^-$  z podłoża do  $\text{CO}_2$  będącego w komórce i transportuje  $\text{OH}^-$  na zewnątrz komórki, zwiększając w ten sposób odczyn środowiska i sprzyjając wytrącaniu się  $\text{CaCO}_3$ . Jak wiadomo, sinice posiadają mechanizm koncentracji  $\text{CO}_2$ , tzw. CCM (ang.  $\text{CO}_2$ -concentrating mechanism), składający się z dwóch głównych komponentów: układów wychwytu  $\text{C}_i$  i karboksosomów (wyspecjalizowanych białkowych subkomórkowych kompartmentów). Mechanizm koncentracji  $\text{CO}_2$  jest ważnym procesem biologicznym, maksymalizującym efektywność wychwytu węgla nieorganicznego oraz wiązania  $\text{CO}_2$  przez cyjanobakterie. W pobliżu miejsca aktywnego Rubisco podnosi on poziom  $\text{CO}_2$ , co prowadzi do zwiększenia wydajności fotosyntezy. CCM umożliwia przystosowanie się cyjanobakterii do różnorodnych środowisk, a w szczególności środowisk z ograniczoną ilością  $\text{CO}_2$  (Heveran i in. 2020; Klanchui i in. 2017;). W efekcie fotosyntezy, która ma związek z asymilacją  $\text{CO}_2$ , zachodzi proces mikrobiologicznego wytrącania  $\text{CaCO}_3$ .



Do skonstruowania LBM użyto miejscowego piasku rzeczno pochodzącego z Boulder w Kolorado. Piasek przesiewano do rozmiaru ziaren w zakresie od 1,18 mm do 2,36 mm, następnie dodawano 4% HCl przez 24 h i płukano wodą destylowaną do momentu, aż pH osiągnie wartość 7. Tak



przygotowany piasek wymieszano z żelatyną, ponieważ jej temperatura topnienia wynosząca 37°C jest kompatybilna z żywotnością bakterii, ale również dlatego, że rusztowania żelatynowe nabierają wytrzymałości poprzez fizyczne usieciowanie podczas odwodnienia. Materiał ten uzyskuje integralność strukturalną poprzez wysychanie. W dalszym etapie ochłodzono LBM, w celu utworzenia trójwymiarowej sieci hydrożelowej wzmocnionej biogennym CaCO<sub>3</sub>. Aby zapewnić stałą żywotność komórek cyjanobakterii i wytrącanie CaCO<sub>3</sub>, utrzymywano je w standardowej pożywce A+ z dodatkiem 1 mM tiosiarczanu sodu oraz 1,5% agaru (Heveran i in. 2020). Inkubowano *Synechococcus* w 50 mL pożywki ALS (bez NaCl) zmieszanej z 10% rozpuszczoną żelatyną (ALS-żel). Pożywkę ALS-żel stworzono poprzez modyfikację pożywki A+ w taki sposób, aby zawierała wystarczającą ilość składników odżywczych do utrzymania żywotności komórek, a jednocześnie zmniejszała tendencję do opadania halitu, którego głównym komponentem jest NaCl (Heveran i in. 2020). Żywotność drobnoustrojów w LBM utrzymywanych w wilgotności względnej (co najmniej 50% przez 30 dni) wynosiła 9%-14%, co według Profesora Heveran i jego zespołu, w porównaniu z danymi literaturowymi, znacznie przekraczało żywotność drobnoustrojów zamkniętych w materiałach cementowych (0,1%-0,4%) (Bundur i in. 2017). LBM jak i kontrole abiotyczne miały wytrzymałość zbliżoną do minimalnej dopuszczalnej wytrzymałości dla zwykłych zapraw na bazie cementu portlandzkiego (3,5 MPa). Większa żywotność LBM może wynikać z braku trudnych warunków panujących wewnątrz masy cementowej podczas jej nawadniania egzotermicznego, jakimi są: wysoki odczyn (pH >12), wysoka siła jonowa, podwyższona temperatura i wyczerpywanie się składników odżywczych (Heveran i in. 2020).

Przygotowując LBM naukowcy przeprowadzili eksperyment w różnych warunkach fizycznych środowiska. Zmiany temperatury i wilgotności zostały wykorzystane do regulacji aktywności metabolicznej mikroorganizmów jak i wyhodowania trzech kolejnych żywych pokoleń potomnych LBM z jednego pokolenia rodzicielskiego. Po wykorzystaniu materiału konstrukcyjnego można było poddać go recyklingowi w celu odtworzenia nowych LBM. Co najmniej trzy kolejne generacje LBM z żywymi *Synechococcus sp.* PCC 7002 zostały zregenerowane z jednej generacji pokolenia rodzicielskiego. Zdolność regeneracyjna LBM wykazuje potencjał do wykładniczego wzrostu w produkcji materiałów budowlanych. Dla każdej kolejnej generacji jeden LBM z poprzedniej generacji był uzupełniany o nowe podłoże abiotyczne i piasek, tworząc dwa nowe LBM. W ten sposób, w trzech pokoleniach, jeden LBM utworzył osiem nowych kostek żywego betonu z jednego macierzystego inokulum mikrobiologicznego. Mineralizacja CaCO<sub>3</sub> jakościowo zwiększała się z każdym kolejnym pokoleniem (Heveran i in. 2020).

Eksperyment przeprowadzono w optymalnej temperaturze inkubacji i wzrostu sinic (37°C), która była wystarczająca do rozpuszczenia macierzy żelatynowej, pobudzenia aktywności metabolicznej bakterii oraz wytrącania się minerałów. Z kolei zastosowana niska temperatura, powodująca powstawanie trwałego LBM (żelatyna zastyga i tworzy trwałe kompleksy z sinicami i podłożem), odpowiadała temperaturze przechowywania (4°C). W tej temperaturze matryca żelatynowa skutecznie zamocowała cyjanobakterie i podłoże tworząc stały LBM. Cyjanobakterie pozostawały żywotne w temperaturze przechowywania tak długo, jak długo wilgotność była wystarczająca, aby zapobiec nadmiernemu wysuszeniu komórek (50%-100% RH). Co ważne, 50% wilgotność względna powietrza była podobnie skuteczna w utrzymaniu żywotności sinic, jak 100% wilgotność względna powietrza. Odkrycie to ma istotne znaczenie w budownictwie, ponieważ wiele obszarów na globie ziemskim znajduje się w strefie klimatu, który charakteryzuje się co najmniej 50% wilgotnością względną powietrza. Te informacje mogą przyczynić się do rozpowszechnienia użyteczności LBM w celu wykorzystania ich do wielu zaawansowanych zastosowań (Heveran i in. 2020).

### **3. Przegląd literatury - Pochodzenie, budowa i charakterystyka cyjanobakterii**

Cyjanobakterie, potocznie nazywane sinicami, są uznawane przez badaczy za najodleglejsze ewolucyjnie formy życia, powstałe około 3,5 mld lat temu (Thajuddin i Subramanian 2005). Jak podają źródła jest to najliczniejsza grupa spośród Gram-ujemnych prokariotów oraz bardzo zróżnicowana pod względem morfologicznym: jednokomórkowe, kolonijne, wielokomórkowe w postaci nici i trychomów. Odgrywają znaczącą rolę w teorii o powstaniu życia na Ziemi. Ich

zdolność do przeprowadzania procesu fotosyntezy sprawiła, że były odpowiedzialne za powstanie ziemskiej atmosfery tlenowej 2200-2400 mln lat temu (Meriluoto i in. 2017). Uważa się również, że komórki eukariotyczne ewoluowały od prokariotycznych przodków. Tłumaczy to teoria endosymbiozy, według której mitochondria powstały z proteobakterii, zaś chloroplasty z sinic. Proces, w którym komórka eukarionta wchłonęła komórki sinic, a następnie doszło do ich przekształcenia w plastydy to endosymbioza pierwotna. Badania filogenetyczne potwierdzają, że chloroplast roślinny pochodzi z endosymbiozy z cyjanobakterii. Obecnie wiadomo, iż dwie błony komórkowe jakie posiadają plastydy powstały z dwóch błon otaczających komórki sinic. Ponadto organella te mają swój własny genom porównywalny w odniesieniu do organizacji jak i homologii genomów sinicowych (Nowicka, Kruk 2016).

Sinice posiadają kilkuwarstwową ścianę komórkową, której głównym składnikiem jest mukopeptyd, z lipopolisacharydami (LPS) po zewnętrznej stronie. W ścianie znajdują się m.in. pory wydzielające śluz na zewnątrz, który tworzy otoczkę o niejednakowej grubości, konsystencji oraz zabarwieniu. Ponadto, pory te umożliwiają protoplastowi kontakt z otoczeniem. Otoczkę pełniącą funkcję ochronną m.in. przed wysychaniem, czy też ułatwiającą ruch ślizgowy niektórym gatunkom sinic, tworzą kwasy pektynowe oraz mukopolisacharydy. W typowo prokariotycznym protoplaście zawieszono są w cytoplazmie nukleoid, rybosomy 70 S, aparat fotosyntetyczny w postaci lamelli zebranych w tylakoidy, w które wbudowane są barwniki: chlorofil a, karotenoidy oraz ksantofile ( $\beta$ -karoten, echinenon, myksoksantyna, myksoksantofil), fikobiliny-niebieska fikocyjanina, czerwona fikoerytryna. Barwniki są w stanie przetwarzać energię słoneczną w chemiczną, tworząc związki organiczne z ditlenku węgla i wody w procesie fotosyntezy. Poza tym obecne są wakuole gazowe, których wnętrze wypełnione jest gazem o składzie jakościowym podobnym do tego jaki jest w otoczeniu ( $O_2$ ,  $N_2$ ,  $CO_2$ ), a ich funkcją jest unoszenie się w toni wodnej oraz przypuszczalnie odbijanie, załamywanie i rozpraszanie światła, co chroni sinice przed nadmiernym promieniowaniem. W komórkach cyjanobakterii występują także różnego typu inkluzje jak na przykład ciała wielokątne, posiadające główny enzym fazy ciemnej fotosyntezy, czyli karboksylazę rybulozo-1,5-bisfosforanową odpowiedzialną za wiązanie  $CO_2$ . Inne wtręty pełniące rolę ciał zapasowych to: ziarna poliglukanu, ciała polifosforanowe (wolutyna), ziarna cyjanoficyny (gromadzące substancje zapasowe, głównie związki azotowe) oraz krople tłuszczu. Niektóre grupy sinic posiadają zdolność wiązania azotu atmosferycznego dzięki wyspecjalizowanym twórcom tzw. heterocystom (Klasik i in. 2010; Szweykowski 2011). Pewne grupy wytwarzają również wiele metabolitów wtórnych, mogących negatywnie wpływać na inne organizmy, w tym ludzi. Toksyny sinicowe można podzielić na neutrotoksyny (alkaloidy oddziałujące na układ nerwowy), hepatoksyny (działające głównie na komórki wątroby – mikrocystyny, nodularin), cytotoxyny, dermatotoksyny i lipopolisacharydy (Mazur-Marzec, Toruńska 2007). Dodatkowo efektem ubocznym działania cyjanobakterii są stromatolity (biofilmy bakteryjne) występujące w przyrodzie między innymi w Polsce – w Górach Świętokrzyskich (Chlebicki 2015).

Cyjanobakterie są organizmami kosmopolitycznymi, ponieważ wykazują szeroki zakres tolerancji na różne czynniki środowiskowe. W trakcie ewolucji wykształciły wiele cech adaptacyjnych między innymi eksportują na zewnątrz komórek polimery – głównie polisacharydy, tworzące otoczkę chroniącą przed nieodpowiednimi czynnikami środowiska, jak i pomagają w kontaktowaniu się z otoczeniem (Nonga i in. 2017). Stanowią mikroorganizmy o globalnym zasięgu, dlatego też można je spotkać praktycznie w każdej niszy ekologicznej, nawet w ekstremalnych środowiskach takich jak: obszary polarne, pustynne, źródła termalne, wieczna zmarzlina, zamrożone wody polarne Arktyki, rejony o niskim pH, alkaliczne jeziora (np. jeziora Momela i Natron w Tanzanii, gdzie dominującym składnikiem fitoplanktonu są cyjanobakterie, stanowiące podstawowy pokarm flamingów), wody słodkie, jak również w osadach dennych oraz przytwierdzone do roślin czy kamieni. Niektóre gatunki mogą żyć w symbiozie z roślinami wyższymi lub grzybami tworząc porosty (Nonga i in. 2017; Meriluoto i in. 2017).

W ostatnich latach cyjanobakterie były z powodzeniem wykorzystywane jako platforma do wytwarzania szeregu produktów o znaczeniu handlowym, w tym izoprenu (Bentley i in. 2014), izobutanolu (Atsumi i in. 2009), 2,3-butanodiolu (Oliver i in. 2013) oraz etylenu (Ungerer i in. 2012). We wszystkich przypadkach fotoasymilowany węgiel był pobierany z rodzimych szlaków

metabolicznych poprzez heterologiczną ekspresję jednego lub więcej enzymów w celu utworzenia nowych pochłaniaczy węgla. Cyjanobakterie wykorzystane są również do produkcji szerokiej gamy biomateriałów i biopaliw, które głównie pochodzą z ważnych produktów pośrednich centralnych szlaków metabolicznych, w których bardzo szerokie zastosowanie znalazły sinice należące do rodzaju *Synechococcus*.

Cyjanobakteria *Synechococcus* sp. CPP 7002 po raz pierwszy została wyizolowana w roku 1962 z ryb występujących w wodach otaczających wyspę Magueyes w Portoryko przez Van Baalena (van Baalen, 1962). *Synechococcus* sp. CPP 7002 to jednokomórkowy, euryhalinowy, czyli mający szeroki zakres tolerancji na zasolenie wody organizm fotoautotroficzny, wykorzystujący światło jako główne źródło energii, a CO<sub>2</sub> jako jedyne źródło węgla. Szczep ten stał się organizmem modelowym w badaniach metabolizmu cyjanobakterii. Okazało się, że ma ogromny potencjał biotechnologiczny, ponieważ jest zdolny do wzrostu w szerokim zakresie stężeń NaCl np. w wodzie morskiej, słonawych wodach przybrzeżnych (nie konkuruje więc o zasoby wody słodkiej) i jest odporny na wysokie napromieniowanie (Nomura i in. 2006). Jest jedną z najszybciej rosnących cyjanobakterii, gdyż, jak dowodzą naukowcy, w optymalnych warunkach (38°C, 1% (v/v) CO<sub>2</sub> w powietrzu oraz przy nasyceniu promieniowaniem ~250 μmol fotonów m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) czas podwojenia wynosi 2,6 h przy zredukowanym źródle azotu, ale także może rosnąć na glicerolu jako jedynym źródle węgla (Frigaard i in. 2004). Cechy te sprawiają, że *Synechococcus* jest również odpowiedni do stworzenia LBM (żywego materiału budowlanego), ponieważ takie materiały muszą być odporne na zmienne warunki środowiskowe. W ostatnich latach wiele produktów biologicznych zostało wyprodukowanych z udziałem szczepu *Synechococcus* sp. CPP 7002. Są to między innymi: limonen, bisabolen, kwasy tłuszczowe, mannitol, poli-3-hydroksymaślan (Davies i in., 2014; Jacobsen i Frigaard, 2014; Zhang i in. 2015). Ponadto, dziki szczep *Synechococcus* sp. CPP 7002 stał się surowcem do produkcji bioetanolu przez drożdże (Möllers i in. 2014).

#### 4. Podsumowanie

W celu ograniczenia emisji CO<sub>2</sub> potrzebne są odnawialne i przyjazne dla środowiska zamienniki.

Mikroorganizmy fotosyntetyczne stanowią alternatywne źródło biomasy z wielu powodów. Drobnoustroje te rosną znacznie szybciej niż rośliny lądowe, mają większą wydajność w wykorzystywaniu energii świetlnej, w naturalny sposób wiążą ditlenek węgla i mogą żyć w trudnych warunkach oraz mogą być hodowane na obszarach nie wykorzystywanych rolniczo. Mikroorganizmy fotosyntetyczne morskie mają przewagę w hodowlach na dużą skalę, ponieważ można je hodować w wodzie morskiej, która nie jest zdatna do spożycia przez ludzi oraz wykorzystywać do wielu zastosowań w rolnictwie. Mikroorganizmy fotosyntetyczne mogą stanowić doskonałe narzędzie wykorzystywane w bioinżynierii, przemyśle i ochronie środowiska, nie tylko w kontrolowaniu wydzielania znacznych ilości CO<sub>2</sub>, ale także w generowaniu przychodów.

Wyniki badań zespołu naukowców z Uniwersytetu w Kolorado pokazują, że nowe klasy LBM, o zdolnościach regeneracyjnych i możliwościach ponownego użycia, mogą być w przyszłości zastosowane w budownictwie. Jak sugerują naukowcy, nie mają one na celu zastąpić materiałów cementowych, lecz stanowią nową klasę materiałów, w której funkcje strukturalne są uzupełniane przez funkcje biologiczne. Wysoka energia pęknięcia LBM wskazuje na to, że materiały te mogą szczególnie dobrze nadawać się do zastosowań, w których pożądana jest odporność na pęknięcie. Potencjalne zastosowania LBM obejmują tymczasowe konstrukcje cywilne i wojskowe, kostkę brukową, okładziny elewacyjne i inne lekkie materiały nośne. Zastosowanie biomineralizacji CaCO<sub>3</sub> indukowanej przez *Synechococcus* sp. PCC 7002 jako techniki przyjaznej środowisku i energooszczędnej to perspektywiczny kierunek. Wdrożenie tej metody w przyszłości wymaga współpracy uczonych z wielu dziedzin m.in. mikrobiologów, inżynierów budownictwa, chemików. W efekcie, wprowadzenie biobetonu skutkowałoby zmniejszeniem zapotrzebowania i wykorzystania cementu, a w konsekwencji, ograniczeniem zużycia energii jak i emisji ditlenku węgla, równocześnie przyczyniając się do ograniczenia nasycenia powietrza CO<sub>2</sub> (Heveran i in. 2020).

## 5. Literatura

- Atsumi S, Higashide W, Liao JC (2009) Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nature Biotechnology* 27(12): 1177-1180.
- Bentley FK, Zurbiggen A, Melis A (2014) Heterologous expression of the mevalonic acid pathway in cyanobacteria enhances endogenous carbon partitioning to isoprene. *Molecular Plant* 7(1): 71-86.
- Bundur Z, Bae S, Kirisits M, Ferron R (2017) Biomineralization in self-healing cement-based materials: investigating the temporal evolution of microbial metabolic state and material porosity. *Journal of Materials in Civil Engineering* 29(8): 481-494.
- Chlebicki A (2015) Biofilmy występują powszechnie w przyrodzie. *Kosmos* 2(307): 337-345.
- Davies FK, Work VH, Beliaev AS, Posewitz MC (2014) Engineering limonene and bisabolene production in wild type and a glycogen-deficient mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2: 21.
- Duda J, Tomasiak J (2015) Redukcja emisji CO<sub>2</sub> w procesie produkcji cementu. Konferencja Innowacje w Zarządzaniu i Inżynierii Produkcji 384-395.
- Heveran CM, Williams SL, Qiu J et al. (2020) Biomineralization and successive regeneration of engineered living building materials. *Matter* 2(2): 481-494.
- Jacobsen JH, and Frigaard NU (2014) Engineering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO<sub>2</sub> in a cyanobacterium. *Metabolic Engineering* 21: 60-70.
- Klanhui A, Cheevadhanarak S, Prommeenate P et al. (2017) Exploring components of the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in alkaliphilic cyanobacteria through genome-based analysis. *Computational and structural biotechnology journal* 15: 340-350.
- Środa B (2019) Dekarbonizacja w przemyśle cementowym – nowe podejście. *Budownictwo, Technologie, Architektura* 2: 70-73.
- Klasik S, Maria Zych M, Kaczmarczyk-Sedla I (2010) Sinice (Cyanophyta) – systematyka, budowa komórki i znaczenie; *Spirulina platensis* i jej wpływ na organizm ludzki. *Borgis - Medycyna Rodzinna* 4:120-123.
- Mazur-Marzec H, Toruńska A (2007) Nodularyny i inne toksyny produkowane przez cyjanobakterie (sinice). *Wiadomości Chemiczne* 61(3-4): 247-277.
- Meriluoto J, Spoof L, Codd GA (2017) 1.1 Introduction. (pp. 3-5). 2.1 Introduction. (pp.11) w *Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. John Wiley & Sons.
- Möllers KB, Cannella D, Jørgensen H, Frigaard Niels-Ulrik (2014) Cyanobacterial biomass as carbohydrate and nutrient feedstock for bioethanol production by yeast fermentation. *Biotechnology for biofuels* 7(1): 1-11.
- Nonga HE, Mdegela RH, Sandvik M et al. (2016) Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in the alkaline-saline Lakes Natron and Momela, Tanzania. *Tanzania Veterinary Journal* 32(1): 108-114.
- Nomura CT, Sakamoto T, Bryant DA (2006) Roles for heme-copper oxidases in extreme high-light and oxidative stress response in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Archives of Microbiology* 185(6): 471-479.
- Nowicka B, Kruk J (2016) Fotosynteza u eukariontów, czyli krótka historia endosymbiozy. *Kosmos* 2(311): 187-195.
- Oliver JW, Machado IM, Yoneda H et al. (2013) Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(4): 1249-1254.
- Szweykowska A, Szweykowski J (2003) *Morfologia Tom 1, rozdział 2. Komórki sinic*, str. 34-37 w *Botanika. Morfologia*. PWN Warszawa.
- Thajuddin N, Subramanian G (2005) Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science* 89(1): 47-57.
- Ungerer J, Tao L, Davis M et al. (2012) Sustained photosynthetic conversion of CO<sub>2</sub> to ethylene in recombinant cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Energy & Environmental Science* 5(10): 8998-9006.
- van Baalen C (1962) Studies on marine blue-green algae. *Botanica Marina* 4(1-2), 129-139.

- Zehner J, Røyne A, Wentzel A et al. (2020) Microbial-induced calcium carbonate precipitation: an experimental toolbox for in situ and real time investigation of micro-scale pH evolution. *RSC Advances* 10(35): 20485-20493.
- Zhang S, Yang L, Bryant DA (2015) Metabolic engineering of *Synechococcus* sp. PCC 7002 to produce poly-3-hydroxybutyrate and poly-3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate. *Metabolic engineering* 32: 174-183.

## **2. Zastosowanie technik mikroekstrakcyjnych w oznaczaniu benzofenonów w próbach wody – część I**

Application of microextraction techniques in the determination of benzophenones in water samples

Narloch Izabela, Wejnerowska Grażyna

Zakład Analityki Żywności i Ochrony Środowiska, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej,  
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy  
Opiekun naukowy: dr inż. Grażyna Wejnerowska

Narloch Izabela: izabela.narloch@utp.edu.pl

Słowa kluczowe: filtry UV, zanieczyszczenia środowiska, ekstrakcja

### **Streszczenie**

Benzofenony to jedne z najbardziej popularnych filtrów UV stosowanych w celu ochrony skóry przed szkodliwym promieniowaniem ultrafioletowym. W związku z ich szerokim rozpowszechnieniem w produktach kosmetycznych oraz farmaceutycznych, duże ich ilości uwalniane są do środowiska naturalnego. W związku z tym zostały opracowane szybkie oraz proste metody mikroekstrakcyjne służące do oznaczania benzofenonów w próbach wodnych na niskich poziomach stężeń. Niniejsza praca zawiera przegląd literatury oraz teoretyczne podstawy wybranych metod mikroekstrakcyjnych umożliwiających oznaczanie benzofenonów w próbach wody.

### **1. Wstęp**

Związki promieniochronne (filtry UV) to składniki aktywne preparatów kosmetycznych oraz farmaceutycznych, jak i produktów higieny osobistej, przeznaczone do ochrony ludzkiej skóry przed negatywnymi skutkami wywoływanymi przez promieniowanie UV-A oraz UV-B. W zależności od mechanizmu działania filtry promieniochronne dzielimy na dwie grupy: organiczne (chemiczne) oraz nieorganiczne (fizyczne). Działanie filtrów chemicznych polega na absorpcji promieniowania UV, a filtrów fizycznych na jego odbiciu. Powszechnie stosuje się mieszaniny filtrów UV pokrywające zarówno zakres promieniowania UV-A, jak i UV-B. Jednymi z najpopularniejszych filtrów UV o szerokim spektrum działania są benzofenony (BPs), które ze względu na szerokie zastosowanie w kosmetykach oraz farmaceutykach zaczęły się pojawiać w środowisku naturalnym. Występowanie tych związków w środowisku skutkuje gromadzeniem się ich w organizmach żywych. Benzofenony są substancjami bardzo trwałymi w środowisku naturalnym przez co rozpatruje się je w aspekcie zanieczyszczeń. Stąd też istnieje potrzeba oznaczania zawartości tych związków w środowisku wodnym.

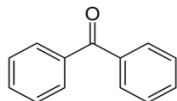
Istnieje wiele metod mikroekstrakcyjnych pozwalających na oznaczanie benzofenonów w próbach wodnych na niskich poziomach stężeń. Należą do nich zarówno techniki mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej, jak i do fazy ciekłej. W większości techniki te są zgodne z zasadami tzw. zielonej chemii analitycznej. Oznacza to, że techniki te eliminują bądź w znacznym stopniu ograniczają zużycie rozpuszczalników organicznych, zmniejszają ilość odpadów wytwarzanych podczas procedury analitycznej, a także zmniejszają praco- oraz czasochłonność postępowania analitycznego. Wszystkie metody mikroekstrakcyjne wymagają przeprowadzenia optymalizacji, tak aby dobierane parametry danej techniki pozwalały na uzyskiwanie odpowiednio wysokiej wydajności metody oraz umożliwiały oszacowanie analitów na niskich poziomach stężeń.

### **2. Opis zagadnienia**

#### **2.1 Charakterystyka benzofenonów**

W dzisiejszych czasach benzofenony oraz ich pochodne to najpopularniejsze filtry UV. Substancje te należą do chemicznych filtrów UV, które absorbują jednocześnie promieniowanie ultrafioletowe w zakresie UV-A (nadfioletu bliskiego), jak również UV-B (nadfioletu średniego).

Substancje te zaliczane są do grupy związków chemicznych - ketonów, zbudowanych z grupy karbonylowej łączącej dwa pierścienie benzenowe (Rys. 1), w budowie pochodnych benzofenonów występują dodatkowo podstawniki ulokowane w pierścieniach aromatycznych. Związki te otrzymuje się na drodze reakcji utleniania, arylowania, a także za pomocą ozonolizy (Kołodziejczyk i Dzierzbicka 2014).



**Rys. 1.** Podstawowa struktura benzofenonu (Kołodziejczyk i Dzierzbicka 2014).

Benzofenony przedostają się do środowiska wodnego dwiema ścieżkami: pośrednią oraz bezpośrednią. Do źródeł bezpośrednich gromadzenia się benzofenonów w środowisku wodnym zalicza się głównie ich zmywanie ze skóry podczas zajęć rekreacyjnych (np. podczas pływania). Do źródeł pośrednich należą ścieki domowe oraz przemysłowe, jak również ścieki pochodzące z oczyszczalni ścieków. Zdarza się, że część oczyszczonych ścieków zawierająca filtry UV zostaje ponownie wprowadzona do środowiska naturalnego, gdzie mogą się one akumulować w osadach dennych, faunie oraz florze. Poza tym wybrane benzofenony mogą ulegać fotodegradacji bądź biodegradacji w środowisku, ulegając rozkładowi na produkty transformacyjne, często o większej toksyczności i szkodliwości niż produkty pierwotne (Cadena-Aizaga i in. 2020; Giokas i in. 2007).

## 2.2 Podział technik mikroekstrakcyjnych

W literaturze (Chisvert i in. 2018) odnaleźć można wiele odmian mikroekstrakcji wykorzystywanych do oznaczania BPs w próbach wodnych. Do podstawowych technik zalicza się:

- mikroekstrakcje bazujące na sorbentach:
  - mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. Solid Phase Microextraction – SPME);
  - ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego (ang. Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE);
  - mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu (ang. Microextraction by Packed Sorbent – MEPS);
  - dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej (ang. Dispersive Solid Phase Extracion – dSPE);
  - mikroekstrakcja z pręcikiem adsorbującym (ang. Bar Adsorptive Microextraction – BAME);
  - dyspersyjna mikroekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego (ang. Stir Bar Sorptive-Dispersive Microextraction – SBS DME);
- mikroekstrakcje bazujące na rozpuszczalnikach:
  - mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (ang. Single-Drop Microextraction – SDME);
  - ekstrakcja membranowa mikroporowatą membraną w układzie ciecz-ciecz (ang. Membrane-Assisted Liquid-Liquid Extration – MALLE);
  - dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz (ang. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction – DLLME).

## 2.3 Charakterystyka wybranych technik mikroekstrakcyjnych

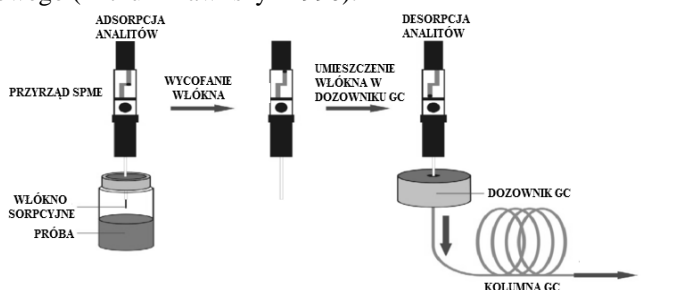
### Mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)

Opracowana w 1990 roku przez Arthura i Pawliszyna mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME) jest techniką, która zainicjowała rozwój innych technik mikroekstrakcji. Metoda ta polega na zaadsorbowaniu związków lotnych na włóknie kwarcowym bądź szklanym, które pokryte jest odpowiednio dobranym materiałem sorpcyjnym, stanowiącym tzw. fazę stacjonarną. Włókno pokryte sorbentem umieszcza się w metalowej rurce, która służy ochronie fazy stacjonarnej, jak również pozwala na przekucie membrany fiolki analitycznej oraz dozownika chromatografu. Istnieją dwie możliwości prowadzenia ekstrakcji z wykorzystaniem włókna sorpcyjnego. Pierwszym sposobem jest umieszczenie włókna bezpośrednio w analizowanej próbce wodnej (direct immersion, DI-SPME),

a drugim sposobem jest umiejscowienie włókna w gazowej fazie nadpowierzchniowej nad badaną próbą (head space, HS-SPME).

Metodę tą przeprowadza się dwuetapowo. Na początku dokonuje się adsorpcji analitów na powierzchni sorbentu. Włókno poddawane jest działaniu składników próby, a związki w niej zawarte ulegają podziałowi pomiędzy fazę stacjonarną a matrycę. Następnie przeprowadza się desorpcję termiczną w dozowniku chromatografu. Schemat przygotowania próby za pomocą mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej został przedstawiony na poniższym rysunku (Rys.2). Dodatkowo w metodzie SPME można równocześnie przeprowadzać derywatyzację, która wpływa na właściwości fizykochemiczne analitów, tj. zwiększenie lotności, zmniejszenie polarności, dzięki czemu wzrasta czułość oraz selektywność analiz. Derywatyzację analitów można wykonać bezpośrednio w matrycy lub na włóknie SPME.

Istotnym jest aby przed zastosowaniem SPME wykonać optymalizację parametrów całego procesu ekstrakcji. Dlatego też ważne jest dobranie odpowiedniego włókna sorpcyjnego, które determinuje czułość i selektywność metody, grubość powłoki sorpcyjnej wpływającej na czułość metody oraz czas ekstrakcji, rodzaju oraz ilości analizowanej próby, wartości pH, dodatku soli, czasu oraz temperatury, w której prowadzona jest ekstrakcja, parametrów desorpcji oraz warunków pracy chromatografu gazowego (Arthur i Pawliszyn 1990).



Rys. 2. Schemat przeprowadzania mikroekstrakcji SPME (Schmidt i Podmore 2015).

#### Ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego (SBSE)

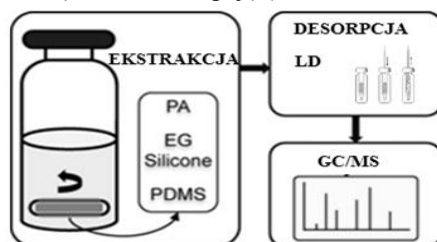
Kolejną metodą mikroekstrakcyjną do oznaczania benzofenonów w próbach wodnych jest ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego. Została ona zapoczątkowana przez Baltussena oraz współpracowników w 1999 roku i została wprowadzona pod nazwą handlową jako „twisters”.

Technika SBSE składa się z dwóch głównych etapów, jakimi są: ekstrakcja oraz desorpcja. W czasie ekstrakcji anality sorbują się na powłoce wykonanej z odpowiedniego materiału sorpcyjnego, umieszczonej na ruchomym elemencie zanurzonej w roztworze próbki. Najczęściej stosowaną powłoką sorpcyjną wykorzystywaną w technice SBSE jest polidimetylosiloksan (PDMS). Po ekstrakcji mieszadło opłukuje się wodą destylowaną i osusza ręcznikiem papierowym, a następnie dokonuje się desorpcji. Etap ten może być przeprowadzany na dwa sposoby, tj. termicznie lub rozpuszczalnikowo. Desorpcja termiczna (ang. thermal desorption, TD) pozwala na bezpośrednie wprowadzenie analitów do układu chromatograficznego oraz nie wymaga stosowania rozpuszczalników organicznych. Desorpcja z wykorzystaniem rozpuszczalnika (ang. liquid desorption, LD) wykorzystywana jest wtedy, gdy anality są substancjami labilnymi termicznie bądź gdy nie posiada się kosztownej aparatury z możliwością przeprowadzania desorpcji termicznej. Podczas desorpcji rozpuszczalnikowej mieszadło magnetyczne z powłoką sorpcyjną zanurza się w kompatybilnym z właściwościami sorbentu rozpuszczalniku bądź mieszaniną rozpuszczalników. Do najczęściej stosowanych rozpuszczalników zalicza się: metanol, acetonitryl, mieszaniny tych rozpuszczalników bądź mieszaniny z wodą. Tak przygotowaną próbę wprowadza się do dozownika chromatografu gazowego.

W celu osiągnięcia wysokiej wydajności SBSE należy zoptymalizować niektóre z parametrów tej metody, takie jak: dobór odpowiednich parametrów fazy stacjonarnej mieszadła magnetycznego (tj. rozmiaru mieszadeł oraz rodzaju powłoki sorpcyjnej), czas ekstrakcji oraz



desorpcji, temperatury desorpcji, dodatek soli, dobór oraz ilość rozpuszczalnika używanego w etapie desorpcji, a także wpływ ultradźwięków na desorpcję (Baltussen i in. 1999; Nogueira 2012).



**Rys. 3.** Schemat procesu ekstrakcji SBSE z zastosowaniem desorpcji rozpuszczalnikowej (Gilart i in. 2013).

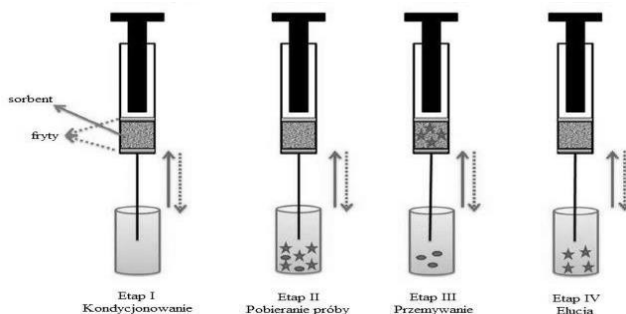
#### Mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu (MEPS)

MEPS to technika mikroekstrakcyjna opracowana w 2004 roku przez Mohameda Abdel-Rehima. Metoda ta stanowi miniaturyzację ekstrakcji do fazy stałej (SPE), w której wykorzystywane sorbenty są identyczne jak te stosowane w technice SPE. Jednakże w przeciwieństwie do wykorzystywanych w technice SPE kolumnienek, w MEPS złożo sorbentu jest bezpośrednio zintegrowane ze strzykawką, a nie jest ono odrębną kolumną. W strzykawce tej zachodzą wszystkie czynności przygotowania próby do analizy, tj. kondycjonowanie, przemywanie, sorpcja oraz elucja, a także za pomocą strzykawki możliwe jest wprowadzenie próby do instrumentu analitycznego.

Standardowy MEPS zaprojektowany jest w formie gazoszczelnej szklanej strzykawki o pojemności od 10 do 1000  $\mu$ l. W metodzie MEPS sorbent umieszcza się w strzykawce (1-4 mg) na dwa różne sposoby. Pierwszy wariant obejmuje upakowanie sorbentu w korpusie strzykawki, a w drugim sorbent występuje w postaci wkładki (naboju) pomiędzy korpusem strzykawki a igłą (tzw. metoda BIN, ang. Barrel Insert and Needle Assembly). Istnieje również możliwość zastosowania obu tych wariantów jednocześnie.

Mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu składa się z czterech głównych etapów: kondycjonowanie, pobieranie próbki, płukanie oraz elucja (Rys.4). Pierwszym etapem jest kondycjonowanie złoża, które ulega aktywowaniu przed naniesieniem próby. Następnym krokiem jest pobieranie próby, w tym celu odpowiednio dobraną ilość próby przepuszcza się w strzykawce przez sorbent, poprzez załadowanie (naciąganie) i wypuszczanie próby kilkakrotnie. Trzeci etap obejmuje przemywanie sorbentu, mające na celu usunięcie analitów, które zostały niespecyficznie na nim zatrzymane. Ostatnim etapem MEPS jest elucja, podczas której następuje uwolnienie analitów z sorbentu za pomocą odpowiednio dobranego rozpuszczalnika. Tak przygotowana próba może być poddana analizie chromatograficznej.

W celu osiągnięcia najwyższej wydajności MEPS należy zoptymalizować parametry przeprowadzania tej mikroekstrakcji. Należy dobrać między innymi rodzaj i ilość rozpuszczalnika stosowanego w etapie elucji oraz ilość próby w zależności od spodziewanego stężenia analitów, jak również sposób przeprowadzania elucji, tj. krotność wymywania analitów ze złoża (Yang i in. 2017; Moein i in. 2015).



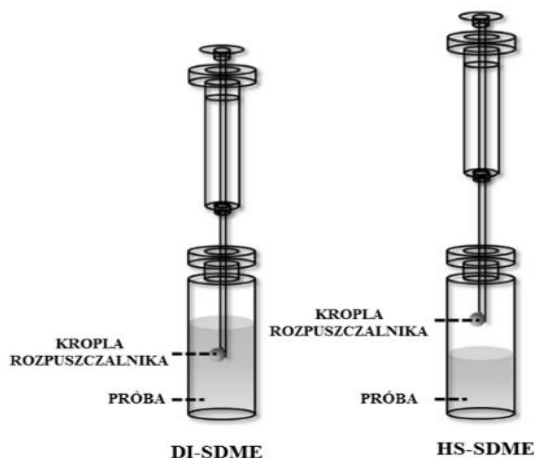
**Rys. 4.** Schemat procesu mikroekstrakcji MEPS (Yang i in. 2017).

### Mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME)

Technika SDME została opracowana w 1996 roku przez Jeannota i Cantwella. Podczas przeprowadzania mikroekstrakcji do pojedynczej kropli wykorzystuje się typową mikrostrzykawkę składającą się z korpusu, tłoka i igły, na końcu której zawieszona zostaje kropla rozpuszczalnika.

SDME składa się z kilku etapów. Na początku zasysa się do wewnątrz strzykawki 1-2  $\mu\text{l}$  rozpuszczalnika organicznego i przekłwa się igłą uszczelkę fiolki, w której umieszczona jest próba. Następnie wypycha się rozpuszczalnik, którym formuje się kroplę na końcu igły. W celu dokonania absorpcji analitów, uformowaną kroplę umieszcza się w próbce (ang. direct immersion - DI-SDME) lub nad jej powierzchnią (ang. head space – HS-SDME) (Rys.4). Kropla umieszczona w próbce musi mieć charakter niepolarny, zaś kropla formowana w fazie gazowej powinna być tworzona z rozpuszczalnika trudnolotnego. Podczas etapu absorpcji próba jest cały czas mieszana za pomocą mieszadła magnetycznego. Po zakończonej ekstrakcji kroplę rozpuszczalnika wciąga się z powrotem do wnętrza mikrostrzykawki. Znajdujące się w rozpuszczalniku anality są wprowadzane bezpośrednio do dozownika chromatografu cieczowego bądź gazowego.

Do parametrów optymalizacyjnych tej techniki należy: objętość kropli rozpuszczalnika, rodzaj rozpuszczalnika (najczęściej wybieranymi rozpuszczalnikami są heksan, toluen, izooktan), czas ekstrakcji, temperatura, intensywność mieszania, dodatek soli (Tang 2018; Jeannot 2010).

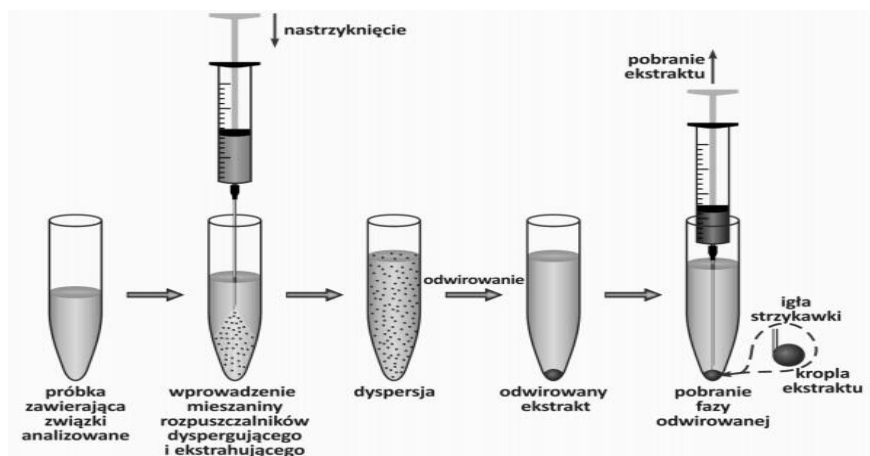


**Rys. 4.** Schemat przeprowadzania mikroekstrakcji do pojedynczej kropli (Tang i in. 2018).

### Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz (DLLME)

Technika dyspersyjnej mikroekstrakcji ciecz-ciecz została odkryta w 2006 roku przez Assadiego i współpracowników. DLLME polega na wyekstrahowaniu analitów z kilku mililitrów próby wodnej do kilkudziesięciu mikrolitrów rozpuszczalnika ekstrahującego, często w tym charakterze stosowany jest chloroform lub chlorobenzen. Całości towarzyszy obecność około jednego mililitra rozpuszczalnika dyspergującego, tj. metanol, aceton bądź acetonitryl, którego zadaniem jest poprawa rozproszenia rozpuszczalnika ekstrahującego w formie mikroskopijnych kropelek, co powoduje przyspieszenie procesu ekstrakcji. Ponadto rozpuszczalnik dyspergujący może niwelować skutek adsorpcji analitów na ściankach naczynia. Po przeprowadzonej ekstrakcji próba zostaje odwirowana, powstałą mieszaninę rozpuszczalnika ekstrahującego z analitami wykorzystuje się do analizy (Rys.5).

Optymalizacja metody DLLME obejmuje dobór rozpuszczalników: ekstrahującego oraz dyspergującego, ich odpowiednich ilości, pH próby, a także czas ekstrakcji (Zgoła-Grześkowiak 2015).



Rys. 5. Schemat przygotowania próby metodą DLLME (Zgoła-Grześkowiak 2015).

#### 2.4 Porównanie wybranych technik mikroekstrakcyjnych

W Tab. 1 zebrano najważniejsze wady i zalety opisywanych metod.

Tab. 1. Wady i zalety wybranych technik mikroekstrakcyjnych.

METODA	ZALETY	WADY
<b>SPME</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- metoda bezropuszczalnikowa</li> <li>- szybkość</li> <li>- prostota</li> <li>- szeroki zakres liniowości</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- uszkodzenia włókien (łamanie, ścieranie fazy stacjonarnej)</li> <li>- uszkodzenia igieł</li> <li>- stosunkowo duży koszt zakupu włókien</li> </ul>
<b>SBSE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prostota</li> <li>- metoda bezropuszczalnikowa (TD)</li> <li>- niskie granice oznaczalności i wykrywalności</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- duże ilości używanej próby</li> <li>- koszty zakupu mieszadeł magnetycznych</li> <li>- czaso- i pracochłonność</li> </ul>
<b>MEPS</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prostota</li> <li>- szybkość</li> <li>- możliwość automatyzacji</li> <li>- mała ilość próby</li> <li>- małe ilości rozpuszczalników</li> <li>- niskie koszty analizy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- możliwość uszkodzenia sorbentu</li> </ul>
<b>SDME</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- niskie koszty</li> <li>- bardzo małe ilości zużywanych rozpuszczalników</li> <li>- szybkość</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- niestabilność kropli (możliwość jej zerwania)</li> </ul>
<b>DLLME</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- szybkość</li> <li>- małe ilości rozpuszczalników</li> <li>- wysoki współczynnik wzbogacania</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- trudna do zautomatyzowania</li> <li>- ograniczony wybór rozpuszczalników</li> </ul>

### 3. Przegląd literatury

W Tab. 2 zostały zebrane najważniejsze parametry wybranych technik mikroekstrakcyjnych oznaczania benzofenonu-3 w próbach wodnych.

**Tab. 2.** Wybrane metody oznaczania benzofenonu-3 w próbach wodnych.

METODA EKSTAKCYJNA	SPME	SBSE	DLLME	IL-SDME*	MEPS
METODA INSTRUMENTALNA	GC-MS	HPLC-APCI-MS/MS	GC-MS	HPLC-DAD	GC-MS(EI <sup>+</sup> )
ELUENT	-	metanol	rozpuszczalnik dyspersyjny – aceton; rozpuszczalnik ekstrakcyjny – chloroform	[C <sub>6</sub> MIM][PF <sub>6</sub> ]	octan etylu
ODZYSK [%]	102	71-100	82-126	99	109
LOD [ng/l]	0,7	80	33	110	53
LOQ [ng/l]	-	25	1100	370	-
OBJĘTOŚĆ PRÓBY [μl]	7000	10000	5000	20000	800
STĘŻENIE ROZTWORU ROBOCZEGO	1 μg/l wody destylowanej	20 mg/l metanolu: wody destylowanej (80:20)	40 ng/ml wody destylowanej	500 μg/l wody destylowanej	1 ng/ml wody destylowanej
ŹRÓDŁO LITERATUROWE	(Zhang i Lee 2012)	(Nuyen i in. 2011)	(Tarazona i in. 2010)	(Vidal i in. 2010)	(Moeder i in. 2010)

\*IL-SDME – jonowa mikroekstrakcja do pojedynczej kropli

#### 4. Podsumowanie

Wzrastająca świadomość ludzi odnośnie zagrożeń związanych ze szkodliwym oddziaływaniem promieniowania UV na zdrowie człowieka spowodowała, że na rynku pojawiła się szeroka gama preparatów zawierających w swoim składzie m.in. benzofenony. Wzrost zużycia takich produktów spowodował, że związki te zaczęły pojawiać się w dużych ilościach w środowisku naturalnym. Z powodu wykazywania przez benzofenony szkodliwych właściwości na organizmy żywe wymagana jest kontrola ilości tych związków w próbach środowiskowych. Istnieje wiele tanich, szybkich oraz prostych w wykonaniu metod mikroekstrakcyjnych umożliwiających oznaczanie benzofenonów w próbach wodnych na bardzo niskich poziomach stężeń. Należą do nich wymienione powyżej mikroekstrakcja do fazy stałej, mikroekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego, mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu, mikroekstrakcja do pojedynczej kropli oraz dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz-ciecz.

#### 5. Literatura

- Arthur CL, Pawliszyn J (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62: 2145–2148
- Baltussen E, Sandra P, Davis F, Cramers C (1999) Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) a Novel Extraction technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. *J. Microcolumn Separations* 11(10): 737-747
- Cadena-Aizaga MI, Montesdeoca-Esponda S, Torres-Padron ME, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodriguez JJ (2020) Organic UV filters in marine environments: An update of analytical methodologies, occurrence and distribution. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 25: 1-3
- Chisvert A, Benedé A, Salvador A (2018) Current trends on the determination of organic UV filters in environmental water samples based on microextraction techniques – A review. *Analytica Chimica Acta* 1034: 22-38

- Gilart N, Miralles N, Marcé RM, Borull F, Fontanals N (2013) Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determinate pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 774: 51-60
- Giokas DL, Salvador A, Chisvert A (2007) UV filters: From sunscreen to human body and the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 26 (5): 215-220
- Jeannot MA, Przyjazny A, Kokosa JM (2010) Single drop microextraction – Development, applications and future trends. *Journal of Chromatography A* 1217: 2326-2334
- Kołodziejczyk A, Dzierzbicka K (2014) Podstawy Chemii Organicznej. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej 2: 21-24
- Moeder M, Schrader S, Winkler U, Rodil R (2010) At-line microextraction by packed sorbent-gas chromatography–mass spectrometry for the determination of UV filter and polycyclic musk compounds in water samples. *Journal of Chromatography A* 1217: 2925-2932
- Moein MM, Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M (2015) Microextraction by packed sorbent (MEPS). *Trends in Analytical Chemistry* 67: 34-44
- Nguyen KTN, Scapolla C, Di Carro M, Magi E (2011) Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction. *Talanta* 85 (5): 2375-2384
- Nogueira JMF (2012) Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta* 757: 1-10
- Schmidt K, Podmore I (2015) Solid Phase Microextraction (SPME) Method Development in Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCS) as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis* 6(6): 2-3
- Smyk P, Smyk E, Hołyńska-Iwan I, Olszewska-Słonina D (2016) Połączenie filtrów naturalnych i sztucznych jako najlepsze źródło ochrony przeciwsłonecznej w preparatach kosmetycznych. Wydawnictwo Uczelniane Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego: 218-221
- Tang S, Qi T, Ansah PD, Fouemina JCN, Shen W, Basheer C, Lee HK (2018) Single drop-microextraction. *Trends in Analytical Chemistry* 108: 306-313
- Tarazona I, Chisvert A, Leon Z, Salvador A (2010) Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217: 4771-4778
- Vidal L, Chisvert A, Canals A, Salvador A (2010) Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples. *Talanta* 81 (1-2): 549-555
- Yang L, Said R, Abdel-Rehim A (2017) Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. *Journal of Chromatography B* 1043: 33-43
- Zgoła-Grześkowiak A (2015) Dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz – ciecz i jej zastosowanie w oznaczaniu zanieczyszczeń środowiska i w badaniach biodegradacji. Autoreferat do wniosku habilitacyjnego.
- Zhang H, Lee HK (2012) Simultaneous determination of ultraviolet filters in aqueous samples by plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol–gel coating as sorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 742: 67-73

### **3. Zastosowanie technik mikroekstrakcyjnych w oznaczaniu benzofenonów w próbach wody – część II**

Application of microextraction techniques in the determination of benzophenones in water samples

Narloch Izabela, Wejnerowska Grażyna

Zakład Analityki Żywności i Ochrony Środowiska, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy  
Opiekun naukowy: dr inż. Grażyna Wejnerowska

Narloch Izabela: izabela.narloch@utp.edu.pl

Słowa kluczowe: filtry UV, optymalizacja, odzysk

#### **Streszczenie**

W niniejszym artykule przedstawiono wyniki optymalizacji dla wybranych metod mikroekstrakcyjnych, takich jak: mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (ang. Solid Phase Microextraction – SPME), mikroekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego (ang. Stir Bar Sorptive Extraction – SBSE) oraz mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu (ang. Microextraction by Packed Sorbent – MEPS), które znajdują zastosowanie w oznaczaniu takich zanieczyszczeń środowiska, jakimi są benzofenony (filtry UV). Dodatkowo porównano zoptymalizowane metody mikroekstrakcyjne pod kątem granic wykrywalności, odzysku oraz innych parametrów charakteryzujących metodę.

#### **1. Wstęp**

W skład procesu analitycznego wchodzi takie etapy jak: pobieranie oraz przechowywanie próby, przygotowanie próby do końcowej analizy, pomiar oraz obróbka wyników. W celu zapewnienia wiarygodności otrzymanego wyniku, należy mieć na uwadze każdy z wymienionych powyżej etapów procedury analitycznej. Jednakże to etap przygotowania próby do właściwej analizy jest najtrudniejszą oraz najbardziej pracochłonną częścią procesu analitycznego. Dodatkowo możliwość popełnienia błędu analitycznego w tym etapie jest na bardzo wysokim poziomie. Idealnie dopracowana procedura przygotowania prób do analizy powinna odznaczać się szybkością oraz prostotą wykonania, niskimi kosztami, a także kompatybilnością w połączeniu z zastosowanymi metodami analitycznymi. W związku z istotą etapu przygotowania próby do końcowej analizy w całej procedurze analitycznej, etap ten jest cały czas rozwijany oraz udoskonalany (Namieśnik 2003).

Ekstrakcja to jedna z głównych technik przygotowania próby do właściwej analizy. Umożliwia ona zarówno wyselekcjonowanie analitów z prób o złożonej matrycy, jak i ich zateżenie. Dodatkowo pozwala ona na wyeliminowanie substancji przeszkadzających z badanej próby. Już trzydzieści lat temu pojawiły się pierwsze informacje odnośnie wykonywania ekstrakcji w skali mikro. Od tego czasu zauważa się trend rozwoju mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej oraz mikroekstrakcji do fazy ciekłej. Jednym z czynników przyczyniającym się do rozwoju tych technik była potrzeba pracy z bardzo małą ilością próby poddanej badaniu. Dodatkowo na popularyzację technik mikroekstrakcyjnych wpłynęły aspekty środowiskowe oraz finansowe, a także możliwość skrócenia czasu potrzebnego na przygotowanie próby.

Do popularnych metod mikroekstrakcji stosowanych w oznaczeniach zanieczyszczeń w próbach środowiskowych, tj. benzofenony, zalicza się: mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej, mikroekstrakcję z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego oraz mikroekstrakcję do upakowanego sorbentu (Płotka-Wasyłka J i in. 2015).

Istotnym jest, aby każda z wykorzystywanych technik mikroekstrakcyjnych, była odpowiednio zoptymalizowana. Optymalizację metod mikroekstrakcyjnych stosuje się w celu wybrania prawidłowych parametrów prowadzonej analizy. Parametry metody dobiera się w taki sposób, żeby efektywność danej metody analitycznej była jak największa (Costa Ferreira i in. 2007).

## 2. Materiał i metody

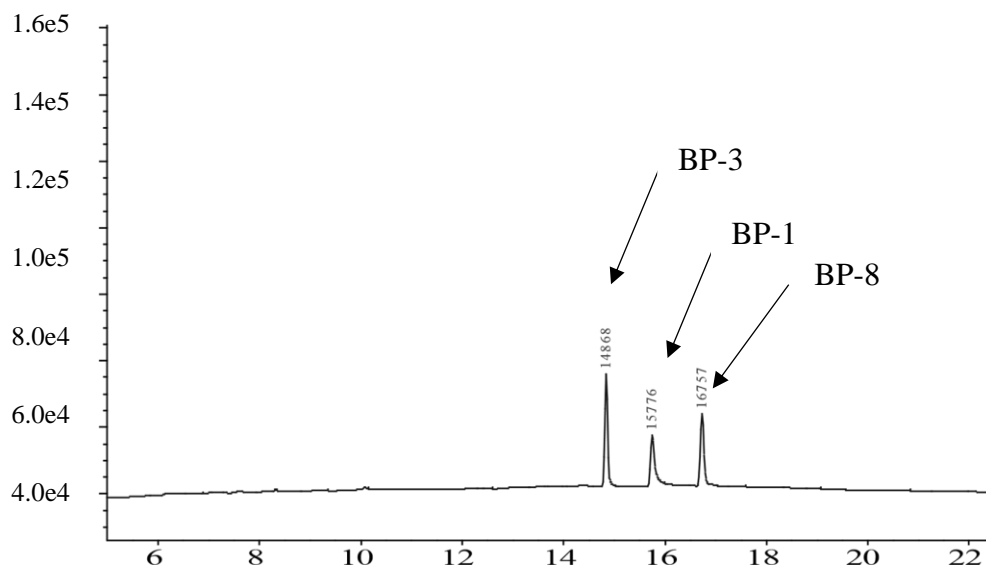
W celu przeprowadzenia badań optymalizacyjnych przygotowano roztwory wzorcowe 2-hydrokso-4-metoksybenzofenonu (benzofenonu-3) w wodzie destylowanej zakwaszone kwasem chlorowodorowym do pH~3. Następnie roztwór wzorcowy rozcieńczono i przygotowano roztwory robocze o stężeniach dostosowanych do każdej z wymienionych powyżej metod.

Badania prowadzono z wykorzystaniem chromatografu gazowego HP 5890, a jego parametry zostały przedstawione w Tab.1.

**Tab. 1.** Parametry pracy chromatografu gazowego.

Typ aparatu	chromatograf gazowy HP 5890
Detektor	detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID) detektor mas (MS)
Dozownik	split-splitless (5:1)
Kolumna	ZB-5 (30m x 0,53mm x 1,50µm) ZB-5 MS (30m x 0,25mm x 0,25µm)
Temperatura dozownika	250°C
Temperatura detektora	250°C

Na Rys. 1 został przedstawiony przykładowy chromatogram roztworu roboczego mieszaniny benzofenonów, zawierającej w swoim składzie benzofenon-3 (BP-3).



**Rys. 1.** Przykładowy chromatogram roztworu wodnego benzofenonów: 2-hydrokso-4-metoksybenzofenon (BP-3), 2,4-dihydroksobenzofenon (BP-1) oraz 2,2'-dihydrokso-4-metoksybenzofenon (BP-8).

Procedury postępowania podczas wybranych metod analitycznych są następujące:

- a) mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (SPME)

W celu przeprowadzenia mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej, do 4 ml fiolek wprowadzono roztwór roboczy, umieszczono w niej mieszadło magnetyczne, zamknięto fiolkę silikonową uszczelką i tak przygotowaną fiolkę postawiono na mieszadle magnetycznym. Kolejną silikonową uszczelką przebito stalową igłą i rozpoczęto etap ekstrakcji analitów z roztworu na włókno sorpcyjne

umieszczone w igle. Po upływie określonego czasu włókno wyjęto i wprowadzono za jego pomocą anality do dozownika chromatografu gazowego w celu przeprowadzenia analizy.

Optymalizacja mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej polegała na doborze włókna sorpcyjnego, czasu ekstrakcji oraz ilości dodatku chlorku sodu.

b) mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu (MEPS)

Pierwszym etapem mikroekstrakcji do upakowanego sorbentu było zakondycjonowanie złoża sorpcyjnego (złoże C18 w ilości ~ 8 mg, wielkości cząstek 45  $\mu\text{m}$ , wielkości porów 60  $\text{\AA}$ ) umieszczonego w strzykawce MEPS za pomocą 250  $\mu\text{l}$  mieszaniny octanu etylu i dichlorometanu (1:1) oraz 250  $\mu\text{l}$  wody destylowanej. Kolejnym krokiem jest ekstrakcja analitów z 2 ml roztworu roboczego, a następnie przemycie złoża przy użyciu 250  $\mu\text{l}$  wody destylowanej. Po tym etapie złoża sorpcyjne suszono z wykorzystaniem powietrza. Kolejno zasorbowane anality na złożu eluowano za pomocą 100  $\mu\text{l}$  octanu etylu i poddawano je analizie chromatograficznej.

W celu ustalenia najlepszych parametrów mikroekstrakcji do upakowanego sorbentu została zoptymalizowana ilość ekstrahowanego roztworu benzofenonów, a także ilość oraz rodzaj rozpuszczalnika zastosowanego do etapu elucji, dodatkowo sprawdzono wpływ krotności elucji analitów ze złoża.

c) mikroekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego (SBSE)

W celu przeprowadzenia mikroekstrakcji z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego do fiolek o pojemności 40 ml wprowadzono 20 ml roztworu roboczego. W fiolce umieszczono ruchomy element sorpcyjny (tj. mieszadełko magnetyczne składające się z pręcika magnetycznego umieszczonego w szklanej osłonce pokrytej powłoką sorpcyjną o grubości 0,5 mm oraz długości 10 mm) i rozpoczęto etap ekstrakcji analitów z roztworu do powłoki sorpcyjnej. Po upływie określonego czasu ekstrakcji, mieszadełko magnetyczne wyjmuje się z fiolki, przemywa wodą destylowaną, osusza ręcznikiem papierowym i przenosi do fiolki, w której będzie zachodził etap desorpcji z użyciem rozpuszczalnika (150  $\mu\text{l}$  metanolu) w określonym czasie. Kolejno element sorpcyjny wyjmuje się, a otrzymany ekstrakt poddaje się analizie chromatograficznej.

Podczas optymalizacji parametrów mikroekstrakcji z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego dobiera się: czas ekstrakcji oraz desorpcji, rodzaj rozpuszczalnika do etapu desorpcji, ilość dodatku chlorku sodu, temperaturę, a także rodzaj mieszadła magnetycznego.

### 3. Wyniki i dyskusja

#### 3.1 optymalizacja parametrów wybranych metod mikroekstrakcyjnych

##### ➤ mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej

- dobór włókna sorpcyjnego

Efektywność ekstrakcji benzofenonu-3 porównano stosując cztery rodzaje włókien: karboksen/polidimetylosiloksan (CAR/PDMS), polidimetylosiloksan (PDMS), polidimetylosiloksan/diwinylobenzen (PDMS/DVB) oraz poliacyetylen (PA). Najlepszymi właściwościami sorpcyjnymi odznaczał się CAR/PDMS.

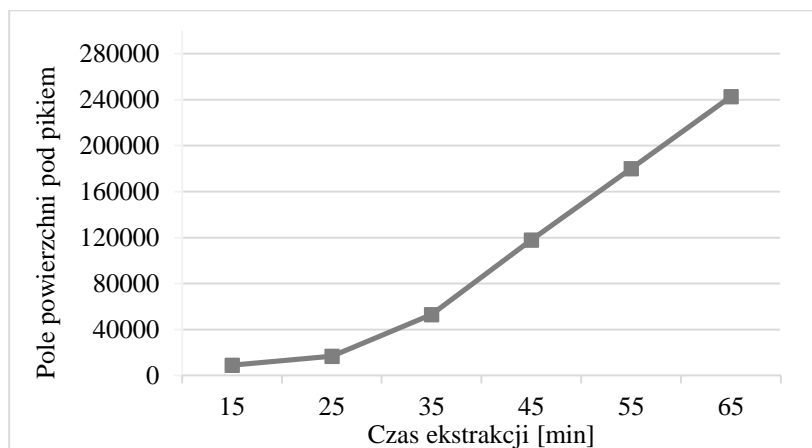
- czas ekstrakcji

Wyznaczanie czasu ekstrakcji polegało na ekspozycji włókna sorpcyjnego w roztworze benzofenonu czasie od 15 do 65 minut. Optymalnym czasem przeprowadzania ekstrakcji było 60 minut (Rys. 2).

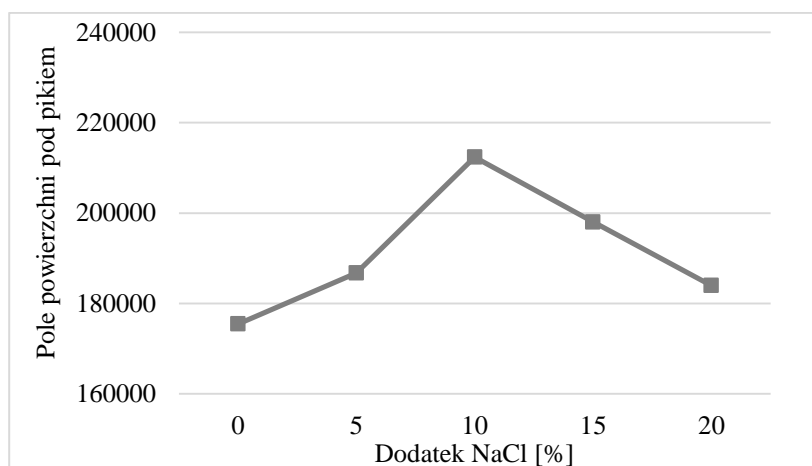
- wpływ wysalania

W celu wyznaczenia wpływu wysalania na efektywność sorpcji analitów na włóknie zastosowano następujące dodatki chlorku sodu: 0%, 5%, 10%, 15% oraz 20%. Największą efektywność sorpcji wykazano przy 10%-owym dodatku soli (Rys. 3).





**Rys. 2.** Zależność pola powierzchni benzofenonu-3 od czasu ekstrakcji.



**Rys. 3.** Zależność pola powierzchni benzofenonu-3 od wysolenia próby.

➤ mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu

- rodzaj rozpuszczalnika użytego do etapu elucji

W celu doboru odpowiedniego rozpuszczalnika do etapu elucji analitów ze złoża sorpcyjnego wykonano ekstrakcję analitów, a następnie przeprowadzono elucję z wykorzystaniem: octanu etylu, dichlorometanu oraz mieszaniny tych rozpuszczalników. Największą efektywność sorpcji wykazywał octan etylu (Rys. 4).

- krotność elucji analitów ze złoża

Zbadano wpływ krotności elucji analitów ze złoża za pomocą octanu etylu na dwa sposoby: jednokrotnie – 1 x 100 µl rozpuszczalnika oraz dwukrotnie – 2 x 50 µl rozpuszczalnika. Stwierdzono, że większa ilość cykli wymywania analitów ze złoża zwiększa procentowy odzysk analitów (Rys. 5).

- ilość wodnego roztworu benzofenonu-3 oraz ilość rozpuszczalnika potrzebnego do etapu elucji

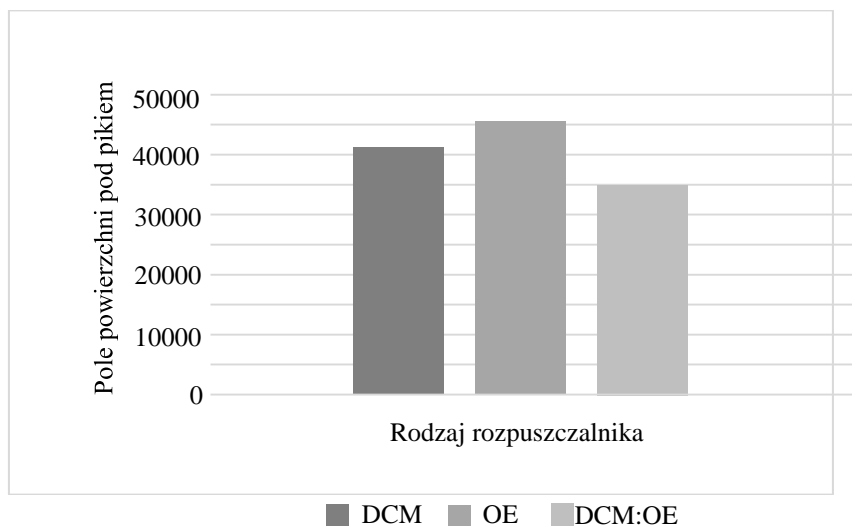
W celu wyznaczenia powyższych parametrów zastosowano 4 różne kombinacje, mianowicie użyto:

- 1 ml wodnego r-ru benzofenonu-3 / 50 µl rozpuszczalnika do etapu elucji;

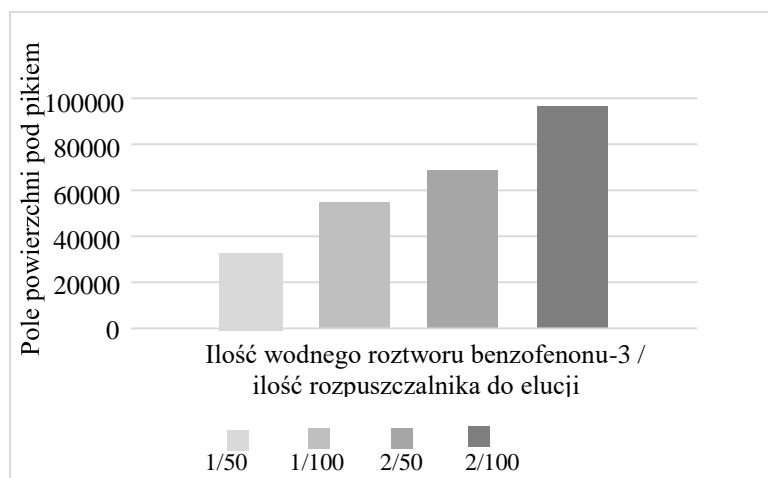
- 1 ml wodnego r-ru benzofenonu-3 / 100  $\mu$ l rozpuszczalnika do etapu elucji;
- 2 ml wodnego r-ru benzofenonu-3 / 50  $\mu$ l rozpuszczalnika do etapu elucji;
- 2 ml wodnego r-ru benzofenonu-3 / 100  $\mu$ l rozpuszczalnika do etapu elucji.

Zastosowano 1 oraz 2 ml próby w celu sprawdzenia czy nie występowało przeładowanie złoża przy zastosowanym stężeniu roztworu roboczego.

Najwydajniejszym rozwiązaniem jest zastosowanie 2 ml wodnego roztworu próby oraz 100  $\mu$ l rozpuszczalnika do etapu elucji.



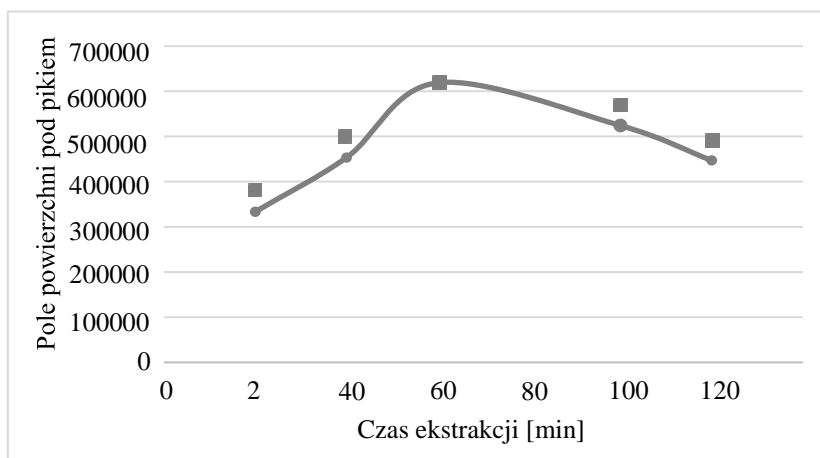
Rys. 4. Zależność pola powierzchni piku benzofenonu-3 od rodzaju użytego do elucji rozpuszczalnika w ilości 100  $\mu$ l.



Rys. 5. Wpływ ilości wodnego roztworu benzofenonu-3 oraz ilość eluenta (OE) na efektywność ekstrakcji

- mikroekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego
  - czas ekstrakcji  
W celu wyznaczenia optymalnego czasu ekstrakcji, badaną próbkę poddano etapowi ekstrakcji z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego w czasie 20 min, 40 min, 60 min, 80 min, 100 min i 120 min. Jak wynika z Rys. 6. po upływie jednej

godziny nastąpił stan równowagi, na powłoce zaadsorbowała się największa ilość analitów.



Rys. 6. Zależność pola powierzchni benzofenonu-3 od czasu ekstrakcji

- czas desorpcji oraz rodzaj zastosowanego rozpuszczalnika

Do wyznaczenia optymalnego czasu desorpcji oraz rodzaju użytego rozpuszczalnika zastosowano następujące możliwości:

- metanol / 15 minut;
- acetonitryl / 15 minut;
- metanol + dichlorometan / 15 minut;
- metanol / 30 minut;
- acetonitryl / 30 minut;
- metanol + dichlorometan / 30 minut.

Najwyższą wydajnością uzyskano stosując mieszaninę metanolu z dichlorometanem (1:1) w czasie 15 minut.

### 3.2 wyniki optymalizacji wybranych metod mikroekstrakcyjnych

W Tab. 2 zostały zebrane wyniki optymalizacji wybranych metod mikroekstrakcyjnych znajdujących zastosowanie w oznaczaniu benzofenonów w próbach wodnych.

Tab. 2. Wyniki optymalizacji parametrów metod ekstrakcyjnych

PARAMETR	MEPS	SBSE	SPME
objętość próby	2 ml	20 ml	4 ml
czas ekstrakcji	ok. 5 minut	60 minut	60 minut
rodzaj zastosowanego sorbentu	C18	PDMS	CAR/PDMS
Wysalanie	-	10% dodatek NaCl	10% dodatek NaCl
rodzaj rozpuszczalnika użytego do desorpcji	octan etylu	metanol	-
ilość rozpuszczalnika użytego do desorpcji	2 x 50 µl	150 µl	-

3.3 wyniki uzyskanych granic wykrywalności oraz wyznaczone odzyski dla wybranych metod mikroekstrakcyjnych

W Tab. 3 zostały przedstawione uzyskane granice wykrywalności oraz odzyski dla wybranych metod mikroekstrakcyjnych podczas oznaczania benzofenonu-3 w próbach wodnych.

**Tab. 3.** Wyniki uzyskanych granic wykrywalności oraz wyznaczonych odzysków wybranych metod mikroekstrakcyjnych.

PARAMETR	MEPS	SBSE	SPME
granica oznaczalności*	671 µg/l	8,7 µg/l	2,9 µg/l
odzysk [%]	90	99	-

\*wyznaczone za pomocą chromatografu gazowego sprzężonego z detektorem mas w trybie SIM (GC-MS)

#### 4. Wnioski

W niniejszej pracy przedstawione zostały wyniki optymalizacji parametrów wybranych metod mikroekstrakcyjnych, tj. mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej, mikroekstrakcji do upakowanego sorbentu oraz mikroekstrakcji z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego. Wszystkie z wymienionych metod są odpowiednie do oznaczania benzofenonów w próbach wodnych. Metody SPME, MEPS oraz SBSE należą do prostych, tanich oraz zużywających małe ilości rozpuszczalników technik mikroekstrakcyjnych.

Z optymalizacji metody SPME wynika, że najlepszymi właściwościami sorpcyjnymi odznacza się włókno wykonane z CAR/PDMS, objętość próby do ekstrakcji to 4 ml, a czas ekstrakcji to jedna godzina. Dodatkowo technika ta jest całkowicie bezrozsączalnikowa. Technika SBSE wykorzystuje jako sorbent analitów mieszało magnetyczne pokryte PDMS, optymalna ilość próby to 20 ml, a czas ekstrakcji 60 minut. W etapie desorpcji wykorzystuje się 150 µl metanolu. Metoda MEPS w porównaniu do SBSE oraz SPME, wykorzystuje najmniejszą ilość próby (2 ml), a jej czas ekstrakcji jest najkrótszy, tj. około 5 minut. W metodzie tej optymalne jest zastosowanie 100 µl octanu etylu w etapie elucji. Uzyskane stopnie odzysku dla oznaczanego benzofenonu-3 posiadają wysokie wartości, co dowodzi wysokiej dokładności zoptymalizowanych metod.

#### 5. Bibliografia

- Costa Ferreira SL, Bruns RE, Paranhos da Silva EG, Lopes dos Santos WN (2007) Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*: 2-14
- Namieśnik J (2003) Trendy w analityce I monitoring środowiska. Nowe horyzonty i wyzwania w analityce I monitoringu środowiska: 5-11
- Płotka-Wasyłka J, Szczepańska N, Guardia M, Namieśnik J (2015) Miniaturized solid-phase extraction techniques. *Trends in Analytical Chemistry* (73): 19-31

## 4. Rozpraszanie fosforu narastającym zagrożeniem dla środowiska

Phosphorus dispersion is a growing environmental hazard

Krzysztof Pawelec

Katedra Bioinżynierii, Pracownia Chemii Ogólnej i Analizy Środowiska

Krzysztof Pawelec: krzysztof.pawelec@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: fosfor, rozpraszanie fosforu, szczyt fosforu, środowisko

### Streszczenie

Fosfor jest pierwiastkiem o dużym znaczeniu biologicznym i przemysłowym. Wzrost zapotrzebowania na związki fosforu przyczynia się do znacznego wykorzystywania naturalnych, nieodnawialnych złóż apatytów i fosforytów, stanowiących główny surowiec do produkcji nawozów i pasz. Prognozy dotyczące naturalnych światowych złóż fosforu przewidują, że w ciągu 200-300 lat zostaną one wyczerpane. Fosfor jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Głównym źródłem fosforu w wodzie jest wietrzenie minerałów, erozja gleby, opady atmosferyczne, nawozy fosforowe, ścieki komunalne. Zmienność fosforu w wodach występuje w zależności od danego regionu, od jego specyfiki gospodarczej i użytkowej, od pory dnia czy pory roku. Środowisko naturalne jest ważnym składnikiem bogactwa narodowego, dlatego należy dbać o nie stosując nowe metody ochrony, wykorzystując ponownie fosfor, który został sztucznie wprowadzony do środowiska.

### 1. Wstęp

Fosfor został odkryty w 1669 roku przez alchemika Henninga Brandta podczas ogrzewania, bez dostępu powietrza zagęszczonego moczu. Nazwa fosforu pochodzi z greckiego „phosphoros” i oznacza „niosący światło”. Fosfor pod wpływem tlenu utlenia się wywołując widzialny w ciemności efekt chemiluminescencji (Bezak-Mazur Stoińska 2013).

Początkowe przemysłowe zainteresowanie związkami fosforu ograniczało się do produkcji zapalek w XIX wieku. Fosfor w XX wieku wykorzystywano również do produkcji bojowych środków trujących, np. sarinu, somanu czy tabunu, który zsyntetyzowano w 1936 roku, przy okazji badań nad zastosowaniem fosfin jako insektycydów (Klaczyński 2015). Fosfor należy do głównej rodziny azotowców. Istnieje kilka rodzajów fosforu: czerwony, biały, fioletowy, czarny. Występuje pospolicie w przyrodzie, jego udział w skorupie ziemskiej wynosi 0,12% wag. Ze względu na swoją wysoką aktywność nie występuje w środowisku w postaci czystej ([www.potopk.pl](http://www.potopk.pl)). Z jonami glinu, manganu i żelaza fosfor tworzy około 170 minerałów, jednak największą liczbę wiązań tworzy z wapniem (Klaczyński 2015). Fosfor posiada masę atomową 31 oraz liczbę atomową 15. Występuje na +1, +2, +3 i +5 stopniu utlenienia, lecz w związkach mineralnych i organicznych występuje głównie tylko na jednym z nich +5 w postaci  $\text{PO}_4^{3-}$  (Dojlido 1995).

Głównymi i ekonomicznie opłacalnymi źródłami fosforu na Ziemi są apatyty i fosforyty ([www.potopk.pl](http://www.potopk.pl)). Zawartość fosforu w pokładach fosforytów na świecie jest różna i waha się od 15 do 40%  $\text{P}_2\text{O}_5$ , co wpływa na konkurencyjność produkcji (Korzeniowska i Stanisławska-Głubiak 2011).

Od ponad 100 lat wydajność produkcji rolnej jest ściśle związane ze stosowaniem sztucznych nawozów fosforowych. Wzrost liczby ludności i zmiany w gospodarce energetycznej powodują, że rośnie globalne zapotrzebowanie na żywność i „biopaliwa” (Dąbrowska 2008), co wiąże się z większą potrzebą uprawiania gruntów, a tym samym zwiększa się popyt na nawozy oraz pasze dla zwierząt (Łukawska 2014). Fosfor jest pierwiastkiem wykorzystywanym w gospodarkach narodowych zaliczanym do związków biogenych, ale może on także przyczynić się do zniszczenia środowiska naturalnego (Jeziarska 2008). Związki biogenne pochodzą głównie ze ścieków, z terenów użytkowanych rolniczo czy opadów atmosferycznych. Efektem nadmiernego obciążenia wód biogenami jest eutrofizacja, która ogranicza ich wykorzystanie (Dąbrowska 2008).

Rozpuszczalność fosforu, który występuje naturalnie jest mała. Z tego względu cykl biogeochemiczny obiegu fosforu jest inny w porównaniu z innymi pierwiastkami. Jest to spowodowane brakiem formy gazowej związków fosforu. Przemieszczanie się tego pierwiastka związane jest z transportem zawieszin i osadów w wodach oraz pyłów w atmosferze (Zarzycki 2007). Ponieważ fosfor nie krąży w cyklu atmosferycznym, jak to jest w przypadku azotu cząsteczkowego, dlatego jego obieg może być scharakteryzowany jako zamknięty (Mitsch i Gosselink 2015).

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie znaczenia dostępności fosforu dla życia ludzi na Ziemi. Zagadnienie to przedstawiono głównie w kontekście wpływu intensyfikacji produkcji roślinnej i zwierzęcej na rozpraszanie tego pierwiastka w środowisku w perspektywie kryzysu bezpieczeństwa produkcji żywności związanego ze światowym szczytem wydobycia fosforu.

## **2. Przegląd literatury**

### **2.1 Szczyt wydobycia fosforu**

Największe złoża fosforu znajdują się w Afryce północnej. Zasoby naturalnych fosforu podobnie jak zasoby ropy naftowej – są nieodnawialne. Wyczerpanie złóż fosforu może doprowadzić do niedoborów nawozów w przemyśle rolniczym, co będzie wiązało się z zagrożeniem produkcji żywności. Fosfor nie posiada substytutu takiego jak ropa naftowa czy węgiel.

Aktualne światowe wydobycie fosforu wynosi ponad 160 mln ton rocznie i w okresie ostatnich 10 lat wzrosło o ok. 20%. Krajem przodującym w produkcji tego surowca są Chiny, które realizują prawie 40% światowego wydobycia. W ostatnich latach wydobycie fosforu w Chinach dynamicznie wzrasta. Obecnie Chiny wraz z USA i Marokiem kontrolują ponad 65% światowego wydobycia fosforu (Korzeniowska i Stanisławska-Głubiak 2011).

Wydobycie fosforu z reguły prowadzone jest w kopalniach odkrywkowych, które zajmują znaczną powierzchnię gruntu. Oprócz kopalni, w której prowadzone jest wydobycie, potrzebne jest miejsce na hałdy i osadniki polowe. Taki sposób wydobycia generuje znaczne ilości odpadów stałych, które mogą różnić się pomiędzy obiektami. Na wyprodukowanie jednej tony kwasu fosforowego potrzebne jest 9,5 tony rudy fosforanowej, a powstaje przy tym 21,8 tony różnych odpadów i 6,5 tony zwałowisk. W trakcie produkcji kwasu fosforowego wytwarza się znaczne ilości fosfogipsu, który przechowywany jest na stertach z uwagi na przepisy dotyczące poziomów radioaktywności lub dlatego, że alternatywy (gips naturalny i gips pochodzący z odsiarczania spalin) są bardziej konkurencyjne. W efekcie już na tym etapie ogromne ilości fosforu są rozpraszane do środowiska. W wydobyciu i przetwórstwie fosforu zużywana jest również duża ilość wody. W nowoczesnych kopalniach można ponownie wykorzystać do 95 % pobranej wody, jednak taka wydajność nie jest ekologicznie. Możliwy jest wyciek lub przesączenie się kwaśnej wody procesowej, a to może szkodliwie wpływać na ekosystemy wodne. W trakcie wydobycia również zużywa się znaczne ilości energii. Na wytworzenie jednej tony produktu końcowego potrzebne jest 2,4 GJ energii pierwotnej – ilość ta ulega podwojeniu, jeśli uwzględnimy transport do Europy. Każdego roku na transportowane są miliony ton fosforu, co niesie za sobą ogromne koszty ekologiczne (Villalba i in. 2008).

Fosfor jest niezbędnym pierwiastkiem do produkcji rolniczej. Fosfor, który stanowią podstawowy surowiec do produkcji nawozów fosforowych zostały zaliczone do tzw. surowców krytycznych dla europejskiej gospodarki. W 2014 r. fosfor znalazł się na liście surowców krytycznych, ponieważ ryzyko niedoboru dostaw oraz jego skutki dla gospodarki są większe niż dla innych surowców. W 2017 r. zaktualizowano listę surowców krytycznych, poszerzając ją o czysty fosfor. Znaczenie surowców fosforowych dla gospodarki UE jest ogromna, ponieważ ich dostępność może szybko ulec zmianie w związku ze zmianami przepływów handlowych lub zmianami w polityce handlowej, co potwierdza ogólną potrzebę dywersyfikacji dostaw i zwiększenia poziomu ich recyklingu (Smol i Kulczycka 2018).

Szacuje się, że nakarmienie prognozowanej populacji - 9 miliardów - w 2050 r. będzie wymagało 66% wzrostu produkcji roślinnej od poziomu w 2005/2007 r., podczas gdy w tym samym okresie produkcja mięsa wzrośnie o 85%. Zapotrzebowanie na nawozy fosforowe będzie przyspieszać, ponieważ wzrasta ilość i jakość produkcji żywności i zbóż paszowych. Niestety fosfor należy do zasobów nieodnawialnych, których zasoby kiedyś się skończą (Eric i Paul 2010).

Najnowsze badania dowodzą, że w ciągu 200-300 lat złoża fosforytów – głównego, ekonomicznie opłacalnego źródła fosforu na Ziemi zostaną wyczerpane (Korzeniowska 2011). Przy obecnym poziomie wydobywania, Stany Zjednoczone wyczerpią swoje rezerwy w ciągu 30 lat. Zasoby, które są ekonomicznie opłacalne do wydobywania przy użyciu istniejących technologii obecnie szacowane są na 15 miliardów ton, z tego około 167 milionów ton wydobywa się rocznie. Fosfor nie może być wytwarzany, dlatego należy poszukiwać alternatywnych źródeł, aby można było go odzyskać i ponownie wykorzystać (Gert 2009). Chociaż litosfera bogata jest w fosfor, nie jest on równomiernie rozmieszczony na całym świecie tylko skumulowany geograficznie przez co jest ograniczony dostęp do zasobów fosforu w wielu krajach (Li 2019).

## 2.2 Funkcje fosforu

Fosfor jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego wzrostu i rozwoju roślin. Pełni funkcje strukturalne (fosfolipidy), zapasowe (fityna) i regulacyjne (regulacja ekspresji genów). Uczestniczy w metabolizmie komórkowym bezpośrednio (np. fosforany cukrów) i pośrednio (np. regulacja aktywności enzymów poprzez fosforylację i defosforylację). Bierze także udział w procesach przekazywania informacji genetycznej (składnik kwasów nukleinowych) oraz w magazynowaniu energii (składnik ATP, PPi) (Żebrowska 2007, Ślęzak 2015). Plonotwórcze działanie fosforu szczególnie silnie zaznacza się w okresie budowania systemu korzeniowego oraz tworzenia plonu (Głowacka 2017).

Przeważa opinia, że to fosfor jest głównym czynnikiem limitującym produkcję pierwotną (Adamczyk 2013). Najbardziej typową reakcją na deficyt fosforu jest zahamowanie wzrostu pędu oraz zmniejszenie powierzchni i masy liści, przy jednoczesnej stymulacji wzrostu korzenia. Stosunek suchej masy korzenia do suchej masy pędu może być wyższy u roślin rosnących w warunkach deficytu fosforu. Ponadto, pod wpływem deficytu fosforu, zabarwienie łodyg i liści może zmieniać się na purpurowe lub ciemno-zielone. Purpurowa barwa wynika ze zwiększonej akumulacji antocyjanów. Obniżenie zawartości fosforu w środowisku lub jego brak decydują o morfologii korzeni: zwiększa się masa korzeni i ich długość, zmniejsza się zaś średnica, powstaje więcej korzeni bocznych, wydłużają się włosniki (Ciereszko 2000). Niedobór fosforu ogranicza rozwój roślin, natomiast nadmiar fosforu nie jest szkodliwy, a wręcz przeciwnie sprzyja rozwojowi biomasy (Sapek 2009).

## 2.3 Formy fosforu w przyrodzie

W wodzie fosfor może występować w postaci związków mineralnych oraz organicznych. Nieorganiczne związki fosforowe można podzielić na ortofosforany oraz fosforany skondensowane (polifosforany, metafosforany) (Hejduk 2011). Mineralne związki fosforu to głównie połączenia z wapniem, których rozpuszczalność maleje ze wzrostem zasadowości oraz fosforany glinu i żelaza. Organiczne związki fosforu występują w żywych organizmach, szczątkach (Gacek 2000). Mogą one występować w stanie rozpuszczonym w postaci zawiesin lub koloidów. Powszechnie uznaje się, że związki fosforu migrują do wód powierzchniowych, głównie w wyniku erozji wodnej, wniesione do rzeki łącznie z zawiesinami (Hejduk 2011). W środowisku wodnym fosfor występuje w postaci fosforanów(V) i jest wykorzystywany w formie rozpuszczonej przez organizmy wodne do budowy własnych komórek (Adamczyk 2013).

W warunkach naturalnych stężenie związków fosforu rozpuszczonych w wodzie rzecznej na ogół nie przekracza  $0,02-0,03 \text{ mgP/dm}^3$  (Trząski 2010). W zakresie pH spotykanym najczęściej w wodach naturalnych dominuje  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Obecnie mogą być również poli- i metafosforany oraz organiczne połączenia fosforu. Poniżej  $\text{pH} = 6$  przeważają jony  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , przy  $\text{pH}$  powyżej 6 występują głównie jony  $\text{HPO}_4^{2-}$ , a przy  $\text{pH}$  powyżej 9 powstają także jony  $\text{PO}_4^{3-}$  (Dojlido 1995).

Zawartość fosforu w warstwie ornej kształtuje się od  $0,01-0,2\%$ , w zależności od rodzaju gleby. Związki fosforu zawarte w glebie wykazują dużą różnorodność pod względem form chemicznych (Potarzycki 2003). Fosfor ulega rozpuszczeniu i przemieszcza się dobrze w środowisku kwaśnym, a w środowisku zasadowym ma tendencję do występowania w formie trwałej, trudno dostępnej dla roślin, jako fosforan wapnia, żelaza czy manganu (Kiryłuk 2011). Rośliny pobierają fosfor z gleby przez korzenie w formie anionów  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  i  $\text{HPO}_4^{2-}$ . W przeważającej większości fosfor glebowy występuje w związkach trudno dostępnych dla roślin. Uruchomianie fosforu polega na

przechodzeniu związków trudno dostępnych w związki łatwo przyswajalne dla roślin. Zjawisko odwrotne nazywamy uwstecznianiem fosforu. W glebach użytków rolnych w przemianach tych uczestniczy również fosfor wprowadzony do gleby wraz z nawozami (Korzeniowska i Stanisławska-Głubiak 2011). Parametr, który decyduje o przyswajalności fosforu przez rośliny jest odczyn gleby. W glebach o pH 4,5–7,0 przeważają jony  $H_2PO_4^-$ . Na glebach o odczynie poniżej 4,5 dochodzi do wiązania się fosforanów z kationami metali 2- i 3-wartościowych (żelaza, glinu i manganu) w trudno rozpuszczalne związki co prowadzi do uwsteczniania fosforu (spadku przyswajalności). W środowisku zasadowym fosfor tworzy trudnodostępne dla roślin fosforany metali: wapnia, magnezu. Z upływem czasu strącone fosforany przybierają formy krystaliczne: waryscyt i strengit, stanowiące fosfor zapasowy. Skutki głodu fosforowego u roślin uprawnych występują tym silniej, im gleba jest mniej zasobna w fosfor oraz bardziej kwaśna. Czynnikiem sprzyjającym silniejszej reakcji roślin na niedobór fosforu w początkowym okresie wegetacji jest wysoki poziom nawożenia azotem. Dlatego skutki głodu występują na glebach ubogich, kwaśnych, nie wapnowanych, nawożonych niskimi dawkami fosforu i w przypadku jednostronnego nawożenia azotem (Senyk2011).

### 2.4 Zachowanie się fosforu w środowisku wodnym

W przeciwieństwie do innych pierwiastków – węgla, tlenu, azotu, obieg fosforu tylko w niewielkim stopniu obejmują atmosferę i ogranicza się głównie do ekosystemów wodnych i lądowych. Fosfor w przyrodzie nieożywionej jest pierwiastkiem mało ruchliwym, raz wprowadzony do układu pozostaje w nim. Ruchliwy jest w przyrodzie ożywionej, pobierany aktywnie przez rośliny. Z obumarłych roślin wraca do gleby. Naturalnych warunkach obieg między materią nieożywioną i ożywioną jest zamknięty (Sapek 2009).

Obieg fosforu w zbiorniku wodnym odbywa się w różny sposób, dlatego wyróżniono dwa obiegi fosforu – mały i duży. Mały obieg występuje w czasie stagnacji w górnej warstwie jeziora. Fitoplankton znajdujący się w powierzchniowej warstwie wody pobiera jony fosforanowe i wbudowuje w organizm. Ruchy cyrkulacyjne sprawiają, że organizmy planktonowe nie opadają głębiej. Prowadzi to do rozkładu organicznej formy fosforu z powrotem do jonów fosforanowych, które mogą zostać ponownie przyswojone przez fitoplankton. Cały proces nieustannie trwa.

Jeżeli fosfor przedostanie się do głębszych warstw wody (duży obieg) następuje jego wytrącanie i akumulacja w osadach dennych. Fosfor może sedymentować na dno zbiornika wodnego w postaci obumarłej materii organicznej, jak i związany z jonami glinu, żelaza czy wapnia oraz z zawiesinami mineralnymi. Korzystnymi warunkami dla nadmiernego wzbogacenia się zbiornika wodnego w substancje odżywcze są warunki beztlenowe, w których żelazo trójwartościowe przechodzi do dwuwartościowego. Proces ten skutkuje przejściem fosforu z osadów dennych do wody, ponieważ fosforany żelaza(II) są łatwiej rozpuszczalne. W przypadku przejścia siarczanów znajdujących się w wodzie w siarkowodór, duża część jonów żelaza(II) tworzy nierozpuszczalne związki siarczków w warstwie powierzchniowej osadów dennych, co powoduje wyłączenie żelaza dwuwartościowego ze strącania fosforu. Prowadzi to do powstania metanu, który unosząc się ku górze zbiornika, transportuje znaczne ilości fosforu. Proces ten przyczynia się do gwałtownego przyspieszenia eutrofizacji (Szczepańska 2017). Substancje chemiczne dostające się do wód powierzchniowych mogą pochodzić z wielu źródeł, a ich ładunki są zmienne w czasie i zależą m.in. od: ukształtowania terenu, rodzaju i przepuszczalności gleb, sposobu zagospodarowania zlewni, stosunków wodnych i warunków klimatycznych (Szczękowska 2016).

Rozmieszczenie fosforanów w zbiorniku wodnym jest na ogół odwrotnie proporcjonalne do stężenia tlenu. W epilimnionie fosfor jest szybko zużywany przez fitoplankton, natomiast wobec braku tlenu w hypolimnionie, sole żelazowe kwasu fosforowego ulegają redukcji na łatwiej rozpuszczalne żelazawe. Dzieje się tak w okresie stagnacji letniej. Jesienią podczas cyrkulacji, przy dobrym natlenieniu, wytrąca się z wody prawie cały zapas fosforu i osadza na dnie w postaci nierozpuszczalnego fosforanu żelazowego. Jest to zjawisko występujące cyklicznie w zbiornikach z okresami przemieszania i stagnacji.

Fosfor rozpuszczony w wodzie pochodzi z ładu, jest wymywany z gleby (trudniej od azotu), oraz z rozkładu organizmów. Pierwiastek ten uwalnia się także z połączeń organicznych za pośrednictwem bakterii, oraz znacznie efektywniej w czasie rozkładu (autolizy) obumarłych



organizmów wodnych. W tym ostatnim procesie czynny udział bierze enzym fosfataza, który odczepia fosfor z nukleoproteidów. Jest to proces szybki - po 10 minutach z ciała nieżywych organizmów zaczyna wydzielać się fosfor nieorganiczny. Po 30 minutach od chwili śmierci 12%, a po 24 godzinach 50-60% ogólnej ilości fosforu przechodzi w fosforany. Stąd też tempo cyrkulacji fosforu w wodzie jest szybsze niż azotu (Pliński 1995).

Bakterie tlenowe i względnie tlenowe czerpią energię z rozkładu materii zużywając tlen. Tlen, który znajduje się w wodzie pochodzi z atmosfery oraz z procesu fotosyntezy prowadzonego przez rośliny wodne i ogranicza się tylko do wierzchniej warstwy. Zasoby tlenu do głębszych warstw dostarczane są przez falowanie, cykliczne mieszanie w pionowym profilu zbiornika. Wraz ze wzrostem obciążenia wód związkami biogennymi zwiększa się zapotrzebowanie na tlen. Niedobór tlenu wpływa na skład mikroorganizmów oraz zmienia kierunek i charakter prowadzonych przez nie reakcji biochemicznych. W takich warunkach mikroorganizmy pobierają tlen z utlenionych form związków biogennych, m.in. azotanów, fosforanów, siarczanów czy węglanów, zakumulowanych i związanych w osadzie dennym, co prowadzi do uwolnienia jonów tych związków do toni wodnej. Anoksja powoduje zmiany potencjału redoks i ogranicza możliwość wiązania fosforu w warstwie osadu. Jeziora anoksyjne posiadają niższy potencjał wiązania fosforu niż jeziora dobrze natlenione (WCI Technologie).

Zwykle w wodzie morskiej i w słodkiej fosforu jest mało. Stosunek P:N kształtuje się na ogół jak 1:10. W Morzu Północnym w warstwach powierzchniowych notuje się przeciętnie około 20 mg fosforu w m<sup>3</sup>. Wraz z głębokością zawartość stopniowo rośnie. W jeziorach zawartość fosforu jest dość zróżnicowana. Na przebadanych 494 jeziorach w stanie Wisconsin (USA) w 20% jezior stwierdzono ślady fosforu lub jego brak, w 40% - 2-3 mg/m<sup>3</sup>, w 18% - 4 mg/m<sup>3</sup>, a w 6% - 6-7 mg w m<sup>3</sup> wody. Dotyczy to warstwy powierzchniowej w okresie stagnacji letniej. W jeziorach Pojezierza Bałtyckiego stosunki są podobne. Latem w epilimnionie zawartość fosforu wynosi przeciętnie 0-4 mg/m<sup>3</sup>, zaś w hypolimnionie 15-30 mg/m<sup>3</sup>. Natomiast podczas cyrkulacji zawartość jest wyrównana - wiosną 9-10 mg/m<sup>3</sup>, jesienią 6-8 mg/m<sup>3</sup>. W jeziorach meromiktycznych w monimolimnionie dochodzi do 800 mg/m<sup>3</sup>. Wahaniami sezonowe zawartości fosforu mają podobny przebieg jak azotu i uderzająca jest zależność między rozwojem fitoplanktonu a zasobami fosforu (Pliński 1995).

Fosfor w formie jonów fosforanowych jest wysoce biodostępny i stanowi podstawowe źródło nutrientów dla fitoplanktonu – glonów i sinic – dlatego uwolnienie znacznego ładunku fosforanów skutkuje nadmiernym, intensywnym wzrostem i rozwojem tych organizmów, czyli tzw. zakwitami (WCI Technologie).

W okresie letnim fosforany rozpuszczalne są pobierane w znaczącej ilości przez intensywnie namnażający się fitoplankton, który z kolei obumiera powodując sedymentację fosforu. Dlatego też stężenie tego pierwiastka latem jest najniższe, a zimą gdy ustają procesy biologiczne- najwyższe (Bezák-Mazur 2013). Dlatego obserwuje się sezonową zmienność w występowaniu fosforu w wodach powierzchniowych. Dobrym przykładem jest Zalew Wiślany. Badania zawartości jonów fosforanowych zostały przeprowadzone w latach 2004-2015. Maksymalne stężenia notowane były zimą i wczesną wiosną, przed rozpoczęciem wegetacji. W Zalewie Wiślanym po zejściu pokrywy lodowej niemal natychmiast rozpoczyna się wiosenny zakwit fitoplanktonu. Bardzo często, już w trakcie badań kwietniowych, notowane były niskie stężenia biogenów (Kopiec 2016).

Dobowe fluktuacje w występowaniu fosforu w wodach powierzchniowych zostały pokazane na jeziorze Gubisz. Około godziny 20:00 w ciągu 3 kolejnych dob stężenia rozpuszczonych fosforanów w wodzie wykazywały zbliżoną wartość stężenia (200 mg/dm<sup>3</sup>). W porannych godzinach zaobserwowano wzrost stężenia fosforanów, po którym następował spadek około godziny 16:00. Analizując zgromadzone dane, zauważono powtarzającą się właściwość fluktuacji czasowych stężenia jonów fosforanowych. Fluktuacje te wykazują często charakter cykliczny (Antonowicz 2014).

## 2.5 Rozpraszanie fosforu w środowisku

Wody występujące w środowisku poddawane są bezpośrednim lub pośrednim wpływem człowieka, która powoduje pogorszenie ich stanu ilościowego i jakościowego. Przyczyną zanieczyszczenia wód, które jest zjawiskiem powszechnym mogą być różnego rodzaju substancje

znajdujące się w wodzie pochodzące ze źródeł naturalnych lub sztucznych. Najbardziej podatne na zanieczyszczenie są wody powierzchniowe, dużo mniej wody podziemne, których stopień antropogenicznego zagrożenia zależy od głębokości ich występowania. Sztuczne źródła zanieczyszczeń wód można podzielić na źródła punktowe, obszarowe i liniowe. Do punktowych źródeł zanieczyszczeń zalicza się oczyszczalnie ścieków komunalnych, oczyszczalnie ścieków przemysłowych, składowiska odpadów oraz magazyny substancji niebezpiecznych (Rybak 2010). Zanieczyszczenia obszarowe pochodzą głównie z sektora rolniczego. Do zanieczyszczeń rolniczych zaliczamy pestycydy, substancje ropopochodne i związki biogenne zawarte w nawozach (Kalda 2017). Zanieczyszczenia liniowe (pasmowe), są to zanieczyszczenia które występują głównie wzdłuż szlaków komunikacyjnych (Rakowska 2012).

Duże znaczenie w zasilaniu wód powierzchniowych w fosfor mają ścieki bytowe lub przemysłowe (Gacek 2000). Ścieki, które są nieoczyszczone i zostają wprowadzone do wód płynących, stojących czy do gruntu stanowią poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego. Ścieki bytowe to mieszanina wody z substancjami organicznymi i nieorganicznymi. Substancje w ściekach bytowych występują w postaci stałej i rozpuszczonej oraz w różnym stopniu zdyspergowanych – od dużych cząstek do zawiesin koloidalnych. Do składników ścieków bytowych zaliczamy: fekalia ludzkie, odpadki żywności, mydła, środki piorące i czyszczące, papier, szmaty, żużel i popiół (Ślizowski 2008). Ilość fosforu w surowych ściekach bytowych może być różna i wahać się w granicach od 10 do 25 g P/m<sup>3</sup> (Jóźwiakowski 2006).

Opad atmosferyczny może być również istotnym obszarowym źródłem zanieczyszczeń wód powierzchniowych. Wyniki badań zbiornika zaporowego w Goczałkowicach pokazują, że udział fosforu z opadów wynosi 15% całkowitego obciążenia tego zbiornika. Ważnym elementem wpływającym na poziom zanieczyszczenia wód na danym terenie jest również natężenie deszczu, które ma wpływ na spływy obszarowe z terenu zlewni. Podczas jednej nawałnicy może być wymyte z gleb nawet 30% rocznego ładunku biogenów (Dąbrowska 2008).

Innym jeziorem, które zostało przebadane pod kątem opadów atmosferycznych jest jezioro Dobra. Wyniki, które uzyskano pokazały, że miesięcznie z opadem dostarczone zostało nawet 1,5 kg P-PO<sub>4</sub>. Uwzględniając kryterium Vollenweidera o rocznej wielkości ładunków fosforu, które dla tego jeziora wynoszą 0,7 (dopuszczalny) i 1,3 (niebezpieczny) kg·P/ha potwierdzono, że roczna suma dostarczanego fosforu z opadu atmosferycznego do jeziora stanowi około 50% dopuszczalnego ładunku. Stwierdzono, że ten sposób pionowej obszarowej dostawy fosforu, jest istotnym elementem wpływającym na jakość wody jeziora Dobra (Jarosiewicz 2012).

Niekontrolowane rozpraszanie fosforu z rolnictwa do wód powierzchniowych jest dużym problemem dla środowiska (Burzyńska 2015). Podstawowym odbiorcą fosforu z wydobywanych surowców geologicznych jest rolnictwo, do którego trafia ponad 90% urobku przetwarzanego na nawozy mineralne (Sapek 2008). Fosforyty i apatyty, które wykorzystuje się do produkcji nawozów, mogą mieć podwyższone zawartości niektórych metali ciężkich (np. kadmu). Skutkuje to zwiększona ilością pobierania przez rośliny łatwo dostępnych form metali ciężkich, co prowadzi do skażenia produktu końcowego (Głodowska 2018). Nawożenie fosforem jest konieczne dla utrzymywania na wysokim poziomie żyzności gleby zapewniającej uzyskiwanie wysokich plonów roślin i dobrej jakości produktów (Tujaka 2009). W ostatnim czasie pojawił się nowy model rolnictwa wykorzystujący wysoce przemysłowe metody produkcji, którą nazywa się „high-techagriculture”. W tym systemie produkcyjnym wykorzystuje się intensywne nawożenie, chemiczne środki ochrony roślin i mikroelektronikę (dozowanie wody, nawozów) (Głodowska 2018). Ograniczenie zużycia nawozów fosforowych jest bardzo trudne, ponieważ nawet ponad 90% fosforu, który znajduje się w glebie występuje w formie organicznej i nie jest bezpośrednio dostępny dla roślin (Zboińska 2016). W Polsce zawartość przyswajalnego fosforu w glebie jest mała, aż 38% gleb posiada niską jego zawartość (Jadczyżyn 2014).

Wysycenie pojemności gleby fosforem ułatwia jego bezpośrednie wymywanie z gleby (Sapek 2009). W badaniach, które prowadzono przez wiele lat stwierdzono, że 1-5% fosforu wprowadzonego do gleby z nawozami mineralnymi zostaje wypłukane do okolicznych wód (Lossow i Gawrońska 2000). Formy fosforu, które występują w wodzie są podobne do występujących w środowisku glebowym (Gacek 2000). Źródłem fosforu może być nieodpowiednie przechowywanie

obornika czy gnojówki. Obornik z reguły składowany jest na gruncie, natomiast gnojówkę często w nieszczelnych zbiornikach. Nieodpowiednie przechowywanie odchodów zwierzęcych w okresach opadowych i roztopowych migrację fosforu do wód gruntowych (Korybut 2008).

Źródłem biogenów może być również osad denny. Zdeponowane w osadach związki uwalniane są w procesie dyfuzji, zwłaszcza w warunkach beztlenowych istnieje wymiana substancji pomiędzy osadami a wodą. Zmiana równowagi chemicznej (zawartości tlenu, pH) może spowodować przedostanie się dużej ilości biogenów z głębszych warstw osadów. Zgromadzone w osadach jony fosforanowe w warunkach tlenowych tworzą trudno rozpuszczalne fosforany żelazowe, a w warunkach beztlenowych zredukowane jony żelazawe tworzą łatwo rozpuszczalne fosforany żelazawe, które w dużych ilościach przechodzą do wód (Dąbrowska 2008).

Źródłami rozproszenia fosforu jest jego nadmierne nagromadzenie w glebach, w tym również użytków zielonych, a zwłaszcza pastwisk. Opad atmosferyczny i zawarty w nim ładunek fosforu jest dodatkowym źródłem wzbogacania gleb w ten składnik. Obecnie nie bez znaczenia staje się wzbogacanie gleby w fosfor wprowadzany do niej w postaci różnego rodzaju odpadów, jak i przemysłowej oraz ścieków i osadów (Sapek 2014). Efektem nadmiernego obciążenia wód jest ich zanieczyszczenie oraz ograniczenie możliwości ich użytkowania (Dąbrowska 2008).

### **3. Podsumowanie**

Fosfor jest jednym z pierwiastków, dzięki któremu możliwe jest życie. Wchodzi on w skład kwasów nukleinowych, dzięki niemu możliwy jest prawidłowy wzrost i rozwój rośliny. Poprzez postępujący rozwój demograficzny i towarzyszący mu wzrost produkcji roślinnej i zwierzęcej oraz współczesny styl życia dochodzi do nadmiernego rozpraszania fosforu w środowisku. Obieg fosforu ogranicza się głównie do ekosystemów lądowych i wodnych przyczyniając się do przyspieszonej eutrofizacji tych drugich. Dostawa fosforu do wód powierzchniowych jest naturalnym i nieuniknionym procesem, który obecnie jest intensyfikowany poprzez działalność antropogeniczną. W Polsce przeważająca ilość związków fosforu migrującego do wód powierzchniowych i gruntowych pochodzi z rolnictwa. Fosfor w wodach powierzchniowych pochodzi głównie ze ścieków, spływów powierzchniowych, opadów atmosferycznych, ługowania i erozji gleb. Nie bez znaczenia jest wzbogacanie gleby w fosfor wprowadzany do niej w postaci różnego rodzaju odpadów w postaci ścieków i osadów ściekowych.

Źródła fosforu są nieodnawialne, co czyni fosforyty i apatyty surowcem krytycznym dla światowych gospodarek. Wiele badań potwierdza, że w niedługim czasie zasoby fosforu zostaną wyczerpane. Należy poszukiwać alternatywnych źródeł fosforu, aby ograniczyć te konwencjonalne, co w przyszłości pozwoli na utrzymanie produkcji rolniczej na odpowiednim poziomie. Środowisko naturalne stwarza wiele możliwości odzysku fosforu, warto zwrócić uwagę na recykling rozprzaskanego w środowisku tego pierwiastka np. ze ścieków komunalnych lub przemysłu rolnopozwojowego.

### **4. Literatura**

- Adamczyk W (2013) Wpływ składników biogenych na jakość i eutrofizację powierzchniowych wód płynących, stanowiących źródło wody pitnej Krakowa. *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość* 6(91): 175 – 190
- Antonowicz J (2014) Dobowe fluktuacje substancji biogenicznych i chlorofilu w ekotonie: hydrosfera – atmosfera jeziora łobeliwego. *Proceedings of ECOpole* 8(2): 465-470
- Bezak-Mazur E Stoińska R, (2013) The importance of phosphorus in the environment- review article. *Archives of Waste Management and Environmental Protection* 15(3):33-42
- Burzyńska I (2015) Zmiany stężeń fosforanów w wodach rolniczej zlewni rzeki Raszynki. *Polish Journal of Agronomy* 23 24–30
- Ciereszko I (2000) Wzrost i metabolizm roślin w warunkach deficytu fosforu. *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych*. 1-2(246-247): 179-189
- Dąbrowska J (2008) Ocena zawartości związków azotu i fosforu w wodach rzeki Trzemny. *Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich* 7: 57-68

- Dąbrowska J (2008) Wpływ czynników naturalnych, antropogenicznych i technicznych na jakość wody w zbiorniku Gołuchów. *Współczesne problemy inżynierii środowiska* 6:9-60
- Dojlido JR (1995) „Chemia wód powierzchniowych”, Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok
- Eric T, Paul LG (2010) Peak phosphorus – Implications for soil productivity and global food security 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World 1 – 6 August 2010, Brisbane, Australia; 27-30
- Gacek T (2000) Czynniki dostawy fosforu do wód powierzchniowych na pogórz karpackim. Instytut Geografii UJ. 65-82
- Gert B, Caldwell I, Rosemarin A (2009) Peak phosphorus 15
- Głodowska M, Gałązka A (2018) Intensyfikacja rolnictwa a środowisko naturalne. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 592: 3-13
- Głowacka A (2017) Regulacja zachwaszczenia i sposób uprawy a dostępność fosforu dla roślin uprawnych. *Polish Journal of Agronomy* 28: 3–11
- Hejduk L (2011) Relacje między wybranymi formami fosforu a rumowiskiem unoszonym w rzece Zagożdżonca. *Przegląd Naukowy – Inżynieria i Kształtowanie Środowiska* 54: 311–320
- Ilnicki P (2004) Polskie rolnictwo a ochrona środowiska. Wyd. I. Poznań. AR. ISBN 83-7160-369-X ss. 485
- Jadczyzyn J, Mroczkowski W, Gosek S, (2014) Erozyjne straty fosforu w doświadczeniu modelowym. *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 17(1): 89-103
- Jarosiewicz A (2012) Opad atmosferyczny jako źródło substancji biogenicznych – na przykładzie jeziora Dobra. *Inżynieria Ekologiczna* 29: 48-56
- Jeziarska M (2008) Zagrożenia dla gospodarki rybackiej wynikające z postępującej eutrofizacji śródlądowych wód powierzchniowych. *Użytkownik Rybacki – Nowa Rzeczywistość* 70-77
- Jóźwiakowski K (2006) Próba zwiększenia skuteczności usuwania fosforu w modelu oczyszczalni ścieków. *Inżynieria Rolnicza* 5: 249-256
- Kalda G, Kwasniak K, Sokolan J (2017) Analiza źródeł zanieczyszczenia miasta Rzeszowa. *Czasopismo Inżynierii Lądowej, Środowiska i Architektury* 64(4/17); 167-180
- Kiryłuk A (2011) Wpływ rolnictwa na stężenie fosforu ogólnego w wodach powierzchniowych zlewni rzeki śliny. *Inżynieria Ekologiczna* 26: 122-132
- Klaczynski E (2015) Fosfor w środowisku, jego znaczenie i możliwości odzysku z osadów ściekowych. *Forum Eksploatatora* 6(81): 35-41
- Korybut T (2008) Zanieczyszczenie wód gruntowych NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> i K<sup>+</sup> w pobliżu miejsc składowania nawozów naturalnych. *Acta Agrophysica* 11(2), 527-538
- Korzeniowska J (2011) Czy światu grozi brak fosforu do produkcji nawozów? *Nasza Rola Więcej z Pola* 2:13-14
- Korzeniowska J, Stanisławska-Głubiak E (2011) Nowe trendy w wykorzystaniu fosforytów w rolnictwie. *Postępy Nauk Rolniczych* 3: 57–66
- Li B, Bicknell KB, Renwick A (2019) Peak phosphorus, demand trends and implications for the sustainable management of phosphorus in China. *Resources, Conservation and Recycling* 146: 316-328
- Lossow K, Gawrońska H (2000) Ochrona zbiorników wodnych. *Przegląd Kom.* 9, 92-93
- Łukawska M (2014) Analiza specyjalna fosforu w osadach ściekowych po termicznym spalaniu. *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 17(3): 433-439
- Mitsch, WJ, Gosselink JG (2015) *Wetlands*, 5th edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA
- Ostrowska M (2016) Analiza porównawcza zespołów glonów w zbiorniku Turawa. *Wybrane zagadnienia Rolnictwa i ekologii* 149-162
- Pliński M (1995) Azot i fosfor. *Hydrobiologia – podstawy*. Wyd Ocean. Sopot,
- Potarzycki J (2003) Fosfor w glebie. *Journal of Elementology* 8(3);19-32
- Rakowska J, Porycka B (2012) Ocena efektywności stosowania zanieczyszczonych wód powierzchniowych w akcjach gaśniczych. *Państwowy Instytut Badawczy* 8-13

- Rybak T (2010) Źródła zanieczyszczeń wód powierzchniowych. Raport o stanie środowiska w 2010r 34-78
- Sapek A (2009) Fosfor w łańcuchu pokarmowym człowieka a środowisko w Polsce. Inżynieria Ekologiczna 21: 62-72
- Sapek A (2008) Nawożenie fosforem a jego skutki w środowisku. Woda -Środowisko -Obszary Wiejskie 8(2):127-137
- Sapek B (2014) Nagromadzenie i uwalnianie fosforu w glebach – źródła, procesy, przyczyny. Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie 14 (I–III): 45
- Senyk M (2011) Pobieranie zgodne z potrzebami. Nawożenie roślin rolniczych fosforem i potasem. Arotechnika 12: 38-39
- Smol M, Kulczycka J (2018) Możliwości wykorzystania odpadów jako źródła surowców krytycznych w sektorze nawozowym - wdrażanie założeń gospodarki o obiegu zamkniętym (GOZ) na przykładzie fosforu. Mikrozanieczyszczenia w ściekach, odpadach i środowisku 331-348
- Szczepańska D (2017) Ocena stopnia eutrofizacji Jeziora Dobczyckiego na podstawie pomiaru stężenia fosforanów w wodzie zbiornika. Analit 4: 64-71
- Szczykowska J (2016) Zanieczyszczenia fosforem jako bariera jakości wód zbiorników małej retencji na Podlasiu. Inżynieria Ekologiczna 48: 202-207
- Ślązak E (2015) Możliwości odzysku fosforu z osadów ściekowych. Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych 22:45-55
- Ślizowski R (2008) Skuteczność zmniejszenia zanieczyszczeń ścieków w oczyszczalni „Kujawy”. Infrastruktura i Ekologia Terenów Wiejskich 2: 195-204
- Trząski L (2010) Zanieczyszczenie fosforem: bariera dla poprawy stanu ekologicznego rzek na górnym Śląsku. Prace Naukowe GIG Górnictwo i Środowisko 3:61-74
- Tujaka A, Gosek S (2009) Wykorzystanie fosforu w zależności od wielkości dawki i formy nawozu fosforowego. Fragm. Agronom. 26(2): 158–164
- Villalbai in (2008) Global phosphorus flows in the industrial economy from a production perspective
- WCI Technologie (2018) Kontrola przemian fosforu a ograniczenie zakwitów glonów i sinic
- Zarzycki R (2007) Globalne biogeochemiczne cykle: węgla, siarki, azotu I fosforu. Wprowadzenie do inżynierii i ochrony środowiska, wyd. PWN ;93-95
- Zboińska M (2016) Wybrane aspekty adaptacji roślin do warunków niedoboru fosforu w środowisku glebowym. Kosmos Problemy Nauk Biologicznych 65(312): 419–431
- Żebrowska E (2007) Pobieranie i transport fosforanów w komórkach roślin. Postępy Biologii Komórki 34(2): 283-298
- Strony internetowe:
- Broszura1:  
[http://www.gios.gov.pl/images/dokumenty/pms/raporty/KUJAWSKO\\_POMORSKIE.pdf](http://www.gios.gov.pl/images/dokumenty/pms/raporty/KUJAWSKO_POMORSKIE.pdf)  
[http://www.potopk.com.pl/Full\\_text/2008\\_full/2007\\_2\\_09.pdf](http://www.potopk.com.pl/Full_text/2008_full/2007_2_09.pdf)  
[https://www.w.wios.olsztyn.pl/fileadmin/user\\_upload/monitoring/ZALEW\\_WISLANY/2017\\_Jakosc\\_wod\\_Zalewu\\_komunikat.pdf](https://www.w.wios.olsztyn.pl/fileadmin/user_upload/monitoring/ZALEW_WISLANY/2017_Jakosc_wod_Zalewu_komunikat.pdf)

## **5. Popularne biotesty bakteryjne stosowane w badaniach ekotoksykologicznych**

Popular bacterial biotests used in ecotoxicological tests

Damian Pielorz <sup>(1,2)</sup>, Ewa Adamek <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>(2)</sup> Zespół Sekcji Studenckich Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Młoda Farmacja” przy Śląskim Uniwersytecie Medycznym w Katowicach

<sup>(3)</sup> Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Ewa Adamek

Damian Pielorz: d.pielorz14@interia.pl

Słowa kluczowe: biotesty, ekotoksykologia, toksyczność ostra i przewlekła.

### **Streszczenie**

Ekotoksykologia to nauka interdyscyplinarna na pograniczu m.in. nauk chemicznych, biologicznych, ekologicznych, środowiskowych. Zajmuje się badaniem własności substancji (potencjalnie) toksycznych i negatywnymi skutkami ich działania na czynniki środowiska na wszystkich poziomach organizacji komórkowej. Drobnoustroje, a w szczególności bakterie, są idealnymi organizmami testowymi do oceny toksyczności w tzw. mikrobiotestach. Są to badania, w których jednokomórkowe lub małe organizmy wielokomórkowe poddaje się ekspozycji na działanie płynnej próbki w celu zmierzenia specyficznego działania toksycznego. W przypadku badania substancji chemicznych pod kątem ich potencjalnie toksycznych właściwości, testy bakteryjne stanowią dobrą metodę wstępnej selekcji (jako test przesiewowy), ponieważ pozytywny wynik testu będzie wskazywał na prawdopodobne toksyczne właściwości badanego związku i będzie podstawą do wykonywania dalszych badań. W niniejszej pracy omówiono popularne testy ekotoksykologiczne stosowane w badaniach środowiskowych.

### **1. Wprowadzenie**

Środowisko przyrodnicze to układ wzajemnie zależnych od siebie elementów, które współtworzą dany obszar. Środowisko jest odpowiedzialne za zjawiska hydrologiczne i procesy glebotwórcze, aktywnie uczestniczy w procesach obiegu materii i energii w przyrodzie. Do głównych czynników wpływających na stan środowiska należą rozwój gospodarczy, sytuacja demograficzna oraz aktywność człowieka. Wysoki poziom konsumpcji energii, niewłaściwe postępowanie z odpadami, brak wiedzy w zakresie gospodarowania dobrami materialnymi oraz brak poszanowania zasobów środowiska (zwłaszcza tych nieodnawialnych) to problemy, którym współczesny świat musi sprostać. Efektem nieodpowiedzialnej działalności człowieka były choroby: Itai-Itai (ciężkie zachorowania ludzi wskutek nawadniania pól ryżowych wodą zanieczyszczoną kadmem) czy też Minamata (około 1000 ofiar śmiertelnych wskutek uszkodzenia układu nerwowego rtęcią, wprowadzaną ze ściekami do wody morskiej). Obecnie, dzięki intensywnemu rozwojowi technologii i nauki możliwe jest dokonanie dokładnej oceny środowiska przyrodniczego.

Ekotoksykologia jest nauką na pograniczu nauk chemicznych, biologicznych, ekologicznych, środowiskowych. Zgodnie ze współczesną definicją, zajmuje się ona migracją, transformacją i wpływem (obecnych w środowisku) toksycznych związków nieorganicznych i organicznych pochodzenia naturalnego (biotycznego i abiotycznego) lub antropogenicznego na struktury układów ekologicznych (ekosystemów). Oznacza to, że ekotoksykologia zajmuje się oceną działania toksykantów na organizmy żywe i skutkach tych oddziaływań widocznych wśród wielu organizmów. Dzięki tym badaniom możliwe jest nie tylko oszacowanie stopnia zanieczyszczenia

ekosystemów, ale także podjęcie skutecznych i efektywnych działań w celu zapobieżenia rozprzestrzeniania się tym zmianom w środowisku.

Testy biologiczne są uzupełnieniem klasycznych, chemicznych metod służących do oceny stanu ekosystemu. Podstawowym celem biotestu jest wykazanie obecności substancji toksycznych w środowisku oraz ocena ilościowa tych zanieczyszczeń. W ten sposób możliwe jest uzyskanie pełnej oceny stanu środowiska. Biotesty umożliwiają nie tylko ocenę wpływu badanej substancji na organizmy żywe, ale również wyznaczenie okresu narażenia oraz ustalenie wielkości dawki, przy której wystąpi działanie niepożądane. Tym samym możliwe jest wyznaczenie efektów ostrych i przewlekłych u organizmów, które na przykład należą do różnych poziomów troficznych. Działanie biotestu opiera się na założeniu, że reakcja biowskaźników narażonych na działanie toksykantów jest podobna do reakcji, jaka może pojawić się u innych organizmów, które zasiedlają dany ekosystem. Ponadto, zmiany, które będą zachodziły w badanych organizmach pod wpływem substancji toksycznych wpłyną bezpośrednio np. na zahamowanie ich wzrostu/rozwoju a pośrednio na strukturę i funkcjonowanie całego ekosystemu. Jako biowskaźniki wykorzystuje się najczęściej: bakterie (*Vibrio fischeri*, *Pseudomonas fluorescense*), pierwotniaki (*Tetrahymena thermophila*), dżdżownice (*Eisenia fetida*), skorupiaki (*Heterocypris incongruens*), stawonogi (*Daphnia magna*). Przykładowo, w testach ekotoksykologicznych do oceny jakości wody stosuje się obecnie organizmy, należące do różnych grup taksonomicznych, powszechnie występujących w ekosystemach słodkowodnych lub morskich – w ten sposób, przy jednoczesnym fakcie, że rejestrowane są różne reakcje na działanie toksykanta (punkt końcowy testu) – wynik testu jest wiarygodny w kontekście oceny oddziaływania zanieczyszczeń na ekosystemy wodne (Tab. 1).

Testy ekotoksykologicznych stosuje się do w badaniach toksyczności ostrej, podostrej (subletalnej) i przewlekłej (chronicznej). Krótki czas ekspozycji przy jednorazowym podaniu toksykanta w wysokim stężeniu/dawce jest charakterystyczną cechą badania toksyczności ostrej. Skutkiem takiego działania jest śmierć organizmu testowego, a parametrem doświadczalnym jest stężenie śmiertelne (LC50, *Lethal Concentration*)/dawka śmiertelna (LD50, *Lethal Dose*), czyli stężenie/dawka wywołujące po ustalonym czasie śmierć 50% osobników badanej populacji. Dłuższy czas ekspozycji i bardziej opisowe wyniki charakteryzują metody badania toksyczności podostrej i przewlekłej. Efektem tych badan jest np. zmiana intensywności procesów komórkowych i biochemicznych organizmów testowych. W badaniach ekotoksyczności przewlekłej wyznacza się wartość tzw. stężenia efektywnego (EC50, *Effect concentration*), czyli takie, które wywołuje spodziewane efekty toksyczne u 50% populacji organizmów testowych.

Sz szczególnie łatwe, szybkie i proste w wykonaniu okazały się testy ekotoksykologiczne wykorzystujące bakterie. Rozmiar tych mikroorganizmów oznacza, że obserwowane i mierzone efekty dotyczą dużej liczby (wielu milionów) organizmów testowych. Czas trwania testów bakteryjnych jest znacznie skrócony w porównaniu do klasycznych testów biologicznych, w których wykorzystuje się organizmy wyższe. Koszty związane z testami bakteryjnymi są znacznie niższe niż w przypadku badań ekotoksyczności wobec bezkręgowców i kręgowców a kwestie etyczne (szczególnie związane z testowaniem kręgowców) nie budzą obaw. Na aktywność metaboliczną i fizjologiczną bakterii substancje toksyczne wpływają znacznie szybciej niż na organizmy wyższe, co także potwierdza celowość ich stosowania. Szacuje się, że około 30% wszystkich testów biologicznych stosowanych w badaniu wody słodkiej opiera się na bakteriach (około 40% na bezkręgowcach, 10% na glonach i rybach). W przypadku analizy ścieków, testy bakteryjne stanowią prawie 30% wszystkich stosowanych testów i są na drugim miejscu, po testach wykorzystujących bezkręgowce (35%). Z kolei, w testach biologicznych do oceny osadów, najczęściej używa się bezkręgowce (60%) i bakterie (25%) (Repetto 2013). W przypadku badania substancji chemicznych pod kątem ich potencjalnie toksycznych właściwości, testy bakteryjne stanowią dobrą metodę wstępnej selekcji (test przesiewowy), ponieważ pozytywny wynik testu będzie wskazywał na prawdopodobne toksyczne właściwości badanego związku i będzie podstawą do wykonywania dalszych badań. W testach bakteryjnych ocenę punktu końcowego dokonuje się na podstawie zmian w morfologii, aktywności życiowej, wzrostu, rozwoju lub życia komórek pod wpływem działania substancji toksycznych. Sam mechanizm toksycznego działania poszczególnych związków jest różny, a obserwowane skutki mogą wynikać z działania toksykanta na receptory komórkowe,

upośledzenia funkcji membrany komórkowej, inhibicji aktywności enzymów komórkowych oraz bezpośrednich reakcji z elementami składowymi komórki.

**Tab. 1.** Charakterystyka przykładowych komercyjnych mikrobiotestów stosowanych w badaniach ekosystemów wodnych.

POZIOM TROFICZNY	BIOTEST	PUNKT KOŃCOWY	POMIAR PUNKTU KOŃCOWEGO
Testy w fazie ciekłej			
DESTRUENT	Bakteryjny test <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)	Inhibicja bioluminescencji (toksyczność ostra)	15 min – IC25
DESTRUENT	MARA (wielogatunkowy test płytkowy do oceny ryzyka środowiskowego)	Zahamowanie wzrostu 11 gatunków drobnoustrojów (toksyczność przewlekła)	18h – MTC
GŁÓWNY PRODUCENT	Mikropłytkowy test z algami <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Zahamowanie wzrostu (toksyczność przewlekła)	72h – IC25/IC50
GŁÓWNY KONSUMENT	Test na mikrokorupiakach <i>Thamnocephalus platyurus</i> (test Thamno Toxkit®)	Śmiertelność (toksyczność ostra)	24h – LC50
WTÓRNY KONSUMENT	Test na parzydełkowcach <i>Hydra attenuata</i>	Zmiany morfologiczne (toksyczność podostra)	96h – EC50
	Badanie na komórkach rybnych (pierwotny test hepatocytów pstrąga tęczowego)	Cytotoksyczność (toksyczność podostra)	48h - TEC
Testy w fazie stałej			
DESTRUENT	Bakteryjny test <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)	Inhibicja bioluminescencji (toksyczność ostra)	20 min – IC25
GŁÓWNY KONSUMENT	ASPA (oznaczenie glonów w fazie stałej) z <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Zahamowanie aktywności esterazy (toksyczność podostra)	24h – IC50

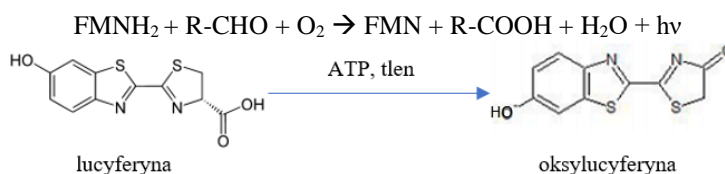
## 2. Microtox®

Przykładem testu toksyczności ostrej jest Microtox®. Został opracowany w 1979 r. w Stanach Zjednoczonych (Bulich 1982; Krzemińska 2004) i stanowi cenne narzędzie do badań przesiewowych w celu monitorowania zanieczyszczeń chemicznych, które trafiają do środowiska. Zaletą testu Microtox® jest połączenie bioindykacji z precyzją instrumentalną. Obecnie, jest on najczęściej stosowanym testem bioindykacyjnym ze względu na wrażliwość, która zbliżona jest do wrażliwości organizmów wyższych (Kaiser et al. 1991).



Organizmami wskaźnikowymi w tym teście są bakterie *Vibrio fischeri* (*Photobacterium fischeri*) oraz *Vibrio harvey* z rodzaju *Vibrio* (Backhaus i Grimme 1999; Abbas et al. 2018). Na podłożu stałym tworzą kolonie, powstające przez wielokrotnie podziały komórek bakteryjnych. Bakterie te zawierają enzym lucyferynę, która składa się z długiego, oligomerycznego łańcucha aldehydowego i zredukowanej formy fosforanu ryboflawiny. Za luminescencję odpowiada gen lux, kodujący ten enzym. W obecności tlenu lucyferyna łączy się ze zredukowanym mononukleotydem flawinowym. W trakcie tej reakcji dochodzi do utlenienia łańcucha aldehydu do kwasu tłuszczowego i równocześnie lucyferyna przechodzi w stan wzbudzony (oksy lucyferyna). Ze względu na dużą niestabilność, oksylucyferyna łatwo przechodzi do stanu podstawowego i towarzyszy temu emisja promieniowania o długości fali  $\lambda = 490$  nm (światło niebiesko-zielone).

Sumarycznie, podczas bioluminescencji bakterii z rodzaju *Vibrio* zachodzą następujące reakcje (Pajor i in. 2017):



Inhibicja enzymów zmienia nie tylko szybkość zachodzenia poszczególnych reakcji, ale również ilość wyemitowanego światła (Traczewska 2008). Intensywność świecenia bakterii zależy m.in. od ilości dostępnego tlenu. W normalnych warunkach na wytwarzanie światła zużywa się około 10% metabolizmu bakterii.

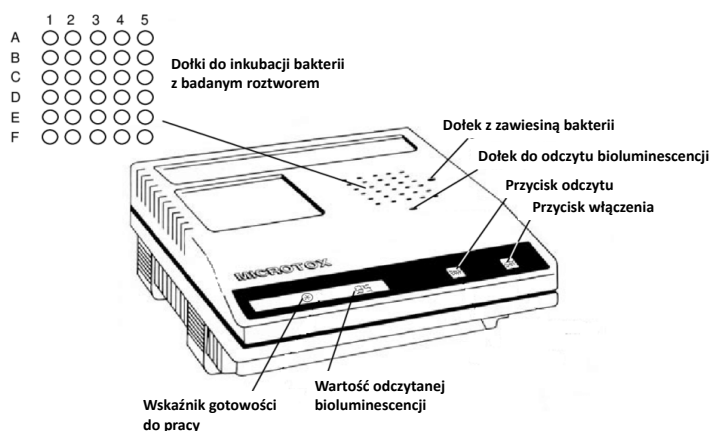
Nowością w teście Microtox® było użycie liofilizowanych bakterii. W takiej postaci bakterie mogą być przechowywane przez rok w temperaturze -20°C. Mogą być one użyte w testu w dowolnej chwili, po uprzednim zawieszeniu ich w wodzie dejonizowanej. Procedury związane z wykonaniem biotestu nie są skomplikowane (Rys.1). Polegają na zmieszaniu zawiesiny bakterii z równą ilością substancją toksyczną w 2% roztworze NaCl. Test Microtox® wykorzystuje jedynie bakterie morskie, więc nie jest on reprezentatywny dla ekosystemów słodkowodnych. Do przygotowania próby kontrolnej należy użyć tej samej zawiesiny bakterii i wcześniej przygotowanego 2% roztworu NaCl. Reakcją testową jest obniżenie luminescencji bakterii. Czas inkubacji wynosi 15 minut w temperaturze 15°C. W teście wyznaczana jest wartość EC50. Oznacza ona takie stężenie substancji toksycznej, przy którym bioluminescencja bakterii *Vibrio* jest zahamowana na poziomie 50% w czasie trwania doświadczenia. Istnieje zależność pomiędzy intensywnością luminescencji bakterii a stężeniem dodawanego do próbki toksykanta – im wyższe jest jego stężenie, tym niższa jest intensywność „świecenia” bakterii. Do zalet testu Microtox® należy szybkość wykonywanych analiz, prostota, czułość oraz powtarzalność. Za pomocą tej metody możliwe jest wykrycie ponad 1 300 związków chemicznych. Microtox® ma jednak ograniczone zastosowanie w przypadku obecności w materiale badanym związków powierzchniowo czynnych lub innych substancji, które mogą spowodować zmniejszenie napięcia powierzchniowego.

Obecnie stosuje się tzw. „kinetyczny test bakterii luminescencyjnych”, która jest zmodyfikowaną wersją „podstawowego” testu Microtox®. W omawianej wersji testu używa się dwóch szczepów bakterii (*Vibrio* i *Photobacterium phosphoreum*) a jego działanie opiera się na połączeniu dwóch efektów: inhibicji luminescencji bakterii *Vibrio* oraz inhibicji wzrostu *Photobacterium phosphoreum*. W zmodyfikowanym teście uwzględnia się trzy punkty końcowe:

- inhibicję luminescencji po 30 minutach (tzw. ostra)
- inhibicja luminescencji po 24 godzinach (tzw. przewlekła) oraz
- inhibicja wzrostu po 14 godzinach.

Zaletą tego biotestu jest możliwość przeprowadzenia skutecznej oceny toksyczności krótkoterminowej i długoterminowej. Może być również stosowana jako wstępny test przesiewowy próbek środowiskowych lub substancji o nieznanymi właściwościami toksykologicznymi.

Podobnymi testami, opartymi na analogicznych założeniach co Microtox®, są niemiecki Lumistox oraz fiński Biotox.



Rys. 1. Schemat analizatora Microtox®.

Pod koniec lat 90-tych XX wieku przeprowadzono pierwsze eksperymenty, polegające na wstawianiu genu *lux* (odpowiedzialnego za zjawisko bioluminescencji) do chromosomu komórek *Escherichia coli*. W ciągu ostatnich 25 lat pojawiło się wiele „rekombinowanych” bakterii bioluminescencyjnych wykorzystywanych do wykrywania toksyczności ogólnej lub poszczególnych związków. Przykładowo, *E. coli DNT5* zawierający *nagR-nagA::luxCDABE*<sub>pl</sub> stosowano do oceny toksyczności powodowanej przez kwas salicylowy a *P. fluorescens OS8* zawierający *dmpR-Po::luxCDABE*<sub>pl</sub> do oceny toksyczności powodowanej przez fenol i jego pochodne (Thouand i Durand 2013). Dużą zaletą rekombinowanych bakterii luminescencyjnych jest wysoka czułość na obecność toksykantów jednak ze względu na wysokie koszty otrzymania zmodyfikowanych bakterii nie wprowadzono na rynek testów komercyjnych.

### 3. MARA® (Microbial Assay for Risk Assessment)

Początkowo projektowanie testów bakteryjnych opierało się na jednym gatunku. Jednak jest to mało prawdopodobne, aby ocena toksyczności określona na podstawie reakcji pojedynczego gatunku była miarodajna, zwłaszcza w przypadku badania toksyczności próbek środowiskowych. Test MARA® jest przykładem coraz popularniejszych ostatnio „baterii testów” (Wadhia 2013). Jest to wielogatunkowy biotest toksyczności chronicznej, wykorzystujący jako organizmy testowe 11 niepatogennych mikroorganizmów środowiskowych

- 1 organizm eukariotyczny (drożdże – *Saccharomyces cerevisiae*),
- 10 organizmów prokariotycznych.

Wybrane szczepy charakteryzują się szeroką różnorodnością genetyczną. Zapewnia to duży zakres wrażliwości na badane toksykanty, jak również stwarza warunki testowe lepiej odzwierciedlające te, które panują w prawdziwym ekosystemie (w porównaniu do testów jednogatunkowych). Wśród organizmów prokariotycznych najczęściej stosowane są *Pseudomonas fluorescens*, *Microbacterium trichothecenolyticum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Micrococcus* sp., *Aeromonas caviae*, *Serratia rubidaea*, *Staphylococcus warneri*, *Kurthia gibsonii*. *Pseudomonas fluorescens* to saprofityczna bakteria, która dzięki obecności fluorescencyjnego barwnika wykazuje zdolność do świecenia w promieniach UV. *Microbacterium trichothecenolyticum* jest bakterią Gram dodatnią, którą można powszechnie izolować ze środowiska przyrodniczego. *Stenotrophomonas maltophilia* występuje powszechnie, może kolonizować zwierzęta i rośliny oraz sprzęt medyczny, będąc przyczyną zakażeń szpitalnych. *Aeromonas hydrophila* jest bakterią Gram ujemną, która zasiedla wody słodkie i słone. *Escherichia coli* stanowi ważny składnik kałowego zanieczyszczenia wody. Jest głównym składnikiem mikrobiota jelita cienkiego i grubego. Bakterie z rodzaju *Micrococcus* sp. można wyizolować z ludzkiej skóry. *Aeromonas caviae* należą do Gram ujemnych bakterii, których naturalnym miejscem występowania jest woda i gleba. *Serratia rubidaea* jest względnie beztlenową, Gram ujemną bakterią. Stanowi

główny czynnik zakażeń oportunistycznych. *Staphylococcus warneri* jest składnikiem flory skórnej u ludzi i zwierząt. Rzadko powoduje choroby. *Kurthia gibsonii* w większości przypadków nie są uważane za chorobotwórcze.

W teście MARA® mikroorganizmy są umieszczone w studzienkach 96-dółkowej polistyrenowej mikro płytki, a badanie przeprowadza się równocześnie wobec wszystkich szczepów. Inkubuje się je w pożywce z dodatkiem barwnika (bezbarnego chlorku tetrazolinowego) przez 18h i 48h. W przypadku nieobecności toksykantów, barwnik ulega redukcji i jednocześnie zmienia barwę na czerwoną. Z kolei pod wpływem substancji toksycznych barwnik nie zmienia koloru ze względu na inhibicję oddychania komórkowego. Także w przypadku obecności komórek uszkodzonych lub martwych, chlorek tetrazolinowy nie zmienia swojego zabarwienia.

Poniżej przedstawiony został schemat płytki titracyjnej stosowanej w teście MARA® (Rys.2a). Na płytce kolumny pionowe oznaczone są numerami 1-12 a wiersze: literami A-H. Rząd A stanowi kontrolę ujemną biotestu, tzn. w każdym z dołków tego rzędu obecne są wyłącznie badane mikroorganizmy testowe, bez dodatku substancji toksycznej. W rzędzie H, w dołkach 1-11 są umieszczone liofilizowane mikroorganizmy. W celu ich aktywacji (po dodaniu roztworu peptonu sojowego z dodatkiem 0,02% roztworu chlorku tetrazolinowego), płytki umieszcza się w cieplarni o temperaturze 30°C. Po określonym czasie płytki wyjmuje się, a zawiesinę komórek (z rzędu H) przenosi do każdego z dołków w rzędach G-A. Następnie, w gradiencie stężenia, do każdego z dołków w rzędach G-B dodaje się badaną substancję toksyczną. Tak przygotowaną płytkę titracyjną umieszcza się w cieplarni w temperaturze 30°C na 18 godzin. Po upływie czasu, płytkę skanuje się i ponownie inkubuje w cieplarni przez 24 godziny. Powstały na 96-dółkowej płytce swoisty, niepowtarzalny wzór określany jest mianem FIP (*fingerprint*) (Rys.2b). Uzyskany schemat umożliwia ocenę toksycznego działania (potencjalnie) toksycznego związku na poszczególne szczepy mikroorganizmów oraz uzyskanie zależności między stężeniem toksykanta a intensywnością inhibicji wzrostu komórek (Nałęcz-Jawecki 2008).

Do wykonania obrazu płytki testowej wykorzystuje się skaner a obraz jest następnie analizowany za pomocą specjalnego oprogramowania. Punktem końcowym testu jest mikrobiologiczne stężenie toksyczne (*Microbial Toxic Concentration, MTC*), wyznaczane dla każdego z badanych szczepów.

Główną zaletą testu MARA® jest fakt, że jest to test wielogatunkowy, dzięki czemu lepiej odzwierciedla rzeczywistą odpowiedź organizmów środowiskowych na działanie substancji toksycznej. Ponadto to test prosty i łatwy w wykonaniu, nie wymaga użycia drogiego sprzętu laboratoryjnego (jedynie cieplarki) ani prowadzenia hodowli komórkowych. Znalazł on zastosowanie do oceny toksyczności ścieków oczyszczonych, gleby, odcieków ze składowisk, osadów ściekowych z oczyszczalni, farmaceutyków, biocydów i in.

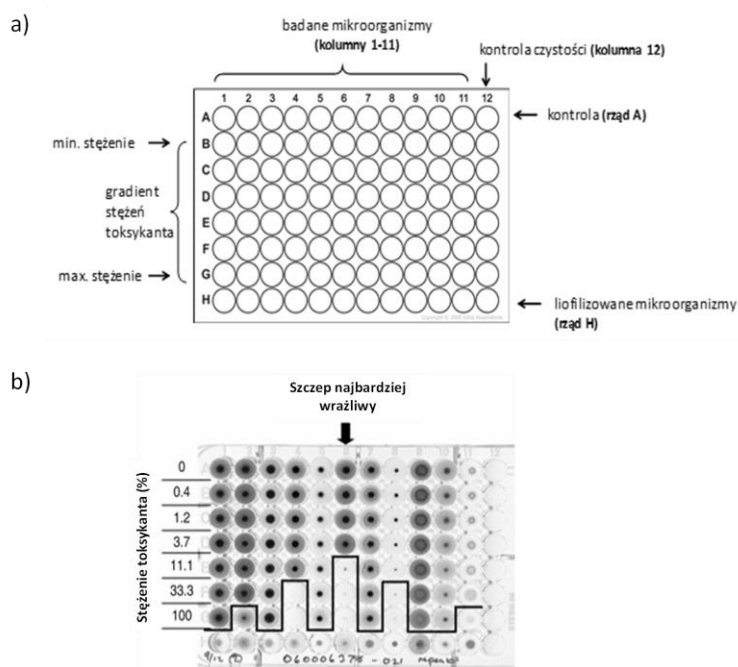
W ostatnich latach opracowano również modyfikacje „klasycznego” biotestu MARA. Jedną z nich to LumiMARA® - test do szybkiej oceny toksyczności. Wykorzystuje on 11 naturalnie bioluminescencyjnych szczepów bakterii: 9 szczepów morskich i 2 słodkowodnych. Zasada działania tego biotestu polega na pomiarze spadku bioluminescencji po ekspozycji szczepów bakterii na badaną próbkę. Bioluminescencję mierzy się za pomocą luminometru, a otrzymane dane wyraża się jako wartości EC50 lub % hamowania. Inną modyfikacją jest DermaMARA® stosowany do testowania kosmetyków. Ten wielogatunkowy biotest wykorzystuje 11 gatunków drobnoustrojów skórnych, zarówno patogenów jak i komensali. Organizmy wykazują zróżnicowaną wrażliwość na produkty i składniki do pielęgnacji skóry. Obecnie w trakcie badań są kolejne modyfikacje MARA® z przeznaczeniem do oceny toksyczności antybiotyków i środków dezynfekujących.

#### **4. Podsumowanie**

Obecnie obserwuje się, że istotnym czynnikiem ingerującym w nasze środowisko jest działalność człowieka. Silny rozwój przemysłu i obszarów gospodarczych, jak również wzrost urbanizacji miast może być przyczyną wzrostu zanieczyszczeń, w szczególności tych uwalnianych do gleby, która stanowi istotny element w łańcuchu troficznym. Ochrona środowiska stanowi istotne znaczenie w utrzymywaniu różnorodności biologicznej oraz życia społecznego. Właściwe

gospodarowanie odpadami, ograniczanie emisji zanieczyszczeń gazowych i pyłowych, jak również produkowania i uwalniania ścieków pozwoli na ochronę naszego otoczenia.

Istotne znaczenie mają również badania, mające na celu ocenę stanu środowiska. Obecnie obserwuje się wzrost zainteresowania metodami bioindykacyjnymi, w tym testami biologicznymi. W Polsce jest to stosunkowo nowy kierunek badań, jednak można zauważyć, że odczuwa się coraz większą potrzebę stosowania w codziennej praktyce testów, które mogłyby w krótkim czasie ocenić toksyczność gleby lub wody. Biotesty stanowią doskonałą formę oceny stanu środowiska, gdyż w bardziej czuły sposób reagują na zmiany w środowisku. Pozwalają również ocenić wpływ toksykanta na organizmy żywe. Kumulacja substancji toksycznych przez organizm może też wskazać, że dalsza ekspozycja na zanieczyszczenia skutkuje wyginięciem badanej populacji lub zniszczenia całej biocenozy (Traczewska 2011). Ze względu na dużą różnorodność substancji toksycznych pod względem rodzaju i stężenia, na rynku dostępnych jest coraz większa ilość gotowych testów. Fakt ten w dużym stopniu jest uzasadniony prostotą w ich obsłudze, jak również szybkim uzyskiwaniem wyników. Dotychczas stosowane metody opierały się na technikach czasochłonnych i pracochłonnych, a do ich przeprowadzenia konieczny był dostęp do specjalistycznego laboratorium (Kołwzan 2009).



**Rys.2.** Schemat płytki używanej w teście MARA® (a) oraz przykład typowego skanu płytki z zaznaczonym profilem toksyczności badanej próbki (b).

## 5. Literatura

- Abbas M, Adil M, Ethisham-ul-Haque et al. (2018) *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review. *Science of the Total Environment* 626: 1295-1309.
- Backhaus T, Grimme LH (1999) The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* 38 (14): 3291-3301.
- Bulich AA (1982) A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. *Process Biochemistry* 17: 45-47.
- Kołwzan B (2009) Zastosowanie czujników biologicznych (biosensorów) do oceny jakości wody. *Ochrona środowiska* 31 (4): 3-14.
- Kaiser KLE, Esterby SR (1991) Regression and cluster analysis of the acute toxicity of 267 chemicals to six species of biota and the octanol/water partition coefficient. *Science of The Total Environment* 109/110: 499-514.

- Krzemińska A (2004) Testy ekotoksykologiczne, czyli nowe trendy w monitoringu jakości wód powierzchniowych i podziemnych – nadgorliwość, czy konieczność. *Gospodarka Wodna* 1: 19-23.
- Nałęcz-Jawecki G, Wielądek A, Siedlecka E (2008) Zastosowanie testu bakteryjnego MARA do oceny ekotoksyczności leków. *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*. PZITS, Wrocław: 237-242.
- Pajor K, Sypniewski D, Bednarek I (2017) Bioluminescencja jako narzędzie w biologii molekularnej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 71: 1033-1049.
- Repetto G (2013) Test batteries in Ecotoxicology. In: Féraud JF., Blaise C. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht.
- Thouand G, Durand MJ (2013) Bacteria in Ecotoxicology: Recombinant Luminescent Bacteria. In: Féraud JF., Blaise C. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht.
- Traczewska TM (2008) Metody biologiczne w kontroli jakości wody. [W:] *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*. PZITS, Szklarska Poręba: 435-442.
- Traczewska TM. Biologiczne metody oceny skażenia środowiska. *Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej*. Wrocław 2011: 1-17, 21-38, 60-61, 76-78, 101-102.
- Wadhia K (2013) Microbial Assay for Risk Assessment (MARA) In: Féraud JF., Blaise C. (eds) *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, Dordrecht.

## 6. Enzymy jako wyznaczniki jakości gleby

Enzymes as determinants of soil quality

Rachwał Kamila<sup>(1)</sup>, Skrzypczak Katarzyna<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

<sup>(2)</sup>Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Grzybów, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Rachwał Kamila: kamila.rachwal@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: aktywność gleby, bioindykatory, stan gleby, kondycja środowiska naturalnego

### Streszczenie

Enzymy glebowe w związku z pełnionymi przez nie funkcjami, związanymi z rozkładem materii organicznej i obiegiem składników odżywczych, są uznawane za wskaźniki jakości gleby. Aktywność enzymów jest ściśle powiązana z organizmami występującymi w glebie, zwłaszcza mikroorganizmami. Źródłem tych cząsteczek w glebie są drobnoustroje, rośliny oraz zwierzęta bytujące w glebie. Produkowane przez nie enzymy współdziałają w celu zwiększenia dostępności składników odżywczych w ryzosferze, będąc zaangażowane w hydrolizę substratów węglowych i organicznych form substancji odżywczych takich jak związki azotu, fosforu i siarki. Zmiana aktywności enzymów może być następstwem przemian zachodzących w środowisku. Ich wysoka aktywność jest ściśle skorelowana z dobrą jakością i żyznością gleby. Określenie tego parametru za pomocą testów biochemicznych pozwala na wykazanie zmian w glebie wynikających z sposobu gospodarowania gruntami czy z występujących w glebie zanieczyszczeń. Do enzymów najczęściej oznaczanych w glebie w celach określenia jej jakości należą enzymy z klasy hydrolaz (np.  $\beta$ -glukozydaza, alkaliczna fosfataza), oksydoreduktaz (np. dehydrogenaza), liaz (np. dekarboksylaza glutaminianu) i transferaz (np. transferaza tiosiarczanu). Określenie ich aktywności pozwala na biologiczną ocenę stanu gleby.

### 1. Wstęp

Enzymy są biologicznymi cząsteczkami (zazwyczaj białkami), które znacznie przyspieszają tempo reakcji chemicznych zachodzących w komórkach (Cooper 2000). Enzymy glebowe zwiększają szybkość reakcji rozkładu pozostałości roślinnych i uwalniają dostępne dla roślin składniki odżywcze. W związku z tym odgrywają ważną rolę w procesie rozkładu materii organicznej i obiegu składników odżywczych. Cząsteczki te są istotnym wyznacznikiem jakości gleby i zmian zachodzących w środowisku ponieważ reagują na zmiany w gospodarce glebowej na długo przed pojawieniem się innych wykrywalnych zmian wskaźników jakości gleby.

### 2. Opis zagadnienia

Enzymy są katalizatorami reakcji chemicznych. Są one istotne dla przemian substancji, również w środowisku glebowym. Substancja, na którą działa enzym glebowy, nazywana jest substratem. Enzymy są specyficzne dla danego substratu i mają miejsca aktywne, które wiążą się z substratem tworząc tymczasowy kompleks. W wyniku reakcji enzymatycznej uwalniany jest produkt, który może być składnikiem odżywczym zawartym w podłożu. Źródłem enzymów glebowych są żywe i martwe mikroorganizmy, korzenie i pozostałości roślin oraz zwierzęta glebowe. Enzymy unieruchomione na cząstkach gleby gromadzą lub tworzą kompleksy z materią organiczną (próchnicą), ilami i glinami próchnicowymi. Są też w dużej mierze związane z bakteriami zasiedlającymi glebę. Uważa się, że część aktywności enzymatycznej może pochodzić od ustabilizowanych enzymów, natomiast pozostała aktywność jest skorelowana z biomasą mikrobiologiczną. Dlatego też aktywność enzymów w glebie jest przede wszystkim skumulowanym

efektem długotrwałej aktywności mikrobiologicznej i aktywności populacji bakterii żywych w chwili pobierania próbek (Gainfreda 2015).

Termin "jakość gleby" jest używany do określenia zdolności konkretnego rodzaju gleby do produkcji żywności oraz funkcjonowania w naturalnych lub zagospodarowanych ekosystemach, w celu utrzymania wydajności roślin i zwierząt, utrzymania lub poprawy jakości wody i powietrza oraz wspierania zdrowia ludzkiego (Doran i Jones 1996). Grunty podlegające praktykom gospodarowania mającym na celu promowanie jakości gleby zwykle wykazują większą aktywność biologiczną, czego odzwierciedleniem jest również wyższa aktywność enzymów glebowych. Brak lub zahamowanie aktywności enzymów glebowych hamuje lub ogranicza procesy, które mogą wpływać na odżywianie roślin. Słaba aktywność enzymów (np. enzymów degradujących pestycydy) może także prowadzić do akumulacji substancji chemicznych, które są szkodliwe dla środowiska. Niektóre z tych substancji chemicznych mogą dodatkowo hamować aktywność enzymów glebowych. Z kolei większa produkcja organicznych koloidów i agregatów w glebie przyczynia się do stabilizacji i ochrony enzymów, które są związane z matrycą glebową. Enzymy pełnią istotne funkcje w glebie. Niektóre z nich jedynie ułatwiają rozkład materii organicznej (np. hydrolaza, glukozydazy), podczas gdy inne uczestniczą w mineralizacji składników odżywczych (np. amidaza, ureaza, fosfataza, siarczany) (Adetunji i in. 2017).

Wśród różnych wskaźników biologicznych, które zostały zaproponowane w celu monitorowania zdrowia gleby, enzymy glebowe mają duży potencjał, aby zapewnić biologiczną ocenę stanu i jakości gleby oraz dają możliwość oceny zdrowia fauny i flory glebowej.

### **3. Przegląd literatury**

Jakością gleby określana jest jej zdolność do zaspokojenia określonych potrzeb człowieka, takich jak np. wspieranie wzrostu roślin. Powiązana jest ona silnie ze zdrowiem gleby, które odzwierciedla ekologiczne cechy gleby mające wpływ na jej jakość lub zdolność do produkcji danej rośliny uprawnej.

Aktywność enzymów glebowych jest uważana za wskaźnik żyzności gleby, ponieważ odzwierciedla ona różne czynniki, takie jak klimat, rodzaj uprawy, czynniki edaficzne itd. Enzymy glebowe są istotne w rolnictwie ze względu na ich rolę w obiegu składników odżywczych i rozkładzie materii organicznej (Tab. 1). Są wskaźnikami specyficznych reakcji biochemicznych w glebie ze względu na ich powiązania z biologią gleby i szybkie reagowanie na zmiany w gospodarce gruntami (Zhang i in. 2010).

Aktywność enzymów zmniejsza się wraz z głębokością gleby i zmienia się w zależności od pory roku i rodzaju pokrywy roślinnej. Na parametr ten wpływ mogą mieć również pestycydy, herbicydy i odpady organiczne. Aktywność enzymów glebowych jest zatem dobrym wskaźnikiem praktyk stosowanych w gospodarce rolnej, skuteczności działań rekultywacyjnych, a także wpływu zanieczyszczeń na zdrowie gleby. Aktywność enzymów może być stosowana jako wskaźnik w celu wykrycia zmian zachodzących w środowisku glebowym, np. zmiana aktywności biologicznej i jakości gleby po wdrożeniu nowego systemu zarządzania gruntem. Enzymy glebowe mają jednak pewne ograniczenia jako wskaźniki zanieczyszczenia gleby, a informacje o aktywności enzymów muszą być uzupełnione o informacje o innych biochemicznych właściwościach gleby.

Enzymy jako wskaźniki wykazują pewne cechy, których brak fizykochemicznym wskaźnikom stanu gleby. Konceptyjne uzasadnienie aktywności enzymów glebowych jako wskaźnika zdrowia gleby opiera się na obserwacjach, że aktywność enzymów:

- jest związana z ważnymi parametrami fizycznymi gleby i jej właściwościami (np. ilością materii organicznej, właściwościami fizycznymi gleby, aktywnością mikrobiologiczną, biomasa)
- zmienia się znacznie szybciej (w ciągu miesięcy do 1 - 2 lat) niż inne właściwości (takie jak np. zawartość węgla organicznego w glebie), w odpowiedzi na różne sposoby gospodarowania glebą lub zakłócenia w tym zakresie
- służy jako integrujący wskaźnik biologiczny gleby w dotychczasowej gospodarce glebowej
- obejmuje procedury, które są stosunkowo proste i niedroge (Alkorta i in. 2003).

Tab. 1. Rola wybranych enzymów glebowych (Das i Varma 2011).

Enzym	Substancje organiczne na które działa	Produkt końcowy	Znaczenie	Funkcja gleby, której jest wskaźnikiem
<b>Beta glukozydaza</b>	Związki węgla	Glukoza (cukier)	Źródło energii dla mikroorganizmów	Rozkład materii organicznej
<b>Enzymy hydrolizujące FDA</b>	Materia organiczna	Węgiel i różne składniki odżywcze	Źródło energii i składników odżywczych dla mikroorganizmów	Rozkład materii organicznej, obieg substancji odżywczych
<b>Amidaza</b>	Związki węgla i azotu	Jony amonowe (NH <sub>4</sub> )	NH <sub>4</sub> dostępny dla roślin	Obieg substancji odżywczych
<b>Ureaza</b>	Azot (mocznik)	Amoniak (NH <sub>3</sub> ) i dwutlenek węgla (CO <sub>2</sub> )	NH <sub>4</sub> dostępny dla roślin	Obieg substancji odżywczych
<b>Fosfataza</b>	Fosfor	Fosforany (PO <sub>4</sub> )	P dostępny dla roślin	Obieg substancji odżywczych
<b>Sulfataza</b>	Siarka	Siarczany (SO <sub>4</sub> )	S dostępna dla roślin	Obieg substancji odżywczych

Aktywność enzymów mierzona jest pośrednio w laboratorium za pomocą testów biochemicznych. Oznaczenia enzymów są postrzegane jako wskaźnik ponieważ odzwierciedlają potencjalną aktywność a nie reprezentują prawdziwych poziomów aktywności *in situ*. Najczęściej w próbkach gleby oznaczana jest aktywność enzymów z grup wymienionych w Tab. 2.

Tab. 2. Główne grupy oznaczanych enzymów glebowych.

Klasa enzymów	Przykłady enzymów z danej grupy
<b>Oksydoreduktazy</b>	Dehydrogenazy, katalazy, peroksydazy, oksydazy polifenoli
<b>Hydrolazy</b>	Fosfataza, sulfataza, glukozydazy, galaktozydazy, amylaza, celulaza, inwertazy, sacharaza, proteinaza, peptydaza, ureaza, asparaginaza, glutaminaza, amidaza
<b>Transferazy</b>	Dekstranosacharaza, transferaza tiosiarczanu, rodanaza
<b>Liazy</b>	Dekarboksylaza glutaminianu, dekarboksylaza tyrozyny, amoniako-liaza L-histydyny
<b>Enzymy hydrolizujące dioctan fluoresceiny (FDA)</b>	Różne enzymy o tej aktywności

Przykładem enzymu, który teoretycznie może występować tylko w żywych komórkach, a nie w kompleksach glebowych, jest dehydrogenaza. Należy ona do klasy oksydoreduktaz (Tab 2). Ponieważ oksydoreduktazy wykazują pozorny brak specyfiki substratowej, są one zdolne do przekształcania organicznych ksenobiotyków. Dehydrogenaza jest enzymem, który utlenia materię organiczną gleby poprzez przenoszenie protonów oraz elektronów z substratów do akceptorów. Dehydrogenaza funkcjonuje jako integralna część nienaruszonych komórek i odzwierciedla całkowitą aktywność oksydacyjną mikroflory glebowej, ważną w utlenianiu materii organicznej gleby. Jest ona wskaźnikiem aktywności żywych komórek drobnoustrojów, ale jest mniej odpowiednia do przewidywania długoterminowych zmian w środowisku glebowym, ponieważ odzwierciedla skutki aktualnego zarządzania glebą lub sezonowe zmiany, które mogą być przejściowe. Pomiar aktywności dehydrogenazy pozwala lepiej zrozumieć wpływ zabiegów rolniczych, takich jak stosowanie pestycydów czy innych praktyk gospodarowania, na zdrowie gleby. Pozwala także na bezpośrednie określenie aktywności mikrobiologicznej gleby. Innym przykładem enzymu należącego do



oksydoreduktaz jest oksydaza polifenolowa. Utlenia ona związki fenolowe, a także bierze udział w procesie humifikacji (Dick 1997).

Enzymy hydrolityczne (Tab. 2) są zaangażowane w kluczowe reakcje związane z obiegiem pierwiastków takich jak węgiel, azot fosfor i siarka. Tworzą one klasę enzymów katalizujących hydrolizę wiązań kowalencyjnych. Mikroorganizmy wykorzystują hydrolazy do degradacji naturalnych polimerów organicznych w celu wykorzystania ich jako źródła energii. Ponadto biorą one udział w metabolizmie ksenobiotyków, takich jak pestycydy. Hydrolazy są jednymi z enzymów najczęściej oznaczanych w glebach i są powszechnie stosowane jako bioindykatory (ze względu na to, że organizmy rozkładające pozostałości organiczne są prawdopodobnie głównym czynnikiem przyczyniającym się do aktywności gleby) (Souza i in. 2018). Przykładem hydrolaz występujących w ryzosferze są fosfatazy. Fosfatazy katalizują rozpad organicznych związków fosforu (m.in. estrów fosforu pochodzenia organicznego i bezwodników kwasu fosforowego) do nieorganicznej postaci fosforu. Jest to istotne ze względu na to, że rośliny, podobnie jak i inne organizmy, wykorzystują wyłącznie nieorganiczne związki fosforu w postaci jonów ortofosforanowych. Zapotrzebowanie roślin na fosfor pokrywane jest w większości z transformacji glebowej materii organicznej. Występowanie fosfataz w glebie wynika z obecności grzybów i komórek bakteryjnych bytujących głównie w ryzosferze oraz z samych korzeni roślinnych. Zatem mineralizacja fosforu organicznego zachodzi głównie z udziałem mikroorganizmów, a aktywność fosfataz odgrywa ważną rolę w degradacji organicznych związków fosforu po początkowym rozkładzie katalizowanym przez wieloskładnikowe systemy enzymatyczne. Aktywność fosfataz w środowisku glebowym zależy od wielu czynników, wśród których najważniejsze to: sprawność katalityczna enzymu, warunki fizyczne i chemiczne gleby, skład i różnorodność mikroorganizmów, ilość fosforu w glebie, temperatura i wilgotność, a także sposób użytkowania gleby (George i in. 2002). Znaczenie fosfataz jest duże zarówno w rolnictwie, jak też z ekonomicznego punktu widzenia, związanego ze zmniejszeniem nakładów finansowych na fosforowe nawozy mineralne. Do fosfataz najczęściej badanych w glebie należą fosfomonoesterazy: kwaśna i zasadowa, które odgrywają istotną rolę w cyklu biogeochemicznego krążenia fosforu w przyrodzie. Enzymy te mogą być wykorzystywane jako wskaźniki odczynu pH gleby optymalnego dla wzrostu plodów rolnych. Zaobserwowano, że stosunek aktywności fosfatazy zasadowej do kwaśnej jest czułym wskaźnikiem zmian pH w glebie, zwłaszcza wzbogaconej materią organiczną. Wykazano, że aktywność fosfataz w strefie korzeniowej roślin wpływa na ich zdolność do przyswajania fosforu pochodzącego z różnych substratów organicznych zawierających ten pierwiastek (Gianfreda 2015). Najwyższą aktywność fosfatazy kwaśnej zaobserwowano w ryzosferze łubinu białego, bobu, fasoli, groszku i pszenicy, co sugeruje, że zależy ona od gatunku rośliny uprawianej w danej glebie. Ponadto, aktywność tego enzymu jest wyższa w ryzosferze gdy nie stosuje się nawozów fosforanowych (Nuruzzaman i in. 2006).

Innym przykładem enzymu z klasy hydrolaz, istotnym dla jakości gleby, jest ureaza. Katalizuje ona hydrolizę mocznika. Ureaza jest istotna ze względu na jej udział w mineralizacji organicznego azotu do łatwo dostępnego dla roślin azotu amonowego. Jony amonowe podlegają procesom nityfikacji do azotanów (III) i azotanów (V) a te z kolei stanowią źródło azotu dla roślin. Ureaza pełni kluczową rolę w obiegu azotu w przyrodzie, bez jej udziału mogłoby dojść do akumulacji mocznika w środowisku. Enzym ten jest uwalniany z żywych i zdeintegrowanych komórek drobnoustrojów i przyswajany przez cząsteczki gliny oraz magazynowany w kompleksie związków huminowych. Aktywność ureazy biorącej udział w przemianach azotu w glebach jest istotnie różnicowana w zależności od zasobności gleby w węgiel organiczny i azot. Badania mające na celu zwyfikowanie wpływu różnych form azotu na wytwarzanie ureazy w glebie o różnicowanej zawartości węgla organicznego wykazały, że jony  $\text{NH}_4^+$  oraz  $\text{NO}_3^-$  stymulują aktywność mikrobiologiczną, jednocześnie te formy azotu hamują w sposób pośredni produkcję ureazy. Inhibicję powodują substancje powstałe wskutek asymilacji tych związków przez drobnoustroje glebowe. Aktywność ureazy może być wykorzystywana jako wskaźnik jakości gleby i zmian w niej zachodzących pod wpływem użytkowania oraz wykorzystywana jest do oceny stanu ekologicznego gleb poddanych działaniu odpadów organicznych. Wysoka jej aktywność uważana jest za parametr świadczący o dobrej jakości gleby. Innymi często oznaczanymi w glebie enzymami odgrywającymi istotną rolę w obiegu i mineralizacji azotu są proteiny hydrolizujące wiązania peptydowe (C-N)

w białkach z utworzeniem małych peptydów i związków aminowych oraz asparaginaza i glutaminaza hydrolizujące wiązania C-N (inne niż peptydowe) w asparaginie i glutaminie, z wytworzeniem amoniaku (Dick 1997).

Kolejnym przykładem hydrolaz jest beta-glukozydaza. Bierze ona udział w rozkładzie resztek pochodzenia roślinnego i jest powiązana z przemianami i obiegiem węgla oraz glebowej materii organicznej. Enzym ten jest produkowany przez szereg organizmów, począwszy od roślin i zwierząt poprzez grzyby i bakterie.  $\beta$ -glukozydaza katalizuje rozkład celobiozy do dwóch cząsteczek glukozy. Jest to końcowy etap hydrolizy celulozy (endohydrolizę wiązania beta-1,4 - D-glukozydowego w celulozie katalizuje inna hydrolaza glebowa - celulaza), w którym uwalniana jest glukoza dostępna dla mikroorganizmów. Celuloza jest jednym z związków organicznych, które najobficiej występują w biosferze, a produkt jej hydrolizy enzymatycznej stanowi cenne źródło energii dla drobnoustrojów glebowych. Z tego względu enzym ten pełni bardzo ważną rolę w obiegu węgla w glebie. Ponieważ  $\beta$ -glukozydaza jest bardzo czuła na działanie różnorodnych czynników, oznaczanie jej aktywności może być pomocne w monitorowaniu jakości gleby. Enzym ten może być wskaźnikiem zmian aktywności biologicznej gleby, jak również wskaźnikiem wpływu zabiegów agrotechnicznych na środowisko glebowe. Wykazano, że wpływają one na kinetykę reakcji enzymatycznej katalizowanej przez  $\beta$ -glukozydazę oraz na stopień stabilizacji enzymu związanego z koloidami glebowymi. Różne zabiegi agrotechniczne w sposób istotny obniżają aktywność enzymatyczną poprzez zmniejszenie ilości enzymu w glebie. Dotyczy to przede wszystkim  $\beta$ -glukozydazy związanej z cząsteczkami gleby.

Hydrolazą biorącą udział w obiegu siarki jest arylosulfataza. Enzym ten jest odpowiedzialny za rozkład estrów siarczanowych i jest wydzielany przez bakterie w odpowiedzi na deficyt siarki w glebie. Aktywność arylosulfatazy jest istotna ze względu na to, że enzym ten uwalnia z materii organicznej siarczan, będący składnikiem odżywczym, którego niedobór jest często czynnikiem ograniczającym wzrost roślin i rozwój mikroorganizmów.

Jednym z przedstawicieli enzymów z grupy z transferaz glebowych jest dekarboksylaza glutamianu. Występuje ona m.in. u roślin wyższych i katalizuje dekarboksylację kwasu glutaminowego. Pełni istotną rolę w metabolizmie azotu. Aktywność enzymu ulega obniżeniu u roślin w warunkach niedoboru azotu, zatem może służyć za wskaźnik jego odpowiedniej ilości w glebie.

Przykładem liazy glebowej jest rodanaza, która jest mitochondrialną tiosiarczanową sulfurtransferazą. Jest to enzym szeroko rozpowszechniony w różnych grupach żywych organizmów: wśród bakterii, grzybów, roślin i zwierząt. Jest to enzym istotny ze względu na udział w metabolizmie siarki, która jest podstawowym pierwiastkiem niezbędnym do życia wielu organizmów. Jest to zauważalne m.in. przez dużą ilość substancji chemicznych, w których skład wchodzi, takich jak: białka zawierające cysteinę i/lub metioninę, białka zawierające siarkę, glutation, węglowodany siarczanowe, siarkowodór i tiosiarczan. Rodanaza odgrywa istotną rolę w utrzymaniu odpowiedniej puli siarki w żywych komórkach. Enzym ten należy do nadrodziny białek biorących udział w różnych procesach, w tym w detoksykacji cyjanoków, tworzeniu klastrów Fe/S, reakcjach redoks, a także transporcie wewnątrzkomórkowym i szlakach regulacyjnych. Badania wykazały, że rodanaza jest również istotna dla funkcjonowania organizmów ponieważ podlega represji katabolicznej i odgrywa rolę w tlenowym metabolizmie energetycznym komórki. (Cipollone i in. 2007).

Hydroliza dioctanu fluoresceiny (FDA) jest jednym z często określanych parametrów gleby. Enzymy hydrolizujące FDA (dioctanu fluoresceiny lub 3', 6'-diacetylofluoresceiny) mają potencjał do szerokiego reprezentowania aktywności enzymów glebowych, ponieważ do grupy tej należy kilka różnych enzymów, takich jak proteazy, lipazy i esterazy, które są produkowane przez różnicowane grupy bakterii i grzybów bytujących w glebie. Wykazano, że oznaczanie spektrofotometryczne hydrolizy FDA metodą spektrofotometryczną jest prostą, czułą i szybką metodą oznaczania aktywności mikrobiologicznej w glebie. Analiza hydrolizy FDA polega na inkubacji próbki gleby z buforem i FDA przez 1 - 2 godziny. Ilość fluorescencyjnego zabarwienia powstającego podczas inkubacji wskazuje na aktywność enzymatyczną społeczności mikroorganizmów w próbce gleby. Aktywność ta służy jako miara ogólnej liczby drobnoustrojów w próbce i wskaźnik użyteczny do oceny zdrowia i jakości gleby (Patle i in. 2018).

#### 4. Podsumowanie

Enzymy glebowe są naturalnymi mediatorami i katalizatorami wielu ważnych procesów glebowych, takich jak rozkład substancji materii organicznej uwalnianej do gleby podczas wegetacji, reakcje tworzenia i rozkładu humusu, produkcja mineralnych składników odżywczych w formach dostępnych dla roślin, wiązanie azotu, a także obieg węgla, azotu i innych podstawowych pierwiastków w przyrodzie. Aktywność enzymatyczna gleby jest uważana za istotny parametr ujawniający stan środowiska naturalnego i ukazujący procesy biochemiczne, który zachodzą w środowisku glebowym. Określanie aktywności enzymów oraz poznanie czynników je regulujących jest istotne dla charakterystyki potencjału metabolicznego i żyzności gleby. Są to cząsteczki użyteczne w ocenie gleby w odniesieniu do ilości bakterii i grzybów ją zamieszkujących oraz do badania procesów biochemicznych zachodzących w glebie i oceny jakości gleby. Określenie aktywności wybranych enzymów w glebie pozwala nie tylko na ocenę jej obecnego stanu, ale również, w połączeniu z danymi dotyczącymi innych właściwości gleby, ułatwia wybór metod zarządzania glebą, co jest szczególnie istotne w kontekście gruntów rolnych. Należy jednak pamiętać, że aktywność enzymów glebowych ma pewne ograniczenia i musi być zawsze rozpatrywana w połączeniu z innymi pomiarami biologicznymi i fizykochemicznymi, jeśli chcemy prawidłowo zdiagnozować stan zdrowia gleby.

#### 5. Literatura

- Adetunji AT, Lewu FB, Mulidzi R i in. (2017) The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. *J Soil Sci Plant Nutri* 17: 794-807.
- Alkorta I, Aizpurua A., Riga P, Albizu I, Amezaga I, Garbisu C (2003) Soil Enzyme Activities as Biological Indicators of Soil Health. *Reviews on environmental health*. 18:65-73.
- Cipollone R, Ascenzi P, Visca P (2007) Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *IUBMB Life* 59:51-59.
- Cooper GM (2000) *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts.
- Das SK, Varma A (2011) Role of enzymes in maintaining soil health. In: Shukla G, Varma A (eds.): *Soil Enzymology*, s. 25–42.
- Dick RP (1997) Soil enzyme activities as integrative indicators of soil health. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSSR eds. *Biological indicators of soil health*. New York, NY, USA: CAB International, 121-156.
- Doran JW, Jones AJ (1996) reface. In: Doran JW., Jones AJ, eds., *Methods for assessing soil quality*. Madison, Wisconsin, USA, SSSA Special Publ. 49, Soil Science Society of America, 11-16.
- George TS, Gregory PJ, Wood M i in. (2002) Phosphatase activity and organic acids in the rhizosphere of potential agroforestry species and maize. *Soil Biol Biochem* 34: 1487–1494.
- Gianfreda L (2015) Enzymes of importance to rhizosphere processes. *J Soil Sci Plant Nutr* 15: 283-306.
- Nuruzzaman M, Lambers H, Bolland MDA (2006) Distribution of carboxylates and acid phosphatase and depletion of different phosphorus fractions in the rhizosphere of a cereal and three grain legumes. *Plant Soil* 28: 109-120.
- Patle PN, Navange NP, Barange PK (2018) Fluorescein Diacetate (FDA): Measure of total microbial activity and as indicator of soil quality. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 7: 2103-2107.
- Souza RC, Cantão ME, Nogueira MA, i in. (2018) Outstanding impact of soil tillage on the abundance of soil hydrolases revealed by a metagenomic approach, *Brazilian J Microbiol* 49: 723-730.
- Zhang YL, Chen LJ, Sun CX i in. (2010) Soil hydrolase activities and kinetic properties as affected by wheat cropping systems of Northeastern China. *Plant Soil Environ.*, 56: 526-532.

Badania dofinansowano ze środków Wojewódzkiego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Lublinie w ramach projektu „Porównanie flory bakteryjnej gleb uprawnych w gospodarstwach konwencjonalnych oraz ekologicznych zlokalizowanych na terenie województwa lubelskiego”.

## **7. Wpływ konwencjonalnego i ekologicznego systemu upraw na społeczność mikroorganizmów glebowych**

The impact of the conventional and ecological cultivation system on the soil microbial community

Rachwał Kamila

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

Rachwał Kamila: kamila.rachwal@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: zarządzanie glebą, aktywność mikroorganizmów glebowych, bioróżnorodność gleby

### **Streszczenie**

Naturalne ekosystemy zostały przekształcone przez ludzi w wyniku uprawy roli mającej na celu przygotowanie optymalnych warunków glebowych dla wzrostu roślin uprawnych. Chociaż uprawa roli ma liczne zalety, to jednak w agroekosystemach pojawiają się także pewne czynniki niekorzystnie oddziałujące na środowisko. W konsekwencji wywołują one zmiany fizycznych, chemicznych i biologicznych właściwości gleby. Ma to wpływ na różnorodność organizmów glebowych, w tym mikroflory. Konwencjonalny i ekologiczny system upraw w odmienny sposób oddziałują na różnorodność, biomasę i aktywność mikroorganizmów glebowych. Jest to istotne zjawisko ze względu na kluczowe funkcje spełniane w glebie przez drobnoustroje. Ich obecność wpływa na właściwości gleby, przemiany substancji odżywczych w glebie oraz na wzrost roślin.

### **1. Wstęp**

Wraz z nadejściem zielonej rewolucji, wydajność rolnictwa została zwiększona poprzez wzmożone nawożenie i stosowanie pestycydów, poprawę nawadniania, systemów zarządzania glebą i uprawami, jak również masową konwersję gruntów. Istnieje jednak coraz większa obawa, że intensyfikacja rolnictwa prowadzi do degradacji ekosystemów na dużą skalę i utraty produktywności w dłuższej perspektywie. Negatywne skutki dla środowiska obejmują degradację gleby, zwiększoną emisję gazów cieplarnianych, akumulację pestycydów oraz zmniejszoną dostępność i jakość wody. W rzeczywistości intensyfikacja rolnictwa jest postrzegana jako jedno z największych zagrożeń dla światowej różnorodności biologicznej. Systemy niskonakładowe, takie jak rolnictwo ekologiczne, które znacznie ograniczają stosowanie nawozów sztucznych, pestycydów, energii i stresu mechanicznego, mają na celu złagodzenie tych negatywnych skutków w celu poprawy zrównoważonej produkcji. Nadal jednak prowadzone są badania mające na celu dokładniejsze zrozumienie wyzwań, korzyści i ograniczeń związanych z zrównoważonym rozwojem rolnictwa ekologicznego (Hartmann i in. 2015).

Wykazano, że sposób zarządzania glebą jest istotnym czynnikiem wpływającym na fizykochemiczne i biologiczne właściwości gleby. Jest też istotny dla żyzności gleby i plonów osiąganych w gospodarstwach rolnych. System rolnictwa, będący systematycznie wykonywanym określonym sposobem uprawy roli, ma znaczący wpływ na glebę. Ekologiczny i konwencjonalny system rolnictwa kładzie odmienny nacisk na niektóre aspekty produkcji roślin, ochronę środowiska i zachowanie bioróżnorodności organizmów zamieszkujących glebę. Nieodłącznym elementem agrobiosystemów są mikroorganizmy bytujące w glebie, które pełnią w niej szereg ważnych funkcji. Ich ilość i skład jest istotny dla produktywności uprawianych gleb (Gomiero i in. 2011). Wiadome jest, że sposób zarządzania glebą wywiera wpływ na mikrobiom glebowy. W związku z tym prowadzone są liczne badania mające na celu określenie różnic w oddziaływaniu konwencjonalnego i ekologicznego systemu upraw na złożoność drobnoustrojów zamieszkujących tę niszę.

### **2. Opis zagadnienia**

Agroekosystemy są naturalnymi ekosystemami, które zostały zmodyfikowane do produkcji żywności i błonnika. Chociaż zachowują wiele z cech naturalnych ekosystemów, charakteryzują się

jednak częstą obecnością agrochemikaliów i powiązanych z tym zmianami w bioróżnorodności. Charakter i zakres zanieczyszczeń agrochemicznych będzie się znacznie różnić w zależności od sposobu zarządzania gruntem. Rolnictwo konwencjonalne i ekologiczne kładzie odmienny nacisk na ochronę środowiska, w związku z tym występują między nimi pewne różnice (Tab. 1). Rolnictwo konwencjonalne wykorzystuje sztucznie stworzone środki produkcji, podczas gdy ekologiczne wykorzystuje naturalne środki produkcji, aby stworzyć ten sam końcowy produkt żywnościowy. Rolnictwo ekologiczne odnosi się do systemu gospodarki rolnej, który zakazuje stosowania agrochemikaliów, takich jak nawozy sztuczne i pestycydy oraz wykorzystania organizmów zmodyfikowanych genetycznie, jak również wielu syntetycznych związków stosowanych jako dodatki do żywności. System produkcji ekologicznej jest zaprojektowany w celu:

- zwiększenia różnorodności biologicznej,
- zwiększenia aktywności biologicznej gleby,
- utrzymania długotrwałej żyzności gleby,
- recyklingu odpadów roślinnych i zwierzęcych w celu zwrócenia składników odżywczych do gleby, minimalizując w ten sposób wykorzystanie nieodnawialnych zasobów,
- promowania zdrowego wykorzystania gleby, wody i powietrza, jak również w celu zminimalizowania wszelkich form zanieczyszczeń, które mogą wynikać z praktyk rolniczych,
- obchodzenia się z produktami rolnymi z dbałością o metody przetwarzania w celu utrzymania ekologicznej integralności i jakości produktu na wszystkich etapach produkcji.

**Tab. 1.** Porównanie wybranych aspektów rolnictwa konwencjonalnego i ekologicznego.

<b>Rolnictwo konwencjonalne</b>	<b>Rolnictwo ekologiczne</b>
Stosowanie mineralnych nawozów do promowania wzrostu roślin	Stosowanie naturalnych nawozów, takich jak kompost czy obornik do zasilania gleby i roślin
Rozpylanie insektycydów w celu redukcji szkodników i chorób	Wykorzystanie pożytecznych owadów i ptaków lub pułapek w celu ograniczenia szkodników i chorób
Używanie chemicznych herbicydów, aby usuwać chwasty	Plodozmian, ręczne usuwanie chwastów lub ściółkowanie w celu radzenia sobie z chwastami
Maksymalizacja plonów	Plon optymalny
Eksploatacja aż do degradacji	Programowa ochrona
Produkcja średniej jakości biologicznej	Produkcja wysokiej jakości biologicznej
Skażenie środowiska	Ochrona gleby i wody

Jednym z fundamentów gospodarki rolnej jest właściwe gospodarowanie glebą. Gleba zapewnia podstawowe funkcje ekosystemu, w tym obieg składników odżywczych, regulację wody, przetwarzanie materiałów organicznych i związków toksycznych, a także zwalczanie szkodników i chorób (Doran i Zeiss 2000). Na poziomie systemowym, integralną rolę w praktycznie wszystkich procesach glebowych odgrywa mikrobiom. Z tego powodu obfitość, aktywność i skład mikroorganizmów w dużym stopniu determinuje zrównoważoną produktywność gruntów rolnych. Zatem zdolność zarządzania mikrobiomem glebowym, aby wpływać na obecność korzystnych i nieszkodliwych organizmów, może stanowić obiecujące podejście do poprawy zrównoważonej produkcji rolnej. Badania pokazują, że w przypadku gleb rolniczych liczba operacyjnych jednostek taksonomicznych (OTU) mikroorganizmów może być nawet o 30% niższa niż w glebach nieuprawianych (Wolińska i in. 2017). Skutki gospodarki rolnej dla mikrobiomu glebowego są jednak

złożone i zróżnicowane, a wyciągnięcie powszechnie obowiązujących, uniwersalnych wniosków dotyczących wpływu systemów rolnictwa ekologicznego i konwencjonalnego na mikroorganizmy jest trudne. Ogólnie rzecz biorąc, wykazano, że systemy uprawy niskonakładowej promują większą liczebność i różnorodność większości organizmów, w tym mikroorganizmów. Jednak ogromna złożoność występujących drobnoustrojów oraz ograniczenia techniczne związane z właściwym pomiarem ich składu do tej pory ograniczyły zrozumienie związków między rolnictwem niskonakładowym a różnorodnością mikrobiologiczną. Nowe, wysokowydajne technologie sekwencjonowania DNA oferują sposoby badania drobnoustrojów glebowych z większą rozdzielczością, zasięgiem i wydajnością, a także mogą rzucić więcej światła na reakcje społeczności i taksonów na gospodarkę rolną (Hartmann i in. 2015).

### 3. Przegląd literatury

Żywność i wartość produkcyjna gleby są ściśle związane zarówno z jej właściwościami fizykochemicznymi jak i z jej aktywnością biologiczną. Aktywność ta jest związana z intensywnością przebiegu katalizowanych przez drobnoustroje procesów przemian substancji organicznych i mineralnych zawartych w glebie. Przebieg tych procesów jest ściśle skorelowany z ilością oraz bioróżnorodnością mikroorganizmów glebowych, zwłaszcza bakterii oraz aktywnością enzymów produkowanych przez drobnoustroje (Rys. 1).



Rys. 1. Powiązanie mikroorganizmów glebowych z wartością produkcyjną gleby.

Mikroorganizmy są istotne dla funkcjonowania gleby oraz zdrowia i wzrostu roślin. Wynika to z licznych funkcji, które mikroorganizmy, zwłaszcza bakterie, pełnią w środowisku glebowym (Rys. 2). Mikroorganizmy glebowe odgrywają ważną rolę w utrzymaniu wydajności gleby poprzez procesy biochemiczne, takie jak rozkład substancji i recykling składników odżywczych. Glebowa społeczność mikroorganizmów jest ważnym czynnikiem wpływającym na zdrowie roślin, gdyż warunkuje ich odporność na choroby. Również wpływa na poprawę struktury gleby. Bakterie zasługują na szczególną uwagę, ponieważ są najbardziej rozpowszechnione w glebie. Każda gleba charakteryzuje się swoim swoistym profilem żyjących w niej bakterii. Wpływ na to mają same właściwości gleby jak również sposób zarządzania nią. Bakterie mogą być pożyteczne lub zdolne do zakażenia rośliny, w zależności od gatunku, rośliny żywicielskiej i warunków środowiska. Większość bakterii środowiska glebowego uważana jest jednak za mikroorganizmy pożyteczne, kluczowe dla zachowania zdrowia gleby i roślin.

Na obecność bakterii w glebie mają wpływ m.in. mają praktyki agronomiczne, takie jak: uprawa roli, nawadnianie oraz nawożenie. W agroekosystemach podczas uprawy roli narzędzia i maszyny rolnicze ingerują w glebę. W ten sposób oddziałują na jej elementy i właściwości. Znaczącej presji podlegają agregaty glebowe, co zmienia strukturę i gęstość objętościową gleby oraz jej właściwości wodne i powietrzne. Ponadto, wpływ na te ekosystemy mają często stosowane w rolnictwie agrochemikalia. Skutkiem tego na gruntach uprawnych dochodzi do zmian fizycznych, chemicznych i biologicznych właściwości gleby, w tym zmian w różnorodności i ilości mikroorganizmów glebowych (Gomiero i in. 2011). Bakterie są uznawane za wskaźniki wczesnego ostrzegania o jakości gleby ze względu na ich szybką reakcję i wrażliwość na zmiany środowiskowe. Odmiennego wpływu na mikroorganizmy glebowe można się zatem spodziewać w glebach zarządzanych w sposób konwencjonalny i ekologiczny. Pomimo integralnej roli mikrobiomu glebowego w produkcji rolnej, wciąż ograniczone jest nasze zrozumienie złożonych zmian różnorodności mikrobiologicznej wynikających z odmiennych systemów zarządzania gruntem.



**Rys. 2.** Rola mikrobiomu glebowego.

Przeprowadzono liczne badania, których celem było określenie jak różne systemy uprawy wpływają na skład glebowych zbiorowisk bakterii. Wiele z nich opartych było na określeniu biomasy i aktywności drobnoustrojów. Jednak aby uzyskać lepszy wgląd w to, jak ekologiczne i konwencjonalne systemy uprawy wpływają na zbiorowiska bakterii glebowych, obecnie prowadzi się badania oparte na sekwencjonowaniu regionów bakteryjnego genu 16S rRNA. Takie podejście pozwoliło na wykrycie specyficznych zmian strukturalnych na poziomie poszczególnych taksonów drobnoustrojów. Poza profilowaniem genetycznym do badania zmian w strukturze zbiorowisk mikroorganizmów stosuje się także analizy kwasów tłuszczowych. Wyniki badań wykazały, że istnieje znacząca różnica w składzie bakteryjnym pomiędzy systemami zarządzania organicznego i konwencjonalnego (Esperschuetz i in. 2007; Lupatini i in. 2017).

W początkowych badaniach nad wpływem systemu upraw na społeczności mikroorganizmów stwierdzono, że systemy ekologiczne wpływają na wzrost biomasy i aktywności drobnoustrojów, co jest w dużej mierze związane z ilością i jakością stosowanego obornika (Birkhofer i in. 2008). Następnie dzięki analizom genetycznym wykazano, że długoterminowa uprawa ekologiczna zwiększa także różnorodność, zmniejsza dyspersję i zmienia strukturę mikroflory

glebowej w porównaniu z tradycyjną uprawą w warunkach nawożenia wyłącznie mineralnego. Efekt ten w dużej mierze wynika z zastosowania i jakości nawozów organicznych, gdyż różnice te są mniejsze w przypadku gleb uprawianych konwencjonalnie w systemie nawożenia zintegrowanego. Dlatego warto mieć na względzie, że szerokie spektrum praktyk rolniczych ogranicza porównywalność pomiędzy różnymi badaniami przeprowadzonymi w celu określenia różnic w składzie bakteryjnym między konwencjonalnym i ekologicznym systemem upraw (Gomiero i in. 2011). Podczas gdy systemy organiczne są powszechnie definiowane przez praktyki zarządzania, w których nie stosuje się nawozów sztucznych i pestycydów, definicja zarządzania konwencjonalnego jest bardziej zmienna. Schematy nawożenia i ochrony roślin, jak również strategię płodozmianu i uprawy roli często różnią się w poszczególnych konwencjonalnych systemach rolniczych. Zazwyczaj konwencjonalne praktyki zarządzania opierają się na stosowaniu nawozów syntetycznych oraz pestycydów i często unikają stosowania nawozów organicznych. Jednakże odgdy wykazano, że wprowadzanie nawozów organicznych ma pozytywny wpływ na różne właściwości gleby, bardziej zintegrowane strategię nawożenia konwencjonalnego dążą do stosowania kombinacji nawozów syntetycznych i organicznych (Rosen i Allan 2007). W przypadku takiego systemu nawożenia możemy również spodziewać się odmiennej reakcji mikroorganizmów niż w glebach gospodarstw konwencjonalnych, gdzie stosowane są jedynie nawozy mineralne.

Niektórzy autorzy sugerują, że pozytywny wpływ wywierany przez rolnictwo ekologiczne na bogactwo gatunkowe można zaobserwować przede wszystkim w przypadku intensywnie użytkowanych gruntów rolnych (Bengtsson i in. 2005). W innych badaniach z kolei wykazano, że zmiany w zróżnicowaniu mikrobiologicznym między rolnictwem organicznym i konwencjonalnym są jeszcze większe w przypadku bardziej intensywnego stosowania pestycydów i zabiegów agrotechnicznych. Jednak analizując liczne badania ostatecznie stwierdzono, że wpływ systemu zintegrowanej ochrony roślin przed szkodnikami (charakteryzującego się umiarkowanym i celowym stosowaniem pestycydów) ma tu podrzędne znaczenie (Hartmann i in. 2015). Wykluczając inne podstawowe czynniki często wspólne dla gospodarki rolnej, takie jak zróżnicowana uprawa roli lub systemy monokultury, badania wykazały, że schemat nawożenia, w szczególności stosowanie i jakość nawozów organicznych, jest głównym wyznacznikiem różnorodności mikrobiologicznej. Nadmierne stosowanie nawozów mineralnych pogłębia spadek zawartości materii organicznej i żyzności gleby oraz przyspiesza jej zakwaszenie. Nawożenie wpływa na zróżnicowanie mikroorganizmów glebowych poprzez bezpośrednie oddziaływanie na zawartość składników pokarmowych w glebie. Powtarzające się nadmierne stosowanie nawozów chemicznych może mieć negatywny wpływ na jakość gleby. Długoterminowe stosowanie nawozów azotowych lub nawozów azotowych w połączeniu z innymi nawozami mineralnymi wpływa na cykl azotowy i związane z nim bakterie. Nawozy organiczne mają jednak większy wpływ na mikroorganizmy glebowe w porównaniu z nawozami chemicznymi. Stwierdzono, że stosowanie nawozów organicznych zmniejsza występowanie chorób glebowych oraz przebudowuje strukturę i funkcje społeczności bakterii glebowych. Nawozy organiczne, takie jak obornik, pozostałości roślinne i kompostowana materia organiczna mogą zmienić strukturę i aktywność zbiorowości bakterii w glebie oraz wpłynąć na ilość bakterii związanych z obiegiem azotu. Pola objęte zarządzaniem ekologicznym wykazują znacząco lepsze warunki odżywcze gleby, co także pozwala na lepszy rozwój mikroorganizmów. Z tej przyczyny zaobserwowano wzrost biomasy i aktywności drobnoustrojów w gospodarstwach ekologicznych (Lori i in. 2017). Natomiast aktywność ta jest obniżana przez stosowanie azotu w formie syntetycznej, jak to ma miejsce w gospodarstwach konwencjonalnych. Liczebność populacji grzybów i termofili jest istotnie wyższa w glebach pochodzących z gospodarstw organicznych w porównaniu z konwencjonalnymi. A długość korzeni skolonizowanych przez grzyby mykoryzowe w rolnictwie ekologicznym jest o 40% wyższa niż w systemach konwencjonalnych (Gomiero i in. 2011).

W glebach gospodarstw ekologicznych zaobserwowano wyższą niż w gospodarstwach konwencjonalnych aktywność niektórych enzymów, takich jak dehydrogenaza, proteaza, alkaliczna fosfataza i ureaza. Enzymy te są zaangażowane m.in. w obieg substancji odżywczych. Aktywność enzymów glebowych w systemie ekologicznym jest dodatkowo skorelowana z pH gleby, wysoką zawartością organicznego węgla i całkowitego azotu oraz korzystnym niskim stosunkiem C/N



(Kwiatkowski i in. 2020). Do korzystnych właściwości chemicznych gleb zarządzanych w sposób ekologiczny można zaliczyć również większą ilość azotanów i dostępną dla roślin ilość fosforu, a także większą zdolność wymiany kationowej (Ge i in. 2011). Są one bezpośrednio powiązane z działalnością mikroorganizmów glebowych.

Badania przeprowadzone przez Caporali i wsp. (2003) wykazały, że rolnictwo ekologiczne przyczynia się do zachowania różnorodności biologicznej gleby. Różnorodność gatunkowa mikroorganizmów jest istotna w kontekście funkcji pełnionych przez poszczególne gatunki. Liczne procesy zachodzące w środowisku glebowym nie są wynikiem działania jednego gatunku mikroorganizmów, ale ich zbiorowisk jako całości (m.in. produkowane przez nie enzymy współdziałały w celu zwiększenia dostępności składników odżywczych w glebie). Ważne jest zatem, aby w takiej społeczności mikroorganizmów znajdowały się bakterie pełniące różne funkcje.

Porównując skład taksonomiczny mikroorganizmów glebowych pochodzących z upraw ekologicznych i konwencjonalnych, naukowcy wykazali, że większa różnorodność bakterii występuje w glebach uprawianych w systemie ekologicznym albo też różnorodność ta utrzymuje się na podobnym poziomie w obu systemach upraw (Lupatini i in. 2017; Bonanomi i in. 2016). Wiadomo także, że długofalowa gospodarka rolna wpływa na specyficzne dla systemu wzorce społeczności mikroorganizmów (obecność poszczególnych grup taksonomicznych). Takie podejście pozwoliło na wykrycie specyficznych zmian strukturalnych na poziomie poszczególnych taksonów drobnoustrojów, wywołanych odmiennym sposobem gospodarowania glebą. W jednym z badań wykazano, że ekologiczna uprawa wiązała się z większą względną liczebnością bakterii *Proteobacteria*, podczas gdy *Actinobacteria* i *Chloroflexi* było więcej w konwencjonalnych systemach rolniczych. Dominujące rodzaje, w tym *Blastococcus*, *Microclunatus*, *Pseudonocardia*, *Solirubrobacter*, *Brevundimonas*, *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas* wykazywały znaczne zróżnicowanie pomiędzy organicznym i konwencjonalnym systemem rolniczym. Względna liczebność zbiorowisk bakteryjnych na poziomie typu i klasy była skorelowana z pH gleby (silnie powiązany z rodzajem nawożenia), a nie z innymi właściwościami edaficznymi (Li i in. 2012).

Choć badania filogenetyczne wskazały na obecność charakterystycznych grup drobnoustrojów, to jednak informacje funkcjonalne dostarczane przez tego typu badania są ograniczone i niestety wykluczają wyciąganie bardziej konkretnych wniosków. Mimo tego, zdolność do obserwowania specyficznych zmian strukturalnych na poziomie poszczególnych taksonów drobnoustrojów oferuje obecnie nowe spojrzenie na potencjał zarządzania mikrobiomem glebowym dla zrównoważonej wydajności rolnictwa i ochrony roślin. Zatem zasadne jest prowadzenie dalszych badań w tym zakresie, aby dokładniej poznać te zależności.

#### **4. Podsumowanie**

Wykazano, że w zależności od sposobu zarządzania glebą może się zmieniać ilość mikroorganizmów glebowych i struktura tej mikroflory. Badania filogenetyczne wykazały, że gleby rolne użytkowane długoterminowo w rolnictwie ekologicznym i konwencjonalnym są siedliskiem odrębnych mikrobiomów. Ogólnie wyniki badań wskazują na to, że większa ilość i różnorodność mikroorganizmów występuje w glebach gospodarstw ekologicznych. Reakcja społeczności mikroorganizmów na zarządzanie gospodarką rolną jest jednak bardzo złożona. Należy zatem mieć na uwadze, że chociaż badania potwierdzają pozytywny wpływ rolnictwa ekologicznego na różnorodność biologiczną, to zauważa się również, że takie korzyści mogą zostać osiągnięte także przez rolnictwo konwencjonalne, gdy jest starannie zarządzane.

#### **5. Literatura**

- Bengtsson J, Ahnstrom J, Weibull AC (2005) The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: A meta-analysis. *J Appl Ecol* 42:261–269.
- Birkhofer K, Bezemer TM, Bloem J i in. (2008) Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: implications for soil quality, biological control and productivity. *Soil Biol Biochem* 40: 2297–2308.

- Bonanomi G, De Filippis F, Cesarano G i in. (2016) Organic farming induces changed in soil microbiota affect agroecosystem functions. *Soil Biol Biochem* 103: 327–336.
- Caporali F, Mancinelli R, Campiglia E (2003) Indicators of cropping system diversity in organic and conventional farms in central Italy. *Int J Agric Sustain* 1: 67–72.
- Doran JW, Zeiss MR (2000) Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Appl Soil Ecol* 15: 3–11.
- Esperschuetz J, Gattinger A, Mader P i in. (2007) Response of soil microbial biomass and community structures to conventional and organic farming systems under identical crop rotations. *FEMS Microbiol Ecol* 61: 26–37.
- Ge T, Nie S, Wu J i in. (2011) Chemical properties, microbial biomass, and activity differ between soils of organic and conventional horticultural systems under greenhouse and open field management: a case study. *J Soils Sediments* 11: 25–36.
- Gomiero T, Pimentel D, Paoletti MG (2011) Environmental impact of different agricultural management practices: conventional vs. organic agriculture. *Crit Rev Plant Sci* 30: 95–124.
- Hartmann M, Frey B, Mayer J i in. (2015) Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *ISME J* 9: 1177–1194.
- Kwiatkowski CA, Harasim E, Feledyn-Szewczyk B i in. (2020) Enzymatic activity of loess soil in organic and conventional farming systems. *Agriculture* 10:135.
- Li R, Khafipour E, Krause DO i in. (2012) Pyrosequencing reveals the influence of organic and conventional farming systems on bacterial communities. *PLoS ONE* 7: e51897.
- Lori M, Symnaczyk S, Mader P i in. (2017) Organic farming enhances soil microbial abundance and activity—a meta-analysis and meta-regression. *PLOS ONE*, 12: e0180442.
- Lupatini M, Korthals GW, de Hollander M i in. (2017) Soil microbiome is more heterogeneous in organic than in conventional farming system *Front Microbiol* 7: 2064.
- Rosen CJ, Allan DL (2007) Exploring the benefits of organic nutrient sources for crop production and soil quality. *Horttechnology* 17: 422–430.
- Wolińska A, Górniak D, Zielenkiewicz U i in. (2017) Microbial biodiversity in arable soils is affected by agricultural practices. *Int Agrophys* 31: 259–271.
- Badania dofinansowano ze środków Wojewódzkiego Funduszu Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej w Lublinie w ramach projektu „Porównanie flory bakteryjnej gleb uprawnych w gospodarstwach konwencjonalnych oraz ekologicznych zlokalizowanych na terenie województwa lubelskiego”.

## **8. Functional hydrogels in agriculture and gardening**

Paula Stachowska, Karolina Labus

Department of Micro, Nano and Bioprocess Engineering, Faculty of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology

Paula Stachowska: paulakusztelak@wp.pl

Karolina Labus: karolina.labus@pwr.edu.pl

Keywords: cross-linked polymers, biodegradable materials, interdisciplinary applications

### **Abstract**

Hydrogels are multifunctional materials which owe a number of their applications to unique properties such as: ability to retain large amounts of water, mechanical strength or porosity allowing the diffusion of substances into and out of a three-dimensional polymer network. These and other features make the hydrogel matrices used in many fields - from pharmacy, medicine, health care, cosmetics, biotechnology to the food industry as well as agriculture and gardening. Due to the constantly growing demand for food and the need to optimize water consumption, there is huge interest in using these superabsorbent materials in the cultivation of plants. Hydrogel systems are successfully applied for the release of bioactive substances for example in modern soilless cultivations. These materials enable on the improvement of soil properties, the reclamation of degraded areas, and the introduction of cultivation fields in desert areas. They are also used for encapsulation of seeds, scaffolding of tissue cultures and for irrigation of cut flowers. Unfortunately, synthetic or semi-synthetic hydrogels are often applied, which requires their disposal or recycling after use. Therefore, it is important to strive for the use of biodegradable polymer matrices that are environmentally friendly and fully biocompatible.

### **1. Introduction**

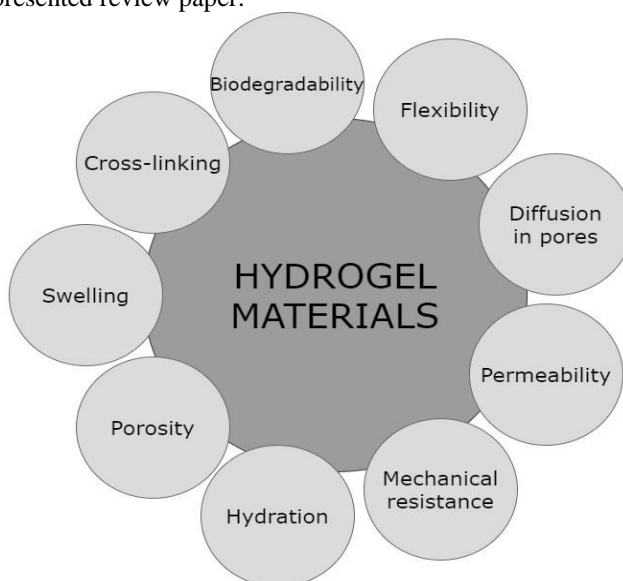
Hydrogel materials are characterized by important functional properties as shown in Fig. 1. These features have an impact on their versatile application. These cross-linked polymer matrices are able to swell as a result of absorbing large amounts of water - even up to 1000 g per 1 g of dry matter (Tyliszczak and Pielichowski 2007). The three-dimensional porous structure is formed as the consequence of cross-linking the polymeric chains and enable on diffusion of various types of substances inside and outside the network. Depending on the structure and the content of polymers included in a given hydrogel, it is possible to adjust its mechanical properties and elasticity to targeted function. A characteristic feature of a particular matrix is also the packing density of the polymer network affecting the size of pores in the hydrogel structure. This parameter determines the permeability of liquids and gases through this material (Hoffman 2002).

Due to the very wide variety of hydrogel matrices, their division can be made on the basis of several categories - possibility of degradation, way of cross-linking, properties, methods of obtaining, reaction to environmental stimuli or the resultant charge. However, the most obvious and most frequently used classification is the origin of polymeric building blocks (Ullah et al. 2015). The hydrogel network can be composed of natural, synthetic or semisynthetic polymers. A schematic division of hydrogel materials is shown in Figure 2.

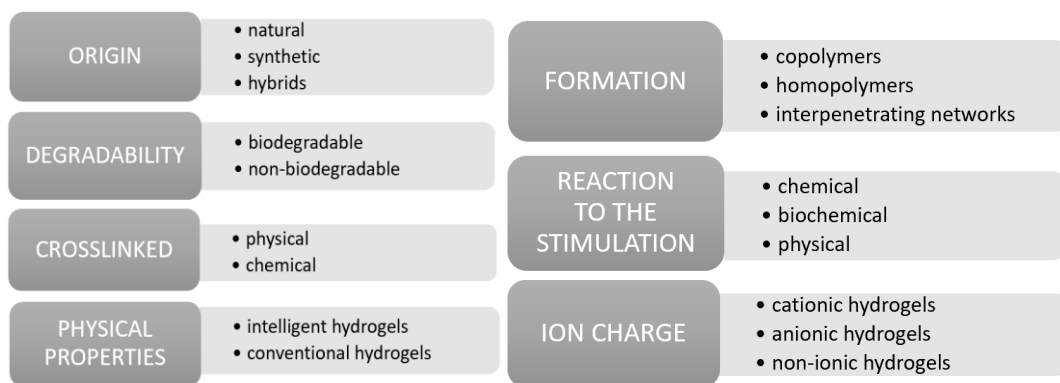
Table 1 shows the basic polymers used to produce hydrogel materials - natural and synthetic origin and their combinations. Increasingly, special attention is paid to the biodegradability and biocompatibility of the matrices used, which is extremely valuable for biomedical or agricultural applications. However, the addition of synthetic compounds significantly improves the mechanical properties of the hydrogel, ensuring its long life and durability even in very difficult conditions - high temperature or very acidic environment (Chai et al. 2017).

Hydrogels are a group of functional polymeric materials with specific properties enabling their wide application in the life-science sector. The first commercial use of these materials dates back to the 1960s when they were used in the production of flexible contact lenses (Wichterle et al. 1960).

Since then the interest in hydrogel matrices has been constantly growing and nowadays they are used in many fields - pharmacy, medicine (controlled release systems, dressings), biomedical engineering (implants, tissue substitutes), biotechnology, cosmetic industry, food industry (functional additives). One of the large areas of application of these materials are also agriculture and gardening, that are the main subject of the presented review paper.



**Fig. 1.** Selected characteristics of hydrogel materials.



**Fig. 2.** Schematic division of hydrogel matrices according to the criterion under consideration (Ullah et al. 2015).

## 2. Description of the issue

Nowadays, a great importance is attached to the use of environmentally friendly technologies. One of the observed trends is the replacement of conventional polymeric materials with hydrogel matrices. The ease of production, beneficial bio-functional properties, as well as biodegradability in the natural environment make their utilization highly justified from both the economic and the ecological point of view.

Agriculture and gardening are sectors of great importance for providing adequate quantities of food for humans and animals. Extensive investigations are constantly being conducted in order to optimize crops while maintaining sustainable development requirements. The ever-increasing population and the need for rational use of the Earth's water resources have contributed to an increase

in research on the use of Super Absorbent Polymers (SAP) for irrigation of agricultural fields. In this case, the application of hydrogels with a high sorbent capacity has enabled on significant reduction in water consumption for these purposes. In addition, various nutrients and other bioactive compounds - fertilizers, pesticides, fungicides etc. - can be immobilized/trapped in the cross-linked structure of hydrogels. Long-term controlled release of these components reduces the amount of their penetration into the soil and thus reduces the burden on the environment and minimizes the risk to living organisms. Moreover hydrogel materials are able to adsorb hazardous soil contaminants, especially heavy metals. These polymeric matrices have also been implemented for other tasks, such as irrigation of cut flowers, encapsulation of seeds or cultivation of plant tissue cultures. The most common ways of using these materials in agricultural and gardening crops are presented graphically in Fig. 3.

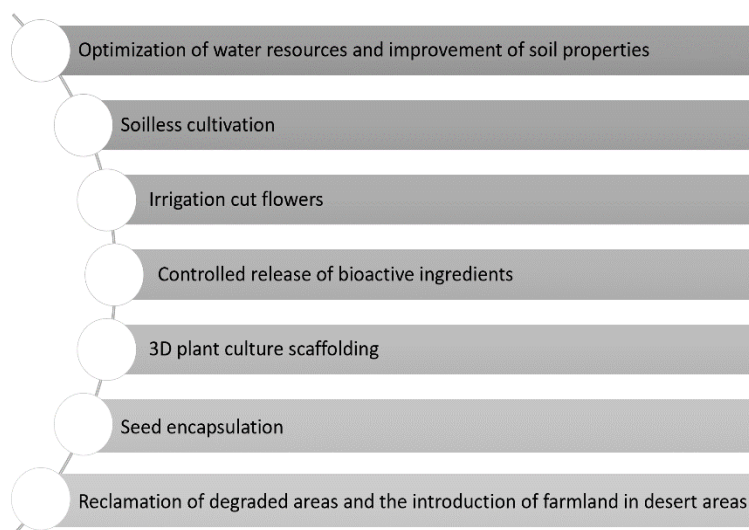
**Tab. 1.** Tabular overview of polymers used in the production of hydrogel materials.

NATURAL	SYNTETIC	SEMI-SYNTETIC
<u>Anionic polymers:</u>	Polyhydroxybutyrate (PHB)	P(PEG-co-peptide)
Alginic acid	Butylene polyoxide (PBO)	P(PLGA-co-serine)
Pectin	Poly(butylene terephthalate)	P(HPMA-g-peptide)
Hyaluronic acid	(PBT)	Alginate-acrylate
Carragen	Poly(vinyl alcohol) (PVA)	Collagen-acrylic
Dextran sulphate	Polyphosphazene	
Chondroitin sulphate	N-vinylpyrrolidone	
<u>Cationic polymers:</u>	Polycaprolactone (PCL)	
Chitosan	Polyhydroxybutyrate (PHB)	
Polylysine	Propylene fumarate (PF)	
<u>Amphiphilic polymers:</u>	PEG-PLA-PEG	
Collagen	PEG-PLGA-PEG	
Gelatine	PEG-PCL-PEG	
Fibrin	PLA-PEG-PLA	
Starch		
<u>Uncharged polymers:</u>		
Dextran		
Agarose		
Pollulan		

The designations used in the table: PEG - polyethylene glycol, PLA - polymeric acid, PLGA – copolymer of DL-polymeric acid and glycolic acid, PCL - polycaprolactone, HPMA – hydroxypropylmethacrylate

An important issue in the relation to the use of hydrogel materials in agriculture and gardening is their biocompatibility and biodegradability. In this case the most important is the lack of negative impact on the environment into which these matrices are introduced. A highly undesirable effect is the accumulation of used polymers in the soil, which would be a dangerous waste requiring disposal. Therefore, the natural, fully biocompatible materials such as cellulose, gelatine, chitosan, starch and other and biodegradable synthetic matrices: polyvinyl alcohol (PVA) or polycaprolactone (PCL) are more often used. Hydrogel matrices can be designed in such a way that after use, they can be easily decomposed under enzymatic or hydrolytic means, as a result of changes in pH or ambient temperature, or under the influence of an electric field (Rudzinski et al. 2002). In addition, the use of natural polymers has other obvious advantages, like easy availability of these materials and lower production cost.

The main fields of application of superabsorbent hydrogel materials in agriculture and gardening are described in more detail below.



**Fig. 3.** Main sections of functional applications of hydrogel materials in agriculture and gardening.

### 2.1 Optimization of water resources

The primary application of hydrogel materials in agriculture is the irrigation of the fields. The polymer matrices used for this purpose absorb significant amounts of water coming from rainfall or watering. Moreover, the diffusion mechanism determines its slow release from the polymer network, which ensures long-term soil moisture and prevents its rapid evaporation, thus minimizing the consumption of water resources.

In this case, the most commercially sold materials are synthetic acrylic gels, which should be applied with caution, because after using they remain in the soil as waste requiring disposal. Therefore, biodegradable materials that do not pose a threat to the environment are increasingly being used. An alternative can be the matrices of natural origin based on cellulose – easily accessible and cheap biomaterial characterized by biocompatibility and biodegradability (Sannino et al. 2009).

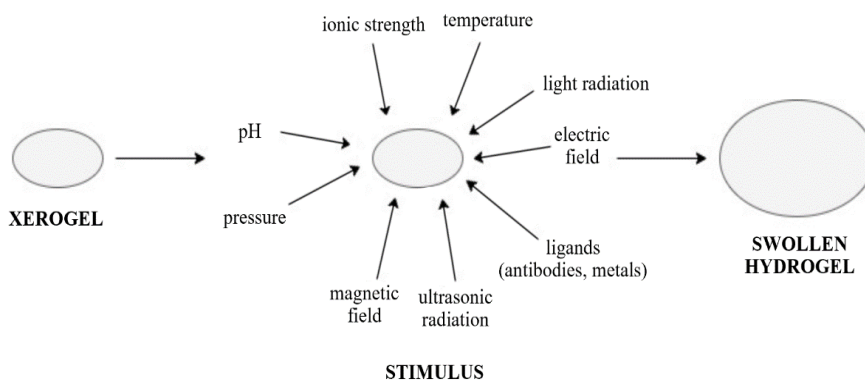
### 2.2 Controlled release of the bioactive substances

Hydrogel release systems allow for the enrichment of arable soils through a long-term and controlled supplementation of various components - mineral salts, plant protection products, fertilizers, pesticides and many others. Such systems consist of an active substance entrapped in a polymeric hydrogel network in the form of microcapsules or granules. The most important advantage of these types of systems is the slow release of the bioactive component from the hydrogel core, stabilization of the substance used, reduction of its evaporation and leaching, and protection against environmental degradation. As a consequence, it has a significant impact on the reduction of the required amount of dosage in the form of conventional spraying, which in turn minimizes the pollution of the environment with biocides toxic to plants and animals (Rudzinski et al. 2002).

The latest generation of hydrogels can be designed in an extremely precise way – in the response to selected environmental conditions (e.g. pH, temperature, pressure, radiation, presence of appropriate ligands) they can release substances contained in their network as shown in Fig. 4 (Ullah et al. 2015).

### 2.3 Improving soil properties

Hydrogels used in plant cultivation, in addition to fulfilling basic roles (such as long-term irrigation and nutrient supplementation) can also support soil permeability and improve soil structure. The absorption of water by the xerogel (hydrogel in a dry form) increases its volume and thus improves the porosity of the soil ensuring optimal oxygenation of the roots. This approach supports a significant increase in the productivity of cultivated areas (Sannino et al. 2009).



**Fig. 4.** Intelligent stimulus-responsive hydrogels (Gupta et al. 2002).

#### 2.4 Seed encapsulation

The idea of synthetic seeds is to place the meristematic tissues of plants in the protective material (which may be hydrogel). Additionally, such a system may contain nutrients, growth regulators or antimicrobial agents that facilitate the survival of encapsulated seeds and their subsequent growth. Long-term storage is made possible by the addition of growth retardants such as abscisic acid (ABA), reduced oxygen concentration, intensity of light radiation or temperature reduction. Alginate or cellulose derivatives, carrageenan and pectin (fully biodegradable and biocompatible polymers) are the most commonly used for seeds encapsulation coatings. These hydrogels are designed to provide mechanical protection and ensure genetic stability of the stored plant material (Rai et al. 2009).

#### 2.5 Soilless cultivation

A method of soilless cultivation called hydroponics is based on providing plants with all the ingredients they need for growth - inorganic ions, water, CO<sub>2</sub> and solar energy. The growing medium is usually a highly porous perlite with super-absorbent hydrogel as a reservoir of water and the nutrients dissolved in it. The advantage of this type of cultivation is space-saving (the cultivation can be done in tiers), easy control and dosing of substances, homogeneity of obtained plants, and the possibility of cultivation even in the city centre. Exemplary, such systems are already used for the production of lettuce or tomatoes (Nguyen et al. 2016).

#### 2.6 3D scaffolding of plant tissue cultures

At the beginning, two-dimensional growth was used in the laboratories of plant tissue cultures. This type of culture is easy to observe but has many imperfections. Native tissues, both plant and animal, form three-dimensional structures nourished by a network of vessels. Based on this natural phenomenon, the studies on 3D culture cultivation were begun. Scaffolds for this type of growth can be made of protein and peptide gels, based on collagen, fibrin, or hyaluronic acid and other natural compounds - chitosan, alginate and silk fibres. For this purpose the polymer network should be highly hydrated which facilitates the transport of oxygen and other nutrients. The use of scaffolds based on natural substances also supports cell viability and proliferation (Kitel et al. 2013; Tibbitt and Anseth 2009).

#### 2.7 Irrigation materials for cut flowers

Safe transport and long-term storage of cut flowers can be provided by hydrogel irrigation systems. The use of absorbent polymeric materials enables the long-lasting supplementation of water with the necessary nutrients, as well as the plant hormone suppressors (such as ethylene) and other additives extending the durability of plants. The polyvinyl alcohol (PVA), a biodegradable, non-toxic and biocompatible synthetic polymer is used as the hydrogel matrix for irrigation of cut flowers. Another example is poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA), which is a natural cationic biopolymer based on D- and L-glutamic acid (Kongkloma et al. 2018).

## 2.8 Reclamation of degraded areas

The priority of 20th century agriculture was to maximize agricultural production to satisfy the nutritional needs of the growing population. Excessive use of fertilizers and pesticides resulted in significant weakening of arable soils and their pollution with dangerous compounds and toxic metals. Nowadays it is necessary to clean up degraded areas and groundwater. The use of polymeric materials with adsorption properties enables the effective catching of heavy metal ions. The advantage of this type of matrix is also a large specific surface area, stability and biodegradability. Moreover, it is possible to functionalize hydrogel materials with additional groups (hydroxyl, carboxyl, sulfonic) and introduce chelating groups into their structure. In order to improve specific properties, silver nanoparticles, which have antibacterial properties with a wide spectrum of action, are also incorporated into such gel networks. An example of a material with high chemical and physical stability used for sorption of heavy metals is a composite hydrogel based on tragacanth rubber (GT), a highly branched, hydrophilic polysaccharide and graphene oxide (GO). Both are non-toxic and biodegradable, which is a great advantage. It is very important for the economic reasons, because this matrix can be effectively regenerated and after a few cycles of adsorption-desorption, its adsorption properties only slightly decreased. Therefore it can be effectively reused several times (Sahraei and Ghaemy 2017).

## 2.9 Introduction of farmland in desert areas

In the face of climatic anomalies, including the lack of rainfall affecting prolonged periods of drought, huge attempts have been made to create arable fields in dry and desert areas. For this purpose the Super Absorbent Polymers (SAP) enable long-term soil moistening and effective use of supplied water. They can also have a positive effect on the condition of weak soils, including soil loosening, permeability and infiltration rate. It is particularly important, that they reduce the frequency of irrigation, stop water erosion and runoff, facilitate soil aeration and increase plant productivity (Ekebafe1 et al. 2011).

## 3. Summary

Hydrogels are multi-functional materials with a very wide range of applications - from medicine, food processing to agricultural and gardening, which are described in detail in this paper. Many technologies are already very widespread, such as using hydrogel matrices for the controlled release of active substances into the growth medium or adding such materials to the soil to optimize water consumption. Unfortunately, synthetic or semi-synthetic hydrogels are often applied, which requires their disposal or recycling after use. Therefore, it is the top purpose to use fully biocompatible and non-toxic hydrogels, which can decompose safely in the natural environment. It is a big challenge to combine high mechanical strength of the matrix with the possibility of biodegradation under mild conditions. Due to this fact, the extensive studies are constantly carry out to refine these materials and their production methods in order to meet the commercial and pro-ecological requirements, such as: the lowest possible manufacturing costs with the highest possible environmental safety (Milani et al. 2017).

## 4. References

- Chai Q, Jiao Y, Yu X (2017) Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels* 3(1): 6.
- Ekebafe1 LO, Ogbeifun DE, Okieimen FE (2011) Polymer Applications in Agriculture. *Biokemistri* 23(2): 81-89.
- Gupta P, Vermani K, Garg S (2002) Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today* 7(10): 569-579.
- Hoffman AS (2002) Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 3-12.
- Kitel R, Czarnecka J, Rusin A (2013) Trójwymiarowe hodowle komórek — zastosowania w badaniach podstawowych i inżynierii tkankowej. *Postępy Biochemii* 59(3): 305-314.



- Kongkloma N, Chuensangjuna C, Chistic Y et al. (2018) Improved keeping quality of Dendrobium “Bom” orchids using nutrients entrapped in a biodegradable hydrogel. *Scientia Horticulturae* 234: 184-192.
- Milani P, França D, Balieiro AG et al. (2017) Polymers and its applications in agriculture. *Polímeros* 27(3): 256-266.
- Nguyen NT, McInturf1 SA, Mendoza-Cózat1 DG (2016) Hydroponics: A Versatile System to Study Nutrient Allocation and Plant Responses to Nutrient Availability and Exposure to Toxic Elements. *Journal of Visualized Experiments* 113.
- Rai MK, Asthana P, Singh SK, et al. (2009) The encapsulation technology in fruit plants — A review. *Biotechnology Advances* 27: 671-679.
- Rudzinski WE, Dave AM, Vaishnav UH et al. (2002) Hydrogels as controlled release devices in agriculture. *Designed Monomers and Polymers* 5(1): 39-65.
- Sahraei R, Ghaemy M (2017) Synthesis of modified gum tragacanth/graphene oxide composite hydrogel for heavy metal ions removal and preparation silver nanocomposite for antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 157: 823-833.
- Sannino A, Demitri C, Madaghiele M (2009) Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. *Materials* 2: 353-373.
- Tibbitt MW, Anseth KS (2009) Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *Biotechnology and Bioengineering* 103(4): 655-663.
- Tyliszczak B, Pieliowski K (2007) Charakterystyka matryc hydrożelowych – zastosowania biomedyczne superabsorbentów polimerowych. *Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej, Czasopismo Techniczne 1-Ch/2007: 159-167.*
- Ullah F, Othman MBH, Javed F et al. (2015) Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering C* 57: 414-433.
- Wichterle O, Lim D (1960) Hydrophilic gels in biologic use. *Nature* 185: 117-118.

## **9. Ocena zanieczyszczenia osadów dennych metalami ciężkimi oraz analiza potencjalnego ryzyka ekologicznego stwarzanego przez te pierwiastki na przykładzie zbiornika zaporowego Kozłowa Góra (województwo śląskie, Polska) - studium przypadku**

Pollution and ecological risk assessment of heavy metals in bottom sediments. A case study of dam water reservoir Kozłowa Góra (Silesian Voivodeship, Poland)

Tytła Malwina, Kernert Joanna

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, Zabrze

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

Słowa kluczowe: osady denne, metale ciężkie, zanieczyszczenie, analiza potencjalnego ryzyka ekologicznego

### **Streszczenie**

Badania miały na celu ocenę stopnia zanieczyszczenia osadów dennych zbiornika zaporowego Kozłowa Góra wybranymi metalami ciężkimi (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) oraz analizę potencjalnego ryzyka ekologicznego stwarzanego przez te pierwiastki. Zbiornik Kozłowa Góra znajduje się na terenie Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP), który stanowi jeden z najbardziej przeobrażonych działalnością człowieka regionów w Polsce, jak również w Europie. Próbkę osadów pobierano na 5 stanowiskach pomiarowych, przez okres 5 miesięcy. Według kryterium geochemicznego analizowane osady denne są silnie zanieczyszczone kadm, cynkiem i ołowiem (klasa IV). Powyższe obserwacje potwierdziły również obliczone wartości wskaźnika Geoaccumulation Index ( $I_{geo}$ ), z których wynika, że osady wykazują silne do ekstremalne zanieczyszczenie ww. metalami, tj. 6,5-7,2 (Cd), 4,3-4,7 (Zn) i 3,9-4,4 (Pb). Analiza ryzyka ekologicznego przeprowadzona w oparciu o kryterium ekotoksykologiczne wykazała, że Cd, Pb i Zn mogą oddziaływać toksycznie na organizmy żywe. Ponadto wartości wskaźnika Potential Ecological Risk Factor (ER) wskazują, że spośród analizowanych metali największe ryzyko ekologiczne mogą powodować kadm (ER; 4140-6660) i ołów (ER; 113,5-158,6). Biorąc pod uwagę fakt, iż zbiornik Kozłowa Góra pełni m.in. funkcję zaopatrzenia w wodę stacji uzdatniania oraz częściowo turystyczno-rekreacyjną, jak również stanowi ważne miejsce lęgowe wielu gatunków ptaków, konieczne jest regularne monitorowanie jego stanu chemicznego.

### **1. Wstęp**

Osady denne stanowią integralną część ekosystemów wodnych, jednakże obecne w nich metale ciężkie mogą oddziaływać negatywnie na organizmy bytujące w zbiornikach wodnych, a w przypadku ich rekultywacji czy odmulania, powodować zagrożenie także dla organizmów lądowych. Opisane zagadnienie jest istotne, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, że zanieczyszczenia te nie podlegają biologicznej degradacji (Baran i in. 2016; Tytła i Kostecki 2019). Do źródeł metali w wodach powierzchniowych można zaliczyć ścieki komunalne i przemysłowe, spływy powierzchniowe z pól i dróg oraz depozycję z atmosfery. Finalnie, pierwiastki te kumulowane są w osadach dennych (Banerjee i in. 2017; Tytła i in. 2018; Sojka i in. 2019). Zgodnie z Ustawą o odpadach (Dz.U. 2013 poz. 21) osad wydobyty z dna zbiornika wodnego, traktowany jest jako odpad i w zależności od składu chemicznego klasyfikowany jako materiał nadający się do powtórnego umieszczenia w środowisku bez ograniczeń lub jako materiał zanieczyszczony (odpad niebezpieczny) przeznaczony do składowania na składowiskach odpadów niebezpiecznych. Ze względu na fakt, że ocena jakości chemicznej osadów dennych wskazuje nie tylko na stan czystości zbiorników wodnych, ale stanowi także podstawę do rozwoju strategii systemu zarządzania osadami w środowisku, badanie zawartości metali ciężkich ma znaczenie priorytetowe.

Obiektem badań w niniejszej pracy jest zbiornik zaporowy Kozłowa Góra, zlokalizowany na obszarze Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (województwo śląskie), który należy do jednego

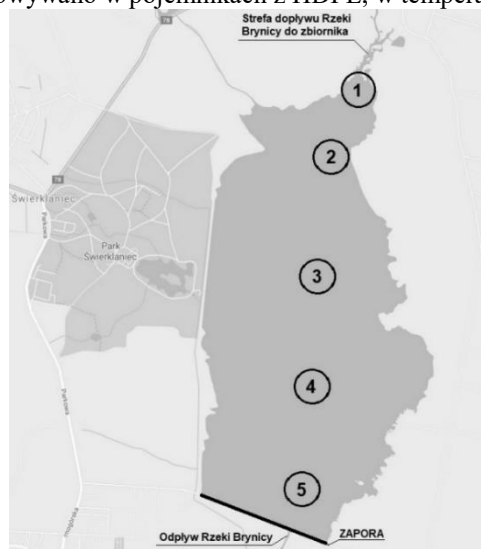
z najbardziej przeobrażonych działalnością człowieka regionów w Polsce, jak również w Europie. Istotny wpływ na degradację środowiska w tym regionie wywarła działalność przemysłu. Na obszarze województwa śląskiego nie występują naturalne zbiorniki wodne, a tylko te powstałe w wyniku działalności człowieka (zbiorniki zaporowe, poeksploatacyjne lub powstałe w wyniku osiadania terenu). Zbiornik Kozłowa Góra znajduje się wśród największych tego typu akwenów (Tytła i Kostecki 2019). Pełni on funkcję zaopatrzenia w wodę stacji uzdatniania wody Górnośląskiego Przedsiębiorstwa Wodociągów, jak również przeciwpowodziową oraz w ograniczonym zakresie jest wykorzystywany na cele turystyczne - rekreacyjnie. Zbiornik ten został zbudowany na nurcie rzeki Brynicy (prawy dopływ Czarnej Przemyśły).

Do oceny stopnia zanieczyszczenia osadów dennych zbiornika Kozłowa Góra wykorzystano kryterium geochemiczne (klasy czystości osadów dennych) (Bojakowska i Sokołowska, 1998) oraz wskaźnik Geoaccumulation Index ( $I_{geo}$ ) (Müller, 1969). Przydatnym narzędziem, w ochronie środowiska naturalnego przed jego wtórnym zanieczyszczeniem metalami ciężkimi wydaje się być również analiza potencjalnego ryzyka ekologicznego. W analizie tej stosowane są różne wskaźniki/kryteria, m.in. kryterium ekotoksykologiczne (Probable Effect Concentration – PEC i Threshold Effect Concentration - TEC) (McDonald i in. 2000) oraz wskaźnik Potential Ecological Risk Factor (ER) (Hakanson 1980). Mogą się one odnosić, m.in. do pojedynczego metalu lub grupy metali, ich toksyczności czy też negatywnego oddziaływania na organizmy żywe. Przydatność różnych typów wskaźników/kryteriów do oceny stopnia zanieczyszczenia osadów dennych metalami ciężkimi oraz analizy potencjalnego ryzyka ekologicznego związanego z obecnością tych pierwiastków potwierdzili również inni naukowcy (Zhao i in. 2012; Saleem i in. 2015; Sojka i in. 2019).

Badania miały na celu: (1) ocenę stopnia zanieczyszczenia osadów dennych wybranymi metalami ciężkimi (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) oraz (2) analizę potencjalnego ryzyka ekologicznego stwarzanego przez te pierwiastki.

## 2. Materiał i Metody

Materiał badawczy stanowiły osady dennie, pobierane na pięciu stanowiskach pomiarowych, rozmieszczonych wzdłuż osi dużej zbiornika Kozłowa Góra, tj. stanowisko 1 (głębokość pobierania próbek - 1 m), 2 (1,5 m), 3 (2,5 m), 4 (3 m) i 5 (3,6 m), przez okres pięciu miesięcy (2018r.). Do pobierania próbek wykorzystano próbnik Birge-Eckmann (grubość warstwy osadu 0-5 cm). Próbkę osadów pobierano kilkakrotnie, a następnie mieszano je celem uśrednienia. W okresie wykonywania analiz osady dennie przechowywano w pojemnikach z HDPE, w temperaturze 4°C.



**Rys. 1.** Schemat rozmieszczenia stanowisk pomiarowych.

### 2.2 Metody

W próbkach osadów dennych wykonano oznaczenie pH (przy użyciu wielofunkcyjnego urządzenia **CX-401** Elmetron; elektroda IJ44A), stężenia suchej masy (wg PN-ISO 11465:1999) oraz analizę zawartości wybranych metali ciężkich (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn). Przygotowanie próbek do analizy składu pierwiastkowego obejmowało suszenie osadów przez okres 7 dni w temperaturze pokojowej oraz mielenie przy użyciu młynka żołądkowego (Fritsch) w celu uzyskania ziarna analitycznego (0,2 mm), a następnie mineralizację w piecu mikrofalowym (Anton Paar). W tym celu przygotowano odważki o masie 0,2 g, do których dodawano 6 cm<sup>3</sup> HCl, 2 cm<sup>3</sup> HNO<sub>3</sub> i 2 cm<sup>3</sup> HF. Zawartość metali w próbkach osadów oznaczano techniką spektrometrii mas z plazmą indukcyjnie sprężoną (ICP-MS) oraz absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS). Wszystkie wzorce przygotowywano w dniu wykonywania analiz. Każdą z analiz wykonywano w trzech powtórzeniach.

Do oceny stopnia zanieczyszczenia osadów dennych oraz analizy potencjalnego ryzyka ekologicznego wykorzystano wskaźniki/kryteria zaprezentowane w Tab. 1.

**Tab. 1.** Wskaźniki/kryteria do oceny stopnia zanieczyszczenia osadów dennych oraz analizy potencjalnego ryzyka ekologicznego.

Wskaźnik/Kryteria	Wzór	Skala	Wyjaśnienie
<b>Kryterium geochemiczne (KG)</b> (Bojakowska i Sokołowska, 1998)	-	I II III IV	W zależności od metalu 1 - 100 mg · kg <sup>-1</sup> (nie zan.) 0,5 - 500 mg · kg <sup>-1</sup> (miernie zan.) 1 - 1000 mg · kg <sup>-1</sup> (zan.) >5 - >1000 mg · kg <sup>-1</sup> (silnie zan.)
<b>Geoaccumulation Index (I<sub>geo</sub>)</b> (Müller 1969)	$I_{geo} = \log_2 \left( \frac{C_n}{1,5B_n} \right)$ C <sub>n</sub> - stężenie metalu w próbce <sup>1</sup> B <sub>n</sub> - geochemiczna wartość tła w skorupie ziemskiej (Kabata - Pendias 2011)	I <sub>geo</sub> ≤ 0 0 < I <sub>geo</sub> ≤ 1 1 < I <sub>geo</sub> ≤ 2 2 < I <sub>geo</sub> ≤ 3 3 < I <sub>geo</sub> ≤ 4 4 < I <sub>geo</sub> ≤ 5 5 < I <sub>geo</sub>	niezanieczyszczone niezan. do umiarkowanie zan. umiarkowanie zan. umiarkowanie do silnie zan. silnie zan. silnie do ekstremalnie zan. ekstremalnie zan.
<b>Kryterium ekotoksykologiczne (KE)</b> (Mcdonald i in. 2000)	-	Metal < TEC PEC > Metal < TEC Metal > PEC  PEC - Probable Effect Concentration TEC - Threshold Effect Concentration	działanie nietoksyczne działanie obojętne działanie toksyczne
<b>Potential Ecological Risk Factor (ER)</b> (Hakanson 1980)	$ER = T_f^i \cdot CF$ <sup>2</sup> T- współczynnik toksyczności metalu CF - Contamination Factor	ER < 40 40 < ER ≤ 80 80 < ER ≤ 160 160 < ER ≤ 320 ER > 320	niskie ryzyko umiarkowane ryzyko znaczące ryzyko wysokie ryzyko bardzo wysokie ryzyko

<sup>1</sup> B<sub>n</sub>: Cd (0,1 mg·kg<sup>-1</sup>); Cr (100 mg·kg<sup>-1</sup>); Cu (55 mg·kg<sup>-1</sup>); Pb (15 mg·kg<sup>-1</sup>); Zn (70 mg·kg<sup>-1</sup>);

<sup>2</sup> T: Cd (30); Cr (2); Cu (5); Pb (5); Zn (1)

### 3. Wyniki i dyskusja

#### 3.1 Ocena stopnia zanieczyszczenia osadów dennych

W Tab. 2 zaprezentowano średnie wartości stężeń wybranych metali ciężkich w osadach dennych zbiornika zaporowego Kozłowa Góra, na poszczególnych stanowiskach pomiarowych (S1-S5). Osady te charakteryzowały się stabilnymi wartościami pH (7,1-7,4). Metale ciężkie w osadach dennych zbiornika Kozłowa Góra tworzyły następujący szereg: Zn > Pb > Cr > Cu > Cd. Największe

stężenie metali odnotowano na stanowiskach 3 i 4. Nie stwierdzono istnienia silnych zależności pomiędzy głębokością pobierania osadów a zawartością poszczególnych metali.

Zgodnie z klasyfikacją opartą o kryterium geochemiczne (Bojakowska i Sokołowska, 1998) stwierdzono, że osady dennego zbiornika Kozłowa Góra były miernie do silnie zanieczyszczone ww. metalami ciężkimi. Szczególnie silne zanieczyszczenie powodowały kadm, ołów i cynk (klasa IV). Należy tu nadmienić, że omawiany zbiornik jest położony na obszerze Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP), gdzie odnotowywane są wyższe stężenia metali ciężkich w środowisku w porównaniu do innych regionów Polski. GOP zlokalizowany jest w centralnej części województwa śląskiego i jest to obszar o największej koncentracji zakładów przemysłowych w kraju. Podobne wartości stężeń metali do tych w badanych osadach dennych odnotowano także w zbiorniku Rybnickim, tj. 25,8 (Cd), 129,8 (Cr), 451,7 (Cu), 118,6 (Pb), 1583,4 (Zn) mg·kg<sup>-1</sup> (Loska i Wiechuła 2003), zlokalizowanym na terenie Rybnickiego Okręgu Węglowego (ROW), z którego pochodzi około 30% krajowego wydobycia węgla kamiennego. Dla porównania osady dennego pochodzące ze zbiorników wodnych położonych na obszarach charakteryzujących się niższym udziałem przemysłu ciężkiego w gospodarce, takie jak Malta oraz Środa w województwie wielkopolskim, charakteryzują się niższym stężeniem metali, tj. odpowiednio 0,09 (Cd), 7,8 (Cr), 11,0 (Cu), 2,7 (Pb), 72,0 (Zn) mg·kg<sup>-1</sup> (Rzyski i in. 2014) oraz 0,2 (Cd), 4,8 (Cr), 4,6 (Cu), 7,4 (Pb), 357,5 (Zn) mg·kg<sup>-1</sup> (Sojka i in. 2019). W Tab. 3, zaprezentowano średnią zawartość wybranych metali ciężkich w osadach dennych pochodzących ze zbiorników wodnych mieszczących się na obszarze Polski i za granicą.

**Tab. 2.** Średnia zawartość metali ciężkich w osadach dennych zbiornika Kozłowa Góra.

Stanowisko	Cd	Cr	Cu	Pb	Zn
1	15,8	47,7	35,3	342,3	2229,0
2	13,8	46,2	36,3	340,5	2012,9
3	20,0	59,3	52,1	422,2	2658,0
4	22,2	55,0	56,0	475,9	2550,7
5	15,7	50,0	38,3	360,3	2079,3
$\bar{x}$	17,5	51,6	43,6	388,2	2305,1
SD	3,5	5,4	9,7	59,2	285,9
RSD, %	19,8	10,5	22,2	15,2	12,4

$\bar{x}$  - średnia arytmetyczna; SD – odchylenie standardowe; RSD – względne odchylenie standardowe

**Tab. 3.** Zawartość metali ciężkich w osadach dennych zbiorników wodnych w Polsce i za granicą.

Lokalizacja	Cd	Cr	Cu	Pb	Zn	Źródło
	mg·kg <sup>-1</sup>					
Zbiornik Dzierżno Duże, Polska	5,4	96,3	139,9	183,5	1258,9	Tyła i Kostecki (2019)
Zbiornik Brody Iłżyckie, Polska	2,5	41,4	16,6	69,2	345,0	Smal i in. (2015)
Mangla Lake, Pakistan	4,4	25,0	22,6	30,7	127,3	Saleem i in. (2015)
Hoedong Reservoir, Korea	1,6	28,7	57,6	60,5	247,8	Lee i in. (2017)
Suyahu Reservoir, Chiny	0,1	52,3	17,8	19,9	52,1	Li in. (2019)

Stopień zanieczyszczenia osadów dennych zbiornika Kozłowa Góra był również oceniany w oparciu o wartości wskaźnika Geoaccumulation Index ( $I_{geo}$ ) (Müller 1969). Stwierdzono, że analizowane osady dennego były ekstremalnie zanieczyszczone kadmem ( $I_{geo}$ ; 6,5-7,2), silnie do ekstremalnie cynkiem ( $I_{geo}$ ; 4,3-4,7), jak również silnie do ekstremalnie oraz silnie zanieczyszczone ołowiem ( $I_{geo}$ ; 3,9-4,4). W przypadku Cu i Cr stwierdzono niewielkie zanieczyszczenie osadów tymi

metalami. Rozpatrując wartości  $I_{geo}$ , analizowane metale tworzyły następujący szereg:  $Cd > Zn > Pb > Cu > Cr$ . Identyczną zależność zaobserwowano we wcześniejszych badaniach własnych, w odniesieniu do osadów dennych ze zbiornika Dzierżno Duże (GOP, województwo śląskie) (Tytła i Kostecki 2019). Dla porównania Sojka i in. (2019) wykazali, że w przypadku pięciu zbiorników zlokalizowanych na terenie województwa wielkopolskiego, charakteryzującego się mniejszym uprzemysłowieniem od województwa śląskiego, ogólna zawartość Cd, Cr, Pb czy Cu nie powodowała zanieczyszczenia tych ekosystemów wodnych, z kolei Zn stwarzał realne zagrożenie. Interpretację wyników uzyskanych w odniesieniu do obliczonych wartości  $I_{geo}$  zaprezentowano w Tab. 4.

**Tab. 4.** Interpretacja  $I_{geo}$  dla metali ciężkich w osadach dennych zbiornika Kozłowa Góra.

Metal	S1	S2	S3	S4	S5
Cd	EZ	EZ	EZ	EZ	EZ
Cr	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Cu	NZ	NZ	NZ	NZ	NZ
Pb	CZ	CZ	C-EZ	C-EZ	CZ
Zn	C-EZ	C-EZ	C-EZ	C-EZ	C-EZ

NZ - niezanieczyszczone; CZ - ciężko zan.; C-EZ - ciężko do ekstremalnie zan.; EZ - ekstremalnie zan.

### 3.1. Analiza potencjalnego ryzyka ekologicznego

Do analizy potencjalnego ryzyka ekologicznego związanego z obecnością rozpatrywanych metali ciężkich w osadach dennych zbiornika zaporowego Kozłowa Góra, zastosowano m.in. kryterium ekotoksykologiczne oparte na wskaźnikach Probable Effect Concentration (PEC) i Threshold Effect Concentration (TEC) (McDonald i in. 2000). Kryterium to informują o takiej zawartości pierwiastka, powyżej której zauważalny jest jego toksyczny wpływ na żywy organizm. W omawianych badaniach toksyczne oddziaływanie stwierdzono w przypadku Cd, Pb i Zn. Podobne obserwacje poczyniono we wcześniejszych badaniach własnych, gdzie wykazano, że w osadach dennych zbiornika Dzierżno Duże (GOP, województwo śląskie) obecne są metale, które mogą oddziaływać toksycznie na organizmy żywe, tj. Cd, Zn, Pb, Cr (Tytła i Kostecki 2019). Dla kontrastu Tarnawski i Baran (2018) nie stwierdzili toksycznego oddziaływania Zn, Cu, Pb i Cr, w związku z obecnością tych metali w osadach zbiornika zaporowego Rzeszów (województwo podkarpackie). Z kolei, potwierdzili oni toksyczne oddziaływanie w przypadku Cd. Interpretację wyników otrzymanych w odniesieniu do kryterium ekotoksykologicznego przedstawiono w Tab. 5.

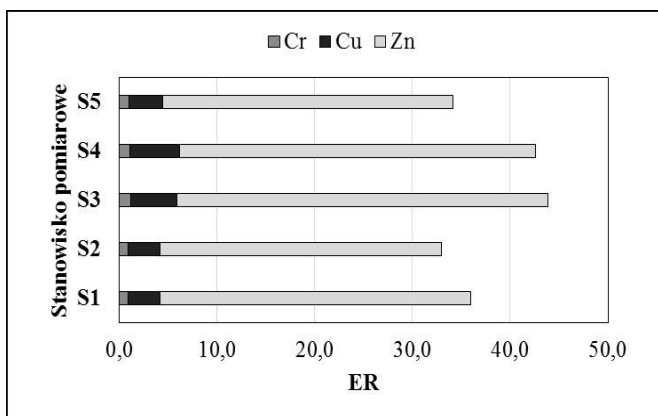
**Tab. 5.** Interpretacja PEC/TEC dla metali ciężkich w osadach dennych zbiornika Kozłowa Góra.

Metal	S1	S2	S3	S4	S5
Cd	T	T	T	T	T
Cr	NT/T	NT/T	NT/T	NT/T	NT/T
Cu	NT/T	NT/T	NT/T	NT/T	NT/T
Pb	T	T	T	T	T
Zn	T	T	T	T	T

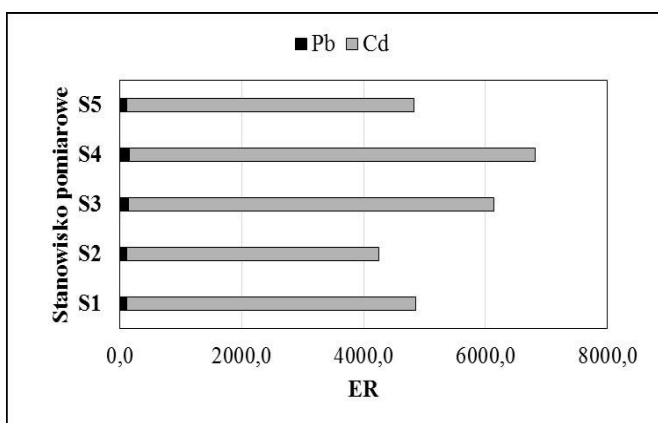
NT - oddziaływanie nietoksyczne; NT/T - ani toksyczne ani nietoksyczne; T - toksyczne

Toksyczność danego pierwiastka uwzględnia również wskaźnik Potential Ecological Risk Factor (ER) (Hakanson 1980). W oparciu o obliczone wartości ER wykazano, że spośród analizowanych metali największe ryzyko ekologiczne stwarzają kadm (ER; 4140-6660,0) i ołów (ER; 113,5-158,6). Rozpatrując wartości ER, analizowane metale tworzyły następujący szereg:  $Cd > Pb > Zn > Cu > Cr$ . W przeciwieństwie do prezentowanych wyników badań, Baran i in. (2016) wykazali, że kadm i miedź obecne w osadach dennych zbiornika Rybnickiego, który również zlokalizowany jest na terenie województwa śląskiego stwarzały umiarkowane ryzyko ekologiczne, podczas gdy ołów, chrom czy cynk – niskie ( $Cd > Cu > Pb > Cr > Zn$ ). Z kolei badania przeprowadzone w osadach dennych zalewu Bardowskiego (województwo mazowieckie), wykazały że pomimo całkowicie odmiennego charakteru zlewni od tej omawianej w niniejszej pracy, rozpryżywane osady stwarzały

wysokie ryzyko ekologiczne ze względu na obecność kadmu (ER; 420,0-3180,0) (Tytła i in. 2018). Należy tu podkreślić, że pomimo, iż kadm występuje w środowisku w niskich stężeniach, to jest on jednocześnie wysoce toksyczny dla ludzi i zwierząt (w nadmiernych ilościach), natomiast mniej toksyczny dla roślin (Tiruneh i in. 2014). Dlatego też należy dołożyć wszelkich starań w kontekście wdrożenia systematycznego monitoringu zawartości tego metalu w osadach dennych. Obliczone wartości ER dla metali ciężkich w osadach dennych zbiornika Kozłowa Góra zaprezentowano na Rys.2A i 2B.



Rys. 2A. Wartości ER dla metali ciężkich w osadach dennych zbiornika Kozłowa Góra (Cr, Cu, Zn).



Rys. 2B. Wartości ER dla metali ciężkich w osadach dennych zbiornika Kozłowa Góra (Pb i Cd).

#### 4. Wnioski

W niniejszej pracy przeprowadzono ocenę stopnia zanieczyszczenia osadów dennych wybranymi metalami ciężkimi (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) oraz analizę ryzyka ekologicznego w oparciu o wybrane wskaźniki/kryteria, tj. kryterium geochemiczne (klasy czystości osadów dennych) i wskaźnik Geoaccumulation Index ( $I_{geo}$ ), jak również kryterium ekotoksykologiczne (PEC i TEC) i wskaźnik Potential Ecological Risk Factor (ER). Osady denne pobierano przez okres kilku miesięcy ze zbiornika zaporowego Kozłowa Góra, który zlokalizowany jest na terenie jednego z najbardziej przeobrażonych działalnością człowieka regionów w kraju i Europie, tj. Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP) w województwie śląskim (południowa Polska).

Przeprowadzone badania wykazały, że według kryterium geochemicznego oraz obliczonych wartości wskaźnika  $I_{geo}$ , osady denne zbiornika Kozłowa Góra są silnie zanieczyszczone kadm, cynkiem i ołowiem. Z kolei, analiza ryzyka ekologicznego przeprowadzona w oparciu o kryterium ekotoksykologiczne oraz wartości wskaźnika ER, wykazała, że kadm, ołów i cynk mogą dodatkowo

oddziaływać toksycznie na organizmy żywe. Ponadto, zaobserwowano również, że metale, które występują w osadach dennych, w niższych stężeniach, jak np. kadm, mogą stwarzać wyższe lub porównywalne ryzyko ekologiczne w porównaniu do pozostałych pierwiastków, jak cynk czy ołów.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań wskazują na konieczność uwzględnienia w procedurze oceny jakości chemicznej osadów dennych wyników analiz dotyczących zawartości metali ciężkich. Zanieczyszczenia te powinny podlegać systematycznemu monitoringowi. Działanie to ma szczególne znaczenie w przypadku rekultywacji czy odmulania zbiorników wodnych, celem ochrony środowiska przed jego wtórnym zanieczyszczeniem metalami ciężkimi. Zagadnienie podjęte w niniejszej pracy jest ważne również ze względu na słaby stan środowiska w województwie śląskim, gdzie znajduje się zbiornik zaporowy Kozłowa Góra.

### **5. Źródło finansowania**

Badania przeprowadzono w ramach realizacji pracy statutowej o nr 1a-123/2018 „Zmienność specyjalnych form fosforu i wybranych metali w wodzie i osadach dennych zbiorników antropogenicznych w aspekcie ich rekultywacji”, finansowanej ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

### **6. Literatura**

- Banerjee S, Pramanik A, Sengupta S, Chattopadhyay D, Bhattacharyya M (2017) Distribution and source identification of heavy metal concentration in Chilika Lake, Odisha India: an assessment over salinity gradient. *Current Science* 112: 87–94.
- Baran A, Tarnawski M, Koniarz T (2016) Spatial distribution of trace elements and ecotoxicity of bottom sediments in Rybnik reservoir, Silesian – Poland. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 17255–17268.
- Bojakowska I, Sokołowska G (1998) Geochemiczne klasy czystości osadów wodnych. *Przegląd Geologiczny* 46: 49–54.
- Hakanson L (1980) Ecological Risk Index For Aquatic Pollution Control, a Sedimentological Approach. *Water Research* 14: 975–1001.
- Kabata-Pendias A (2011) Trace Elements in Soils and Plants, 4th ed.; Taylor & Francis: London, UK, 41–42.
- Lee PK, Kang MJ, Yu S, Ko KS, Ha K, Shin SC, Park JH (2017) Enrichment and geochemical mobility of heavy metals in bottom sediment of the Hoedong reservoir, Korea and their source apportionment. *Chemosphere* 184:74–85.
- Li Z, Huo J, Bricker JD (2019) Ecological risk assessment for eutrophication and heavy metal pollution of suyahu reservoir sediments. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 33: 1053–1062.
- Loska K, Wiechuła D (2003) Application of principal component analysis for the estimation of source of heavy metal contamination in surface sediments from the Rybnik Reservoir. *Chemosphere* 51: 723–733.
- Macdonald DD, Ingersoll CG, Berger TA (2000) Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 20–31.
- Müller G (1969) Index of Geoaccumulation in Sediments of the Rhine River. *GeoJournal* 2: 108–118.
- PN-ISO 11465:1999 Jakość gleby – Oznaczanie zawartości suchej masy gleby i wody w glebie w przeliczeniu na suchą masę gleby – Metoda wagowa, Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 1999.
- Rzymiski P, Niedzielski P, Poniedziałek B, Klimaszuk P (2014) Bioaccumulation of selected metals in bivalves (Unionidae) and Phragmites australis inhabiting a municipal water reservoir. *Environmental Monitoring and Assessment* 186:3199–3212.
- Saleem M, Iqbal J, Shah MH (2015) Geochemical speciation, anthropogenic contamination, risk assessment and source identification of selected metals in fresh water sediments—a case study



- from Mangla Lake, Pakistan. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* 4:27–36.
- Sojka M, Jaskuła J, Siepak M (2019) Heavy metals in bottom sediments of reservoirs in the lowland area of western Poland: Concentrations, distribution, sources and ecological risk. *Water* 11: 56.
- Tarnawski M, Baran A. (2018). Use of chemical indicators and bioassays in bottom sediment ecological risk assessment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 74:395–407.
- Tiruneh AT, Fadiran AO, Mtshali JS (2014) Evaluation of the risk of heavy metals in sewage sludge intended for agricultural application in Swaziland. *International Journal of Environmental Science and Technology*.5: 197–216.
- Tytła M, Dmochowska A, Dmochowski D, Jaworska K (2018) Ecological risk assessment of trace metals in the bottom sediments of the young water reservoir–Bardowskiego Lagoon (Warsaw) case study, *E3S Web of Conferences* 44: 00182.
- Tytła M, Kostecki M (2019) Ecological risk assessment of metals and metalloid in bottom sediments of water reservoir located in the key anthropogenic “hot spot” area (Poland). *Environmental Earth Sciences* 78: 179.
- Ustawa z dnia 14 grudnia 2012 r. o odpadach (Dz.U. 2013 poz. 21).
- Zhao S, Feng C, Yang Y, Niu J, Shen Z (2012) Risk assessment of sedimentary metals in the Yangtze Estuary: new evidence of the relationships between two typical index methods. *Journal of Hazardous Materials* 241-242:164–72.

## 10. Obecność w środowisku leków stosowanych w psychiatrii

The presence of drugs used in psychiatry in the environment

Dawid Wardecki<sup>(1)\*</sup>, Ewa Adamek<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>(2)</sup>Opiekun naukowy STN, Katedra i Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

\*Wardecki Dawid: wardecki.dawid@gmail.com

Słowa kluczowe: Organizmy wodne, leki psychoaktywne, środowisko

### Streszczenie

Stale rosnąca konsumpcja leków ma jednak swoje czarne strony a jedną z nich jest kwestia zanieczyszczenia środowiska pozostałościami leków. Problem ten pojawił się już kilkadziesiąt lat temu, jednak zwrócił uwagę naukowców później, gdy zostały opracowane nowoczesne metody analityczne, pozwalające na precyzyjne oznaczanie leków występujących w środowisku. Do najczęściej identyfikowanych w środowisku leków należą niesteroidowe leki przeciwzapalne, antybiotyki,  $\beta$ -blokery, leki regulujące gospodarkę lipidową oraz hormony płciowe (syntetyczne i naturalne). W niniejszej monografii skupiono się na lekach stosowanych w psychiatrii, których pozostałości wykrywa się w coraz większej ilości próbek środowiskowych. Obecne w środowisku leki o działaniu psychoaktywnym stanowią zagrożenie dla organizmów wodnych, ponieważ oddziałują m.in. na system nerwowy oraz mogą powodować zaburzenia równowagi hormonalnej w organizmach. W literaturze dostępne są również informacje o zmianach w przeżywalności, zdolności do pływania i w liczebności gatunków spowodowane działaniem tych farmaceutyków.

W pracy scharakteryzowano podstawowe grupy leków psychiatrycznych oraz przedstawiono przegląd literatury dotyczącej występowania wymienionych związków w różnych matrycach środowiskowych oraz działania na wybrane organizmy.

### 1. Wstęp

W związku z szybkim rozwojem gospodarczym, na Ziemi panują coraz lepsze warunki do życia. Przekłada się to na zwiększenie długości życia zwłaszcza osób starszych oraz wzrost liczebności całej populacji. Takie zjawisko skutkuje zwiększeniem zapotrzebowania na leki. Rosnący popyt napędza wzrost podaży tych związków. Zjawisko to występuje praktycznie w każdej grupie farmaceutyków. Przykładowo, wśród 22 państw OECD (Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju) w latach 2000-2018, sprzedaż leków przeciwdepresyjnych wzrosła o 81% (OECD Health Statistics 2013).

Leki psychoaktywne należą do najczęściej przepisywanych leków na świecie. Pozostałości leków psychoaktywnych wykrywa się w wodzie pitnej, wodach powierzchniowych, rzekach, odpływach z oczyszczalni ścieków w stężeniu od ng/l do  $\mu$ g/l. Istnieje jeszcze jedna droga wprowadzania farmaceutyków do środowiska. Leki psychoaktywne wykryto w osadach stałych z oczyszczalni ścieków, które są stosowane w rolnictwie jako nawóz. Może więc nastąpić ponowne wprowadzenie farmaceutyków i ich metabolitów do środowiska lądowego. Leki psychoaktywne są pobierane ze środowiska przez rośliny; w tkankach roślin najczęściej wykrywano karbamazepinę (CMZ) i lorazepam (LZP) a ponadto odnotowano biotransformację i bioakumulację tych związków przez organizmy glebowe. W związku z powyższym problem obecności w środowisku pozostałości leków psychoaktywnych i produktów ich naturalnej transformacji wydaje się ważny i celowym jest jego omówienie (Calisto i Esteves 2009).

## **2. Najważniejsze grupy leków stosowanych w psychiatrii**

### **2.1 Pochodne benzodiazepiny**

Pochodne benzodiazepiny to grupa leków o działaniu uspokajającym i nasennym, które są najczęściej przepisywane przez lekarzy. Wyparły one ze stosowania starszą grupę leków o analogicznym działaniu czyli pochodnych kwasu barbiturowego, m.in. ze względu na znacznie szerszą rozpiętość pomiędzy dawką leczniczą a szkodliwą. Najczęściej stosowanymi lekami z tej grupy są alprazolam (ALP), bromazepam (BRO), diazepam (DZP), klonazepam (KLO) i temazepam (TMZ).

W zależności od okresu półtrwania, leki z tej grupy mają zastosowanie nie tylko jako środki nasenne i uspokajające ale także przeciwlękowe oraz przeciwpadaczkowe. Najpopularniejszym lekiem z tej grupy jest *DZP*. Niektóre pochodne benzodiazepiny wykazują szersze zastosowanie, jak np. w leczeniu choroby alkoholowej (klorazepat i *DZP*) oraz objawowego zwiększonego napięcia mięśni (TMZ). Pochodne benzodiazepiny są także stosowane w weterynarii. Z uwagi na ich komponentę przeciwlękową podawane są np. podczas transportu, gdy zwierzęta są pobudzone i zestresowane.

Długotrwałe stosowanie benzodiazepiny wywołuje silnie uzależnienie. Po zaprzestaniu podawania rozwija się zespół abstynencyjny w postaci lęku, niepokoju, bezsenności, zaburzeń koncentracji a niekiedy nawet depresji (Janiec 2015).

### **2.2 Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne (TLPD)**

Ta grupa leków psychoaktywnych obejmuje około 20 preparatów, do których zalicza się, m.in. amitryptylinę (AMI), imipraminę (IMI), klomipraminę (KPA), doksepinę (DOX) i dotiepinę (DOT).

Leki z grupy TLPD są nieselektywnymi inhibitorami wychwytu zwrotnego. Oznacza to, że hamują wychwyt zwrotny zarówno noradrenaliny jak i serotoniny. Skutkiem tego działania jest nasilenie neuroprzeżywalności zarówno w układzie noradrenergicznym i serotonergicznym, a co za tym idzie poprawa nastroju oraz napędu psychoruchowego. Trójcykliczne leki przeciwdepresyjne mają zastosowanie w leczeniu depresji (głównie przewlekłej, z podłożem nerwicowym), dystymii, zespołów natręctw, lęków i nerwic, bezsenności a także bulimii. Pomocniczo, można je stosować w terapii nikotynizmu i innych uzależnień. Obecnie, leki z tej grupy nie są często stosowane, ze względu na liczne działania niepożądane (Janiec 2015).

### **2.3 Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI)**

Wprowadzenie do lecznictwa leków przeciwdepresyjnych z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny było ważnym etapem w rozwoju psychofarmakologii klinicznej. Pojawienie się pod koniec lat 80. XX w. pierwszego leku z tej grupy, czyli fluoksetyny (pod nazwą „Prozac®”), było w Stanach Zjednoczonych wydarzeniem o charakterze kulturowym (tzw. subkultura Prozacu, powstała na skutek wypromowania tego leku jako tzw. „pigułki szczęścia” usuwającej wszelkie zmartwienia). Do grupy leków SSRI zalicza się, m.in. citalopram (CIT), sertralinę (SER), fluoksetynę (FLU) i wenlafaksynę (WEN).

Mechanizm działania leków z grupy SSRI polega na blokowaniu transportera odpowiedzialnego za wychwyt serotoniny ze szczeliny synaptycznej. Zwiększa to poziom serotoniny nazywanej „hormonem szczęścia” co prowadzi do poprawy nastroju i ustąpienia depresji. Skuteczne są w leczeniu depresji, fobii społecznej, zespołu Aspergera, lęków i nerwic. Omawiane leki, podobnie jak leki z grupy TLPD, wykazują pozytywne efekty po około 2-3 tygodniach stosowania.

Do najpoważniejszych działań niepożądanych leków z tej grupy należą zmiany zachowania w postaci zachowań samobójczych oraz wrogości wobec otoczenia. Leki z grupy SSRI powodują także uzależnienie, objawy abstynencyjne występują u około 60% leczonych i pojawiają się w ciągu kilku dni od zaprzestania stosowania (Janiec 2015).

### **2.4 Leki przeciwpsychotyczne (neuroleptyki)**

Neuroleptyki to leki o działaniu przeciwpsychotycznym oraz uspokajającym. Znoszą stany pobudzenia psychoruchowego oraz agresję. Stosowane są w leczeniu psychoz schizofrenicznych oraz

stanów maniakalnych. Łagodzą objawy i jednocześnie nie wywierają ujemnego działania na świadomość i funkcje intelektualne a także zapobiegają nawrotom choroby. Do najpopularniejszych neuroleptyków zalicza się: chloropromazynę (CHP), protypendyl (PRO), klozapinę (KZP) i tiorydazynę (TRD).

Neuroleptyki mogą być krótkotrwale stosowane, m.in. w zespołach urojeniowych, stanach maniakalnych z pobudzeniem psychoruchowym, niepokojem lub lękiem, depresjach urojeniowych oraz depresjach z niepokojem i lękiem, jak również w psychozach wieku podeszłego (Janiec 2015).

### **3. Obecność leków o działaniu psychoaktywnym w środowisku**

Farmaceutyki, które są zaprojektowane i podawane w celu wywołania skutków biologicznych lub fizjologicznych u ludzi i/lub zwierząt, są wydalane z organizmów w postaci niezmienionej lub jako metabolity (najczęściej jako glukuroniany). W przypadku pochodnych fenotiazyny, około 30% podanego doustnie leku jest wydalanych z moczem a około 50% z kałem przy czym związki te są uprzednio metabolizowane w wątrobie (3-7% dawki przyjętego leku jest wydalane w postaci niezmienionej lub koniugatów). Wydaliny ludzi najczęściej trafiają do kanalizacji a następnie do oczyszczalni ścieków. Źródłem leków w środowisku jest też ich niewłaściwa utylizacja. Ankieta przeprowadzona wśród mieszkańców południowo-wschodniej Anglii na temat usuwania farmaceutyków wykazała, że prawie 67% osób przyznało się do ich wyrzucania do kosza (Calisto i Esteves 2009).

Farmaceutyki po raz pierwszy wykryto w środowisku wodnym pod koniec lat 70. XX wieku. Oznacza to, że powszechnie stosowane procesy oczyszczania ścieków nie są skuteczne wobec tych związków. Ponadto, nowe procesy uzdatniania, np. ozonowanie lub działanie promieniowaniem ultrafioletowym mogą być niewystarczające i niekompletne. Powstające w trakcie tych reakcji produkty ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne mogą utrzymywać się przez dłuższy czas w środowisku wodnym. Nie jest też wykluczone, że produkty przemian mogą wykazywać inne właściwości i działania niż związki macierzyste, np. większą toksyczność wobec organizmów wodnych. Ponadto, koniugaty farmaceutyków w tym leków psychoaktywnych mogą ulec środowiskowej transformacji z powrotem do metabolitów fazy I, co potwierdzono w przypadku koniugatów CHP. (Cunha i in. 2017).

W wodach powierzchniowych, farmaceutyki w tym leki psychoaktywne mogą podlegać procesom biodegradacji. Niestety, wiele z nich jest odpornych na te przemiany z udziałem mikroorganizmów środowiskowych. Przykładem jest CMP, której okres półtrwania w środowisku wodnym mieści się w granicach 125-233 dni, a wskaźnik usuwania poprzez biodegradację wynosił < 0.1% (Cunha i in. 2019).

Omawiając obecność leków psychoaktywnych w środowisku nie można pominąć jeszcze jednej kwestii, mianowicie tych które są pozyskiwane z nielegalnych źródeł. Na rynku jest wiele tego typu preparatów psychoaktywnych, wśród których są stymulanty (używkami) jak kokaina i metamfetamina oraz halucynogeny jak np. dietyloamid kwasu D-lizergowego (LSD). W trzech rzekach na terenie Wielkiej Brytanii stwierdzono obecność licznych leków stosowanych w psychiatrii oraz substancji psychoaktywnych (Baker i in. 2013). W 90% spośród pobranych próbek wykryto kokainę (0,5-17,4 ng L<sup>-1</sup>) i jej metabolity (1,1-72,4 ng L<sup>-1</sup>), kodeinę (7-340 ng L<sup>-1</sup>) i dihydrokodeinę (1,7-97 ng L<sup>-1</sup>). Z grupy benzodiazepin w próbkach wody w największych ilościach występował TMZ (1,3-78 ng L<sup>-1</sup>) i oksazepam (OZP) (1,2-20 ng L<sup>-1</sup>). Ilości tych związków były wykrywane w coraz większych ilościach wzdłuż biegu rzek. Stężenie DZP (0,5-1,1 ng L<sup>-1</sup>) było zbliżone do stężenia tego leku, które oznaczono w rzece na terenie północnych Włoch (0,13-2,13 ng L<sup>-1</sup>). Z kolei, stężenie nordiazepamu (0,2-6,8 ng L<sup>-1</sup>) było podobne do stężenia tego związku w próbkach wody rzeki z Francji (<2,4 ng L<sup>-1</sup>). FLU i jej główny metabolit norfluoksetyna należą do jednych z najczęściej analizowanych na świecie antydepresantów w matrycach środowiskowych. W próbkach wody powierzchniowej na obszarze Stanów Zjednoczonych, stężenie FLU i metabolitu było rzędu, odpowiednio, 12-20 oraz 0,83-1,0 ng L<sup>-1</sup>. W rzekach na terenie Wielkiej Brytanii, stężenie FLU mieściło się w przedziale 5,7-13,5 ng L<sup>-1</sup> natomiast norfluoksetyny wynosiło 1,1-3,5 ng L<sup>-1</sup>. W tym samym badaniu, antydepresantem wykrywanym w najwyższym stężeniu była WEN (0,8-85 ng L<sup>-1</sup>) a analiza wody poddawanej recyklingowi w celu ponownego użycia (Teksas, Stany Zjednoczone)

wykazała obecność tego leku w stężeniu sięgającym 1000 ng L<sup>-1</sup>. W wodzie rzek Wielkiej Brytanii, obecne były DOT (0,2-17,4 ng L<sup>-1</sup>) i AMI (0,7-52,6 ng L<sup>-1</sup>). W wodach powierzchniowych w pobliżu Szanghaju (Chiny) w najwyższych ilościach występowały LZP (<8,3 ng L<sup>-1</sup>), CMZ (83,8 ng L<sup>-1</sup>) i DZP (<79,3 ng L<sup>-1</sup>). W tym samym badaniu, stwierdzono obecność LZP w wodzie gruntowej (46,8 ng L<sup>-1</sup>) (Xiang i in. 2018).

Niepokojące są wyniki badań, które potwierdziły obecność AMI w wodzie do picia (<1,4 ng L<sup>-1</sup>) pobranej na obszarze Francji. Wskazują one na konieczność dokładnej analizy próbek wody powierzchniowej przeznaczonej – po uzdatnieniu – do picia (Cunha i in. 2019).

Wyniki licznych badań wskazują, że stężenie leków psychoaktywnych w wodach powierzchniowych jest znacznie wyższe podczas pory suchej a znacznie niższe podczas pogody deszczowej z powodu znacznego ich rozcieńczenia wodą deszczową. Nie stwierdza się wyraźnej sezonowości w zmianach stężenia omawianych leków wraz z porą roku (Cunha i in. 2019).

Obecność dużej liczby legalnych i nielegalnych środków psychoaktywnych w ściekach wprowadzanych do oczyszczalni ścieków na obszarze Wielkiej Brytanii. W każdej spośród 109 pobranych próbek wykryto, m.in. kokainę (<208 ng L<sup>-1</sup>) i jej metabolity (< 567 ng L<sup>-1</sup>), kodeinę (< 3,97 mg L<sup>-1</sup>) i jej metabolity (dihydrokodeina <1,03 mg L<sup>-1</sup>). W 95% próbek obecna była amfetamina a jej maksymalne stężenie sięgało 3,11 mg L<sup>-1</sup>. Spośród benzodiazepin, w 95% przebadanych próbek obecny był OZP (<155 ng L<sup>-1</sup>) a TMZ (<254 ng L<sup>-1</sup>) w 92% próbek. Z grupy antydepresantów, we wszystkich badanych próbkach stwierdzono obecność DOT (673 ng L<sup>-1</sup>), AMI (<1,05 mg L<sup>-1</sup>) i WEN (<446 ng L<sup>-1</sup>) (Baker i in. 2013).

#### **4. Działanie leków stosowanych w psychiatrii na organizmy wodne**

Większość leków psychoaktywnych ma strukturę podobną do substancji naturalnych oraz właściwości hydrofobowe, ponieważ aby uzyskać pożądane efekty farmakologiczne w mózgu muszą przekroczyć barierę krew-mózg. Niestety te właściwości powodują, że w środowisku wodnym są one łatwo pobierane przez organizmy, które tam zamieszkują. W tkankach ryb dziko żyjących na terenach Stanów Zjednoczonych, Europy i Japonii stwierdzono obecność różnych leków psychoaktywnych, przy czym najczęściej były to antydepresanty (FLU i sertralina) oraz przeciwpadaczkowe (CMZ). Wymienione związki gromadziły się głównie w mózgu ryb, który jest głównym miejscem ich działania (Cunha i in. 2019). Zrozumiałe jest, że naukowcy zainteresowali się problemem czy leki psychoaktywne zmieniają zachowanie organizmów wodnych. Można bowiem oczekiwać, że podobne skutki leków psychoaktywnych będą występować zarówno u ludzi, jak i organizmów wodnych, jeśli stężenia w osoczu tych organizmów osiągną wartości, które powodują działanie terapeutyczne. Dotychczas opublikowane wyniki badań dotyczą wpływu omawianych leków psychoaktywnych na kręgowce wodne (tj. ryby) oraz bezkręgowce (tj. mięczaki i krewetki). Najczęściej w doświadczeniach ocenia się działanie leków przeciwdepresyjnych i przeciwlękowych na zachowanie ryb (Kalichak i in. 2016). Ponieważ badania zachowania się ryb wolno żyjących w ich naturalnym środowisku są niezwykle trudne, eksperymenty przeprowadza się w tzw. mikrokosmach i mezokosmach. Jako punkty końcowe doświadczeń ustala się najczęściej: tempo zdobywania pokarmu, unikanie drapieżników, chwytanie zdobyczy, agresję, szukanie schronienia, czas spędzony w górnej połowie akwarium i odwagę (typ behawioralny). W prawie wszystkich doświadczeniach odnotowano, że leki psychoaktywne zmieniły zachowanie ryb w sposób, który prawdopodobnie obniża ich sprawność. Przykładowo, CMZ w stężeniu w zakresie 200–2000 ng L<sup>-1</sup> wpływała na zachowanie organizmów wodnych oraz zmieniła strukturę społeczności słodkowodnych i dynamikę ekosystemów. Z kolei CIT, FLU i OZP spowodowały, m.in. zmiany w zdolności pływania u *Oryzias latipes*, zwiększenie aktywności u *Perca fluviatilis*, zmniejszenie częstotliwości pobierania żywności przez *Gastrosteus aculeatus*, zwiększenie aktywności *Perca fluviatilis*, oraz zmniejszenie częstotliwości pracy serca u *Danio rerio*. Pod wpływem omawianej grupy leków obserwowano zmniejszoną przeżywalność larw *O. latipes*. Stwierdzono, że pod wpływem FLU, DZP i risperidonu dochodziło do zmniejszenia liczebności larw *D. rerio* co przełożyło się na zmniejszenie populacji dorosłych osobników. Najsilniejsze działanie hamujące przeżywalność larw tego gatunku ryby wykazywały risperidon i FLU. Z kolei DZP nie wpływał znacząco na wykluwalność ikry ale istotnie zmniejszył przeżywalność larw wskutek inhibicji tempa pracy ich serc. Opisano także działanie

mianseryny wobec kręgowców wodnych. Wymieniony związek wykazywał działanie estrogenne i powodował zaburzenia endokrynologiczne u *D. rerio* (Calisto i Esteves, 2009). Podobnie, obecność FLU w stężeniu na poziomie ng/l wpłynęła na zmianę stężenia estradiolu w osoczu *O. latipes* i przyczyniła się do zwiększonej liczby nieprawidłowości rozwojowych u młodych osobników. W badaniach w których analizowano działanie CIT na rozwój bezkręgowców zaobserwowano, m.in. odwarstwienie stopy ślimaków (*Leptoxis carinata* i *Stagnicola elodes*). Z kolei u przedstawicieli komarów (*Aedes aegypti*), małych skorupiaków wodnych (*Cypridopsis vidua*) i parzydełkowców (*Hydra vulgaris*) stwierdzono zmniejszoną przeżywalność larw.

W badaniach nad ekotoksycznością leków psychoaktywnych wobec środowiskowych organizmów wodnych, stosuje się testy biologiczne, w których wykorzystuje się zwierzęta: pierwotniaki *Spirostomum ambiguum* lub skorupiaci *Thamnocephalus platyurus*. CHP i tiorydazyna były bardzo toksyczne dla obu gatunków a po 24 godzinach, wartości LC50 były zbliżone do 0,5 mg L<sup>-1</sup> (Nałęcz-Jawecki i in. 2008). Mniej popularne są testy toksyczności wykorzystujące rośliny: glony (zielenice, sinice i okrzemki), rzęśę wodną (*Lemna gibba* i *Lemna minor*) oraz ukorzone makrofity. Organizmy te charakteryzują się dużym znaczeniem ponieważ, m.in. dostarczają tlen, zapewniają obieg związków organicznych, oraz schronienie i siedlisko życia licznym organizmom, w tym bezkręgowcom, rybam, i płazom. Z tego powodu, zmiany zachodzące w roślinach wodnych bezpośrednio wpływają na równowagę całego ekosystemu. W badaniu wykorzystującym rzęśę drobną (*L. minor*), po 148 godzinach ekspozycji na CHP stwierdzono toksyczne działanie tego leku a wartość EC50 była równa 0,92 mg L<sup>-1</sup> (Trautwein i in. 2012). FLU spowodowała zahamowanie wzrostu algi *Pseudokirchneriella subcapitata*. Opisano także inhibicyjne działanie CMZ na rozwój i działanie chloroplastów u alg, które może skutkować zaburzeniem procesu fotosyntezy.

Przy ocenie ekotoksykologicznego wpływu leków na organizmy wodne ważne jest uwzględnienie produktów ich przemian, jakim podlegają. W środowisku wodnym, związki organiczne ulegają przemianom biotycznym z udziałem, m.in. bakterii środowiskowych i/lub grzybów. Wymienione mikroorganizmy tworzą takie same produkty degradacji leków psychoaktywnych jak powstające podczas metabolizmu w organizmie człowieka. Przykładowo, CHP jest metabolizowana przez grzyb strzępkowy *Cunninghamella elegans* a pięć głównych metabolitów zostało wykrytych w metabolizmie ssaków. Pojawiają się jednak doniesienia, że produktami biodegradacji omawianych leków są związki o innych właściwościach fizykochemicznych i innej aktywności biologicznej (Trautwein i in. 2012).

Nierozłożone farmaceutyki często ulegają w wodach powierzchniowych przemianom abiotycznym, na drodze utleniania, hydrolizy i fotolizy. Część promieniowania słonecznego z zakresu 315–400 nm (tzw. UVA) indukuje bezpośrednio i pośrednio procesy fotochemiczne w górnych warstwach wód powierzchniowych. Najwięcej dostępnych danych literaturowych dotyczy fotodegradacji fenotiazyn. TRD ulega fotodegradacji pod wpływem symulowanego naświetlania światłem słonecznym a w wyniku bezpośredniej fotolizy tworzy się mieszanina produktów. W największych ilościach powstają pochodne sulfotlenkowe co świadczy, że są one nie tylko produktami metabolizmu w organizmach ludzi ale także produktami powstającymi wskutek degradacji w środowisku wodnym. Pochodne sulfotlenkowe obecne były także wśród produktów fotodegradacji CHP. Związki powstałe po naświetlaniu promieniowaniem UVA roztworów CHP i TRD nie były toksyczne wobec skorupiaci *T. platyurus*. Z drugiej strony, produkty fotolizy TRD oraz CHP jak również oba farmaceutyki wykazywały wysoką toksyczność wobec pierwotniaka *S. ambiguum* – powodując, m.in. jego deformację. Przyczyną tego zjawiska jest najprawdopodobniej fakt, że niektóre leki stosowane w psychiatrii, w tym fenotiazyny wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe, które nasila się wskutek ekspozycji na światło. Przykładowo, naświetlanie CHP promieniowaniem UVA generuje wolne rodniki promazyłowe, które łatwo tworzą addukty z kwasem dezoksyrybonukleinowym (DNA) co prowadzi do utworzenia tlenu singletowego (Nałęcz-Jawecki i in. 2008).

Wydaje się, że szczególną uwagę należy zwrócić na toksyczne działanie leków psychoaktywnych wobec pierwotniaków. Organizmy te odgrywają bardzo ważną rolę w ekosystemach, ze względu na ich udział - jako głównych organizmów - w procesach samooczyszczania wody i ścieków. Ze względu na swoje małe wymiary mają dużą powierzchnię

w kontakcie z otoczeniem i mogą być łatwo poddane działaniu promieniowania słonecznego. Opisany powyżej pierwotniak *S. ambiguum* był bardzo wrażliwy nie tylko leki (CHP i TRD) ale także na ich fotopochodne. Świadczy to o tym, że zarówno obecność leków psychoaktywnych, jak i produktów ich fotolizy w środowisku może mieć szkodliwy wpływ na populacje organizmów wodnych.

Z omawianym w niniejszej monografii tematem wiążą się dwa istotne problemy. Pierwszy wynika z faktu, że wyniki doświadczeń przedstawionych w niektórych artykułach są całkowicie sprzeczne z wynikami opisanymi przez innych naukowców. Z tego powodu nie można jednoznacznie stwierdzić, które z nich są wiarygodne i powtarzalne. Przykładem może być praca, w której opisano wyraźny niekorzystny wpływ WEN na młode ryby. W innym artykule nie stwierdzono żadnego negatywnego wpływu tego leku przez cały cykl życiowy ryb. Drugi problem wiąże się z tym, że o ile stosunkowo łatwo ocenić wpływ danego, konkretnego farmaceutyku na jeden gatunek to w środowisku najczęściej występuje „mieszanina” wielu leków, o różnym działaniu farmakologicznym. Część z nich może działać synergistycznie, inne wręcz przeciwnie – będą oddziaływać silnie antagonistycznie. Ogólnie, efekty są trudne do przewidzenia (Jacob i wsp 2020). Tym samym wyników eksperymentów prowadzonych w warunkach laboratoryjnych i dotyczących wpływu jednego związku na jeden gatunek nie można przełożyć na warunki rzeczywiste. Jednym z rozwiązań może być prowadzenie doświadczeń w mezoskalmach (powierzchnia układu 0,5-5 m<sup>2</sup>) i mikroskalmach (powierzchnia układu mniejsza niż 0,5 m<sup>2</sup>), zapewniających warunki zbliżone do warunków naturalnych (Li i in. 2014).

## 5. Podsumowanie i wnioski

Problem występowania leków psychoaktywnych w środowisku jest znaczący ponieważ wzrost konsumpcji leków w ostatnich dziesięcioleciach przyczynia się do generowania coraz większej liczby odpadów farmaceutycznych. Brak skutecznych metod eliminacji farmaceutyków w oczyszczalniach ścieków skutkuje tym, że pozostałości omawianych leków są wykrywane nawet w próbkach wody do picia. Leki psychiatryczne są szczególnie niebezpieczną grupą leków, ponieważ negatywnie oddziałują na system nerwowy i zachowania gatunków. Obserwuje się nie tylko szereg reakcji które odbiegają od normy ale także zmniejszenie liczebności badanych gatunków. Dlatego obecność tych leków w środowisku może prowadzić do zaburzeń w ekosystemach. Celowym więc działaniem jest prowadzenie kontroli zawartości leków psychoaktywnych zwłaszcza w ściekach oczyszczonych, przed ich zrzutem do środowiska oraz badanie działania tych związków na organizmy wodne w mezo- i mikroskalmach.

## 6. Literatura

- Baker DR, Kasprzyk-Hordern B (2013) Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Science of the Total Environment* 454–455: 442–456
- Calisto V, Esteves VI (2009) Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77: 1257–1274
- Cunha DL, Araujo FG, Marques M (2017) Psychoactive drugs: occurrence in aquatic environment, analytical methods, and ecotoxicity — a review. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 24076–24091
- Cunha DL, Mendes MP, Marques M (2019) Environmental risk assessment of psychoactive drugs in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 78–90
- Jacob RS, Santos LV, Auriol M et al. (2020) Diazepam, metformin, omeprazole and simvastatin: a full discussion of individual and mixture acute toxicity. *Ecotoxicology* 29: 1062–1071
- Janiec W (2015) *Kompendium Farmakologii*. Wydanie IV. Warszawa: PZWŁ
- Kalichak F, Idalencio R, Rosa JG et al. (2016) Waterborne psychoactive drugs impair the initial development of Zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 41: 89–94
- Li Y, Zhu G, Ng WJ et al. (2014) A review on removing pharmaceutical contaminants from wastewater by constructed wetlands: design, performance and mechanism. *Science of The Total Environment* 468: 908-932.

- Nałęcz-Jawecki G, Hajnas A, Sawicki J (2008) Photodegradation and phototoxicity of thioridazine and chlorpromazine evaluated with chemical analysis and aquatic organisms. *Ecotoxicology* 17:13–20
- OECD Health Statistics (2013), <http://dx.doi.org/10.1787/health-data-en>.
- Trautwein C, Kümmerer K (2012) Degradation of the tricyclic antipsychotic drug chlorpromazine under environmental conditions, identification of its main aquatic biotic and abiotic transformation products by LC–MS and their effects on environmental bacteria. *Journal of Chromatography B*, 889–890: 24–38
- Xiang J, Wu M, Lei J et al. (2018) The fate and risk assessment of psychiatric pharmaceuticals from psychiatric hospital effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 150: 289-296



## **11. Mikroorganizmy a zmiany klimatyczne - wpływ i zagrożenia**

Microorganisms and climate change - impact and threats

Aleksandra Wichrowska, Joanna Banasiewicz

Katedra Biochemii i Mikrobiologii, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Opiekun naukowy: dr hab. Tomasz Stępkowski

Wichrowska Aleksandra: aleksawicher@gmail.com

Słowa kluczowe: ocieplenie klimatu, mikrobiom, choroby zakaźne

### **Streszczenie**

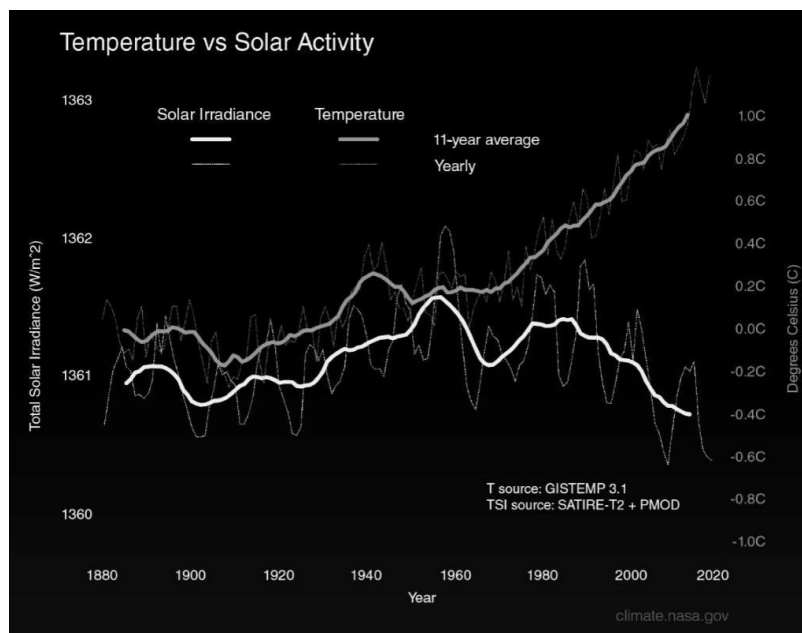
Zmiany klimatu na przestrzeni ostatnich lat przybierają na sile, a ich skutki są coraz mocniej odczuwalne. Na te procesy duży wpływ ma człowiek i jego działania, zwłaszcza te związane z rozwojem przemysłu. Zmiany klimatyczne powodują ocieplanie się Ziemi i są przyczyną ekstremalnych zjawisk pogodowych, takich jak okresy suszy, intensywne opady i powodzie. W ich wyniku zachodzą pewne modyfikacje w środowisku zarówno wodnym jak i lądowym, zmienia się różnorodność bytujących w nich organizmów, w tym również tych najmniejszych. Mikroorganizmy stanowią dużą część zasiedlających naszą planetę organizmów i wpływają na ich funkcjonowanie, dostarczając im składników odżywczych oraz uczestnicząc w ważnych życiowo przemianach. Przeobrażenia w tej grupie organizmów nie obędą się więc bez wpływu na innych użytkowników planety, ponieważ rośliny oraz zwierzęta są od nich w pewien sposób zależne. Jednym z możliwych wpływów klimatu na mikroorganizmy jest zwiększenie się zasięgu i liczebności ich populacji. Taki scenariusz możemy zaobserwować już teraz w przypadku niektórych chorób zakaźnych, a zakładając dalszy wzrost zakażeń tymi drobnoustrojami, problem ten będzie stanowił poważne wyzwanie dla współczesnej medycyny. Niniejsza praca porusza kwestie wpływu zmian klimatu na mikroorganizmy oraz tego jakie zagrożenia mogą się wiązać z modyfikacjami w ich populacji.

### **1. Wstęp**

Okres czasu, w którym się obecnie znajdujemy, jest niewątpliwie pierwszym w dziejach ludzkości, który charakteryzuje się tak wielkim wpływem człowieka na otaczający świat. Z jednej strony jakość życia na naszej planecie zdecydowanie się podniosła. Żyjemy wygodniej, ale nie za darmo. Surowce, które do takiego trybu życia dostarcza nam Ziemia, nie są nieskończone. Aktualnie coraz mocniej jesteśmy w stanie odczuć zmiany zachodzące na naszej planecie. Człowiek stał się ważnym czynnikiem kształtującym Ziemię, a przemysł wywarł znaczący wpływ na jej litosferę, hydrosferę oraz atmosferę. Z uwagi na ten jakże szybko narastający proces, zaproponowana została nowa nazwa epoki geologicznej w dziejach Ziemi – antropocen. Określenie to, chociaż funkcjonuje już od pewnego czasu, nie zostało oficjalnie zatwierdzone jako nowa epoka geologiczna, która zakończyła holocen. Do 2021 roku Grupa Robocza ds. Antropocenu (ang. *Anthropocene Working Group*, AWG) miała przedstawić oficjalne stanowisko Międzynarodowej Komisji Stratygraficznej (ICS).

To człowiek i jego działania mogą być główną przyczyną obserwowanych ostatnio zmian klimatu i jego ocieplenia. Za główną przyczynę obserwowanego wzrostu temperatur uważa się emitowane przez przemysł gazy cieplarniane, takie jak np. dwutlenek węgla. Występując w dużej ilości w atmosferze, tworzą one niejako „szklarnie” na Ziemi, zatrzymując emitowane przez nią ciepło, które promieniuje w kierunku kosmosu. Globalne ocieplenie ma coraz większy wpływ na życie codzienne, a według obecnych prognoz ma się ono tylko zwiększać. Jego możliwe skutki, jak i przyczyny, są coraz szerzej badane i poznawane. Za jedną z możliwych naturalnych przyczyn wzrastania temperatury powierzchni Ziemi podawało się energię Słońca, która to odpowiedzialna była zarówno za nadejście, jak i zakończenie się epok lodowcowych. I choć niewątpliwie naturalne zjawiska również mają wpływ na zmiany zachodzące na naszej planecie, to nie obserwujemy bezpośredniej korelacji ich ze wzrostem energii słonecznej, a zmiany te są zbyt szybkie, aby to jedynie

Słońce było za nie odpowiedzialne (Rys.1). Przyczyną zmiany klimatu, na którą mamy bezpośredni wpływ, jest na pewno zwiększenie ilości dwutlenku węgla w atmosferze. Jego wzrost powodować oczywiście mogą również procesy naturalne, takie jak oddychanie organizmów czy erupcja wulkanów, jednak od początku rewolucji przemysłowej jego stężenie w atmosferze wzrosło o 47%. W swoim raporcie, składający się z grupy 1300 niezależnych naukowców Międzyrządowy Zespół ds. Zmian Klimatu, stwierdził, że istnieje 95% prawdopodobieństwo, że to właśnie działalność człowieka w ostatnich 50 latach spowodowała ogrzanie się Ziemi.



**Rys. 1.** Wykres przedstawia zmiany w energii Słońca odbieranej przez Ziemię oraz zmiany temperatury jej powierzchni na przestrzeni lat 1880-2020 (<https://climate.nasa.gov/faq/14/is-the-sun-causing-global-warming/>).

Jednym z bardziej interesujących zagadnień, kiedy mowa o ociepleniu klimatu, jest to jak wpłynie ono na nasze życie. To, co będziemy z pewnością zauważać, to zmiana trendów temperaturowych w różnych regionach świata, wilgotności powietrza, czy wzrost poziomu wód w wyniku topnienia lodowców. Podnoszenie się temperatury powierzchni Ziemi wpływa jednak również na inne elementy, które trudniej nam dostrzec. Obserwując zmiany klimatyczne zachodzące na Ziemi, łatwiej określić, jaki mają one wpływ na różne gatunki zwierząt czy roślin, a spadek ich różnorodności szybko nas alarmuje. Jednak to, jak zmienia się populacja mikroorganizmów, zdaje się być sprawą pomijaną w wielu modelach klimatycznych. Ich powszechność i łatwość w namnażaniu się oraz to, że wchodzą one w silne korelacje z innymi organizmami, może jednak sprawić, że to właśnie zmiany w tej grupie organizmów będą przez nas najmocniej odczuwalne. Mogą one mieć duży wpływ na zmiany klimatyczne, zarówno przyspieszający, jak i zwalniający ich tempo. Dlatego temat wpływu mikroorganizmów na klimat i odwrotnie powinien być szeroko badany.

## 2. Opis zagadnienia i przegląd literatury

### 2.1 Mikroorganizmy morskie

W środowisku morskim mikroorganizmy stanowią aż 90% całej biomasy i są jego kluczowym składnikiem, uczestnicząc w wielu łańcuchach pokarmowych. Powierzchnia oceanów i mórz pokrywa większość Ziemi, ok. 70%, można się więc spodziewać, jak znaczący wpływ mają wahania w strukturze tego ekosystemu dla całej planety. Zmiany klimatu przyczyniają się do wzrostu

temperatury, zakwaszenia wód, efektywności dostarczania składników odżywczych oraz powodują nasilanie się ekstremalnych zjawisk pogodowych. Te wszystkie czynniki wywierają wpływ na organizmy zasiedlające wody, w tym na mikroorganizmy, które co prawda mają duże zdolności adaptacyjne, jednak ich przystosowanie się może nie być natychmiastowe i może nieść za sobą zmiany w innych populacjach. Mogą być one zmuszone do migracji, bądź zostaną zastąpione łatwiej przystosowującymi się rodzajami. Wszystkie te zmiany, a w szczególności podwyższony poziom dwutlenku węgla, zazwyczaj działają na organizmy żywe, zaburzając równowagę produkcji związków odżywczych, a także mogą prowadzić do spadku bądź wzrostu ich populacji. W przypadku niektórych mikroorganizmów jest to szczególnie niepokojące. Trend spadkowy w warunkach podwyższonego poziomu dwutlenku węgla zaobserwować można u fitoplanktonu, który to, mimo tego, że stanowi zaledwie 1% globalnej biomasy roślin, odpowiada za produkcję ponad połowy tlenu na Ziemi (Cavicchioli i in. 2019). W przypadku tych organizmów, a zwłaszcza sinic, zaobserwować można również wzrost populacji, jednak zależy on od innego czynnika klimatycznego, a mianowicie wzrostu temperatury. Jesteśmy już w stanie zaobserwować ich coraz częstsze zakwity w zbiornikach wodnych. Kwitnące sinice wytwarzają toksyczne dla ptactwa wodnego i ssaków związki, takie jak neurotoksyny, hepatotoksyny i dermatotoksyny. Zagrażają one zdrowiu i życiu niektórych gatunków zwierząt, a także rekreacyjnemu wykorzystaniu tych zbiorników, pozyskiwaniu wody pitnej czy też wody do użytku w rolnictwie.

### 2.2 Mikroorganizmy lądowe

Całkowita liczba mikroorganizmów w środowiskach lądowych wynosi  $\sim 10^{29}$  i jest podobna do ich zawartości w zbiornikach morskich (Flemming i in. 2019). Znaczną część tych organizmów stanowią te znajdujące się w glebach. Biorą one udział w dostarczaniu niezbędnych dla roślin składników pokarmowych, takich jak azot czy fosfor oraz regulują poziom węgla organicznego magazynowanego w glebach i tego uwalnianego do atmosfery. Różnorodność drobnoustrojów glebowych, z uwagi na spełnianą przez nie rolę, wpływa na różnorodność i ilość roślin porastających Ziemię oraz ich bogactwo w składniki odżywcze. Spadek ilości roślin może wpłynąć natomiast na spadek liczby innych organizmów oraz na przyspieszenie zmian klimatycznych. Do takich efektów doprowadzić może akumulacja dwutlenku węgla w atmosferze, który to naturalnie jest absorbowany przez rośliny w procesie fotosyntezy. Użytkowanie ziem przez człowieka również nie pozostaje bez wpływu na mikroorganizmy. Blisko 40% powierzchni lądowych Ziemi to tereny użytkowane w celach rolniczych (dane Banku Światowego o gruntach rolnych). Przewiduje się tendencje wzrostu tego obszaru. Użytkowanie ziemi w takich celach wpływa na zmiany w obiegu gleb i składników odżywczych, takich jak choćby wspomniany azot czy fosfor. Powoduje to znaczne zmniejszenie się populacji i różnorodności organizmów, w tym mikroorganizmów. Zmniejszenie ich bioróżnorodności na tak obszernej powierzchni ma niewątpliwie wpływ na pozostałą część populacji mikroorganizmów lądowych oraz zachwianie obiegu węgla w przyrodzie.

### 2.3 Wpływ zmian klimatycznych na populację mikroorganizmów

Zmiany klimatyczne powodują zwiększenie temperatury w wodach i na lądach, zmiany w pH środowisk, zwiększa się też ilość gazów cieplarnianych w atmosferze, w tym dwutlenku węgla oraz coraz częściej obserwowane są nagłe zjawiska pogodowe. Wszystko to wpływa na zasiedlający Ziemię mikrobiom. W zmieniających się warunkach muszą się one przystosować, w innym wypadku liczebność ich populacji oraz organizmów od nich zależnych zostanie zachwiana. Mikroorganizmy w wyniku zmian środowiska mogą zmienić swoją aktywność i przyspieszyć, bądź wpłynąć na zwolnienie zmian klimatycznych. Podwyższona temperatura determinuje tempo wzrostu mikroorganizmów. Jednak nie wszystkie są w stanie szybko przystosować się do jej zmian. Grzyby i wirusy zwykle wolniej przystosowują się do zmian temperatury niż bakterie, co może wpłynąć na różnorodność tych mikroorganizmów w środowisku i zbytne rozprzestrzenienie się tych szybciej przystosowujących się. W wyniku podnoszenia się temperatury zmienia się aktywność mikroorganizmów i tutaj większość modeli klimatycznych przewiduje pozytywne sprzężenie zwrotne i zwiększenie oddychania mikrobiomu, jednak jest to zależne od ekosystemu i nie wszystkie z nich reagują w ten sposób. Konsekwencją podwyższenia temperatury jest częstsze występowanie susz i zwiększenie się obszarów pustyń i terenów suchych. W takich glebach spada ilość magazynowanej

wody, a w wyniku tego zmniejsza się również aktywność mikroorganizmów i akumulowanego przez nie dwutlenku węgla. Takie mikroorganizmy stają się mniej stabilne, może zmniejszyć się ich różnorodność i ilość. Nagłe zjawiska pogodowe, takie jak ulewne deszcze i powódzie, również wywierają wpływ na mikroorganizmy i mogą one doprowadzić do rozprzestrzeniania się niektórych z nich. Zalewanie większych obszarów powoduje łączenie się środowisk wodnych i lądowych, wpływając na różnorodność mikrobiomu. Mikroorganizmy i ich reakcja na zmiany klimatu może stać się ważnym czynnikiem, który wpłynie na szybkość tych przemian. Niektóre środowiska, takie jak torfowiska, które aktualnie pochłaniają dwutlenek węgla, a wyniku zachodzących zmian mogą zacząć oddawać go do atmosfery, odegrają ważną rolę w przyspieszaniu bądź zahamowaniu tych zmian.

### 2.4 Wpływ zmian klimatycznych na mikroorganizmy patogenne

Obserwując zmiany zachodzące w populacjach mikroorganizmów, nie możemy pominąć mikroorganizmów patogennych. Ich zbyt ni wzrost może być bezpośrednim zagrożeniem dla organizmów, które są w stanie zainfekować między innymi człowieka i spowodować rozprzestrzenianie się chorób zakaźnych. Wzrost temperatury, nagłe zjawiska pogodowe, w tym fale upałów, susze i powódzie oraz związana ze zmianami klimatu migracja ludności doprowadzają do sytuacji, w której mikroorganizmy patogenne oraz wektory je przenoszące są w stanie rozprzestrzeniać się na inne niż dotąd przez nie zasiedlane obszary i mogą pojawiać się tam nowe infekcje. Stanowi to poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Już teraz obserwujemy pojawienie się wcześniej niewystępujących na terenie Europy zakażeń, bądź gwałtowny wzrost zakażeń jak dotąd sporadycznie występującymi chorobami wywołanymi przez pewne patogeny. Wzrost zakażeń na terenie Europy obserwujemy np. w przypadku flawiwirusów wywołujących kleszczowe zapalenie mózgu (KZM) oraz wirusa gorączki Zachodniego Nilu (WNV). W tych obu przypadkach mamy do czynienia z większą ekspansją wektorów powodujących zakażenie. W przypadku KZM jest to zwiększenie się populacji kleszcza w Europie i powodowany tym wzrost zakażeń wirusem wśród ludzi oraz pojawienie się zachorowań w regionach, w których wcześniej zakażenia nie występowały/występowały sporadycznie. WNV jest wirusem przenoszonym przez komary i przywleczonym do Europy w II połowie XX wieku. Z uwagi na wzrost temperatury, przenoszące go komary są aktywne na większych obszarach. Wirus ten powoduje zachorowania głównie u koni i ptaków. Jednak od 2018 roku obserwuje się wzrost zachorowań również u ludzi, z największym przyrostem w Bułgarii, Francji i we Włoszech. W 2018 roku na terenie Europy na WNV zachorowało więcej ludzi niż na tym samym obszarze podczas 7 wcześniejszych lat (Pancer 2020). Inną chorobą wywołaną przez flawiwirusy, na którą zachorowalność w ostatnich latach na Świecie rośnie, jest denga. Choroba ta przenoszona jest również przez wektory, a dokładniej komary *Aedes aegypti* i *Aedes albopictus*. W ciągu ostatnich 50 lat zachorowalność na tę chorobę rośnie, a w latach 2005-2015 śmiertelność z jej powodu na świecie wzrosła o prawie 50% (Wang i in. 2016). Jest to związane ze wzrostem temperatury, pozwalającym wektorom dengi, które to szczyt swojej aktywności uzyskują przy 29°C (Liu-Helmersson i in. 2014), na aktywność na większym obszarze. Zwiększoną zachorowalność można zaobserwować również w przypadku chorób powodowanych przez bakterie. Taką chorobą jest np. borelioza wywoływana przez krętki, głównie *Borrelia burgdorferi* i *Borrelia afzeli*, przenoszona na ludzi przez wektory, a dokładniej kleszcze *Ixodes*. Zapadalności na tę chorobę w Polsce wzrosła w ostatnich latach z poziomu ok. 10/100 tys. w 2004 r. do 56/100 tys. w 2017 r. (Fiecek 2020). Wzrost zapadalności na boreliozę związany jest z rozprzestrzenianiem się geograficznym i powiększaniem się populacji przenoszącego ją wektora, a warunkowane jest to przez wzrost temperatury. Coraz rzadsze występowanie niskich temperatur zimą nie reguluje liczebności kleszczy, a co za tym idzie, okres ich aktywności znacząco się wydłuża.

Zmiany klimatu warunkują również rozprzestrzenianie się drobnoustrojów, które nie przenoszą się za pośrednictwem wektorów. W ostatnich latach obserwujemy rozszerzenie się zasięgu występowania oraz zwiększoną ilość zakażeń przecinkowcami *Vibrio*. W wodach Bałtyku występują przecinkowce powodujące wibriozy, objawiające się jako nieżyty przewodu pokarmowego, zakażenia ran, ucha, czy spojówek oczu. Są to nietoksynotwórcze *V. cholerae*, *V. vulnificus* i *V. parahaemolyticus*. Problem wzrostu zakażeń tymi bakteriami dotyka wszystkich krajów Europejskich, a szczególnie tych okołobałtyckich. Z uwagi na to, że nie ma obowiązku zgłaszania

przypadków zachorowań nimi powodowanych, nie jest znana dokładna skala problemu. Jednak w ciepłe lata notowany jest znaczny wzrost przypadków zakażeń tymi patogenami. Badania próbek wody z Morza Bałtyckiego pobranych z polskich wód przybrzeżnych w okresie od czerwca do września 2019 roku, wykazały mniej więcej stałą obecność w nich przecinkowców należących do opisanych grup. Szczególnie licznie występowały one w ciepłych wodach Zatoki Gdańskiej (Wołkowicz i in. 2020). Oprócz znanych nam już mikroorganizmów, których wzrost populacji obserwujemy, bądź jesteśmy w stanie obserwować jeśli takowy się pojawi, zmiany klimatu powodują zagrożenie nowymi patogenami, jak dotąd niezagrażającymi człowiekowi. Podwyższenie się temperatur będzie zmuszać organizmy, takie jak grzyby czy wirusy, do przystosowania się do nich, powodując w efekcie przystosowanie się do temperatury panującej w ciele człowieka i umożliwiając zakażenie. Zagrożeniem stają się również mikroorganizmy, które zostały zamrożone w aktualnie topniejącej wiecznej zmarzlinie.

### **3. Dyskusja i wnioski**

Zmiany klimatyczne stanowią niewątpliwie wyzwanie obecnych czasów. Wiele prac podejmuje temat, w jaki sposób te zmiany mogą wpłynąć na nasze codzienne życie, a prognozy raczej nie są optymistyczne. Coraz bardziej podnosi się temperatura Ziemi, lodowce i wieczna zmarzlina topnieją, pojawiają się częstsze i bardziej dynamiczne zjawiska pogodowe, a okresy suszy przeplatane przez ulewne deszcze coraz bardziej nas dotykają i wpływają na zubożenie plonów. Jednak bardzo ważna w zachodzących zmianach jest reakcja mikroorganizmów i to jak przystosują się one do nowego środowiska. Z uwagi na rolę, jaką mikroorganizmy odgrywają w światowym obiegu węgla i emisji gazów cieplarnianych, potrzeba badań mówiących o tym, czy w pewnym momencie nie zaczną one oddawać większej ilości tych gazów do atmosfery. Równowaga między wychwytywaniem, a produkcją przez mikroorganizmy gazów cieplarnianych może zostać łatwo zachwiana przez działania człowieka i zmiany klimatu. Byłby to niewątpliwie czynnik nadający zmianom klimatu szybsze tempo, a wiemy już, że w niektórych środowiskach taka reakcja była obserwowana. Potrzebne są w tym temacie dokładniejsze badania laboratoryjne działania stresorów na mikroorganizmy oraz badania terenowe, które pozwolą śledzić zmiany zachodzące w populacjach. Dzięki takim badaniom będziemy w stanie lepiej przewidywać scenariusze nadchodzących zmian. Kolejnym z zagrożeń, jakie płynie z narastających zmian klimatycznych, jest możliwa coraz szybsza transmisja czynników zakaźnych. Wektory, jaki i same drobnoustroje patogenne, zyskały odpowiednie środowisko do szybszego namnażania się i stanowią zagrożenie dla zdrowia publicznego. W obecnej sytuacji potrzeba nam systemów, które pozwolą szybciej wyłapywać zarówno niekontrolowany wzrost znanych, jak i pojawienie się jak dotąd nieznanymi mikroorganizmów zakaźnych dla człowieka. Brak szybkiej reakcji na czynniki zakaźne może doprowadzać do sytuacji globalnego rozprzestrzenienia się szkodliwego drobnoustroju, tak jak choćby w przypadku obecnie trwającej pandemii COVID-19. Zmiany klimatu jakie zachodzą w naszym otoczeniu, stawiają nas przed nowymi wyzwaniami. Przyjęty przez społeczeństwo styl życia niewątpliwie ulegnie zmianie, jeśli nie w wyniku działań kierowanych przez rozsądek i zmierzających do zahamowania zmian klimatu, to właśnie w wyniku jego zmian i narastającej intensywności zjawisk przyrodniczych i ich destrukcyjnej sile.

### **4. Literatura**

- Cavicchioli R, Ripple WJ, Timmis KN i in. (2019) Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat Rev Microbiol.* 9: 569-586.
- Fiecek B (2020) Skutki ocieplania się klimatu – czy zagrożenie chorobami przenoszonymi przez kleszcze będzie wzrastać? Konferencja online Klimat a zdrowie, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-PZH 29.09.2020.
- Flemming HC, Wuertz S. (2019) Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 17: 247–260.
- Hales S, Kovats S, Lloyd S i in. (2014) Quantitative risk assessment of the effects of climate change on selected causes of death, 2030s and 2050s. Geneva: World Health Organization, 1–128.

- Janet K, Jansson S, Kirsten S i in. (2020) Soil microbiomes and climate change. *Nature Reviews Microbiology* 18: 35–46.
- Koven CD, Hugelius G, Lawrence DM i in. (2017) Higher climatological temperature sensitivity of soil carbon in cold than warm climates. *Nat. Clim. Change*. 7: 817–822.
- Kubasiak G, Michno A, Gorczyca E (2020). Antropocen - wpływ zmian klimatu na środowisko przyrodnicze i gospodarkę człowieka. Repozytorium Uniwersytetu Jagiellońskiego (RUJ), <https://ruj.uj.edu.pl/xmlui/handle/item/241094>.
- Liu-Helmersson J, Stenlund H, Wilder-Smith A i in. (2014) Vectorial capacity of *Aedes aegypti*: Effects of temperature and implications for global dengue epidemic potential. *PLoS One*. 9: 3
- Pancer K (2020) Aktualna sytuacja epidemiologiczna zakażeń wywołanych przez flawiwirusy: WNV i KZM. Występowanie wirusów KZM w kleszczach w Polsce. Konferencja online Klimat a zdrowie, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-PZH 29.09.2020.
- Sarah J, Scott A (2020) The effects of climate change on infectious diseases with cutaneous manifestations. *Int J Womens Dermatol* doi: 10.1016/j.ijwd.2020.07.005.
- Wang H, Naghavi M, Allen C i in. (2016) Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 388(10053): 1459–1544.
- Wołkowicz T, Piekarska K, Zacharczuk K i in. (2020) Występowanie przecinkowców *Vibrio* sp. w wodach przybrzeżnych polskiej części Bałtyku w następstwie wzrostu temperatury wody: nowy czynnik ryzyka zakażeń u osób z niedoborami odporności. Konferencja online Klimat a zdrowie, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-PZH 29.09.2020.
- Yinon M, Phillips R, Milo R (2018) The biomass distribution on Earth. *National Academy of Sciences* 115 (25): 6506-6511.

## 12. Zanieczyszczenie środowiska estrogenami

Environmental pollution by estrogenic compounds

Marta Wiejak<sup>(1,2)</sup>, Ewa Adamek<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>(2)</sup> Młoda Farmacja Sosnowiec

<sup>(3)</sup> Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Ewa Adamek

Marta Wiejak: mwiejak3@gmail.com

**Słowa kluczowe:** estrogeny, środowisko, zanieczyszczenie, feminizacja ryb

### Streszczenie

żeńskie hormony płciowe, czyli estrogeny to związki, które działają na układ hormonalny. Ich obecność w środowisku (np. w wodach powierzchniowych) stanowi poważny problem, ponieważ negatywnie oddziałują na organizmy zamieszkujące akwenty wodne. Są to związki trwałe, trudnobiodegradowalne a ze względu na swoje właściwości fizyko-chemiczne (m.in. lipofilowość), łatwo ulegające sorpcji na osadach dennych.

Celem pracy jest charakterystyka estrogenów, drogi jakimi trafiają do środowiska, efektywność ich usuwania podczas procesów oczyszczania ścieków oraz wpływ na organizmy. W pracy wykorzystano najnowsze publikacje opisujące temat. Przegląd publikacji został wykonany w oparciu o dostępne elektroniczne bazy medyczne. Przedstawiona praca ma charakter poglądowy.

### 1. Wstęp

Jednym z najprężniej rozwijających się gałęzi światowego przemysłu jest rynek farmaceutyczny. Rozwój ten jest oparty, m.in. na rosnącym popycie na farmaceutyki (Hrydziuszko 2017). W rezultacie, ilość substancji stosowanych przez pacjentów w powszechnym użytku stale zwiększa się. Polska jest krajem, w którym sprzedaż leków w ostatnich kilkunastu latach sukcesywnie wzrasta. Na tle Europy, polski rynek farmaceutyczny zajmuje 6. miejsce pod względem zbytu leków (Roguska i Feliksaik 2010). Istnieje proporcjonalna zależność między wzrostem ilości stosowanych farmaceutyków a wzrostem ilości zanieczyszczeń środowiskowych powodowanych przez związki oraz produkty powstałe w procesach ich rozkładu (Szymonik i Lach 2012). Spośród powszechnie użytkowanych leków część nie ulega metabolizmowi w organizmie i tym samym są wydalane w formie niezmienionej lub tylko nieznacznie zmienionej jako polarne cząsteczki (Kot-Wasik i in. 2003). Praktycznie we wszystkich próbkach pobieranych ze środowiska wodnego obecne są leki należące do różnych grup:  $\beta$  – blokery, niesteroidowe leki przeciwbólowe, antybiotyki, naturalne i syntetyczne estrogeny oraz neuroleptyki.

Do parametrów pozwalających ocenić czy dany związek może stanowić zagrożenie dla środowiska zalicza się jego trwałość, toksyczność oraz podatność na biodegradację, czyli rozkład przez mikroorganizmy środowiskowe. W raporcie Szwedzkiej Agencji Produktów Medycznych na temat skutków obecności farmaceutyków w środowisku (Läkemedelsverket 2004), 30 farmaceutycznie aktywnych związków zostało sklasyfikowanych pod kątem ich toksyczności dla organizmów wodnych (Tab.1).

Dane zawarte w Tab. 1 wskazują, że estrogeny mogą być zaliczane, wraz z m.in. antybiotykami, do szczególnie niebezpiecznych substancji dla środowiska naturalnego.

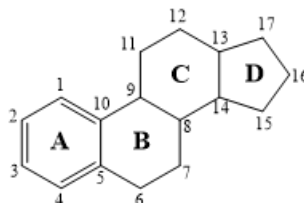
Tab.1. Klasyfikacja środowiskowa farmaceutyków.

SUBSTANCJA	TOKSYCZNOŚĆ	BIOAKUMULACJA	TRWAŁOŚĆ	KLASYFIKACJA
<b>Etynyloestradiol</b>	Toksyczny dla organizmów wodnych	Potencjalna bioakumulacja	Niełatwo ulegający biodegradacji	Niebezpieczny dla środowiska
<b>Noretysteron</b>	Bardzo toksyczny dla organizmów wodnych	Nieulegający bioakumulacji	Niełatwo ulegający biodegradacji	Niebezpieczny dla środowiska
<b>Estradiol</b>	Nietoksyczny	Potencjalna bioakumulacja	Brak jednoznacznych danych	Brak informacji
<b>Estriol</b>	Brak danych	Nieulegający bioakumulacji	Brak danych	Brak informacji

## 2. Estrogeny –ogólne informacje

Wśród hormonów produkowanych przez organizmy żywe w tym organizm człowieka estrogeny zajmują szczególne miejsce. Te żeńskie hormony płciowe są niezbędne do tego, aby narządy rodne kobiet rozwijały się i funkcjonowały prawidłowo. Charakteryzują się wysoką aktywnością biologiczną (endokrynną), a ich działanie obserwuje się już przy bardzo niskich stężeniach.

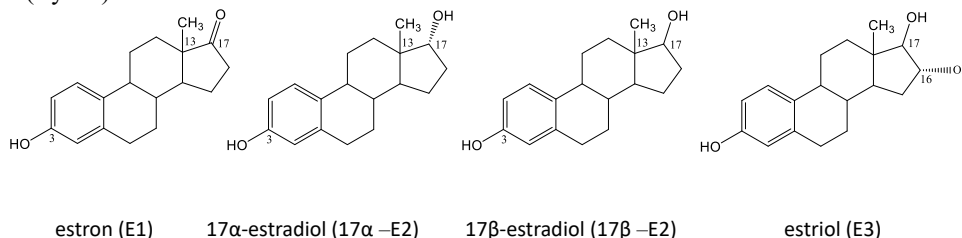
Wszystkie estrogeny swoją budową wywodzą się od struktury steranu (Rys.1.). Oznacza to, że posiadają charakterystyczny szkielet, w którego skład wchodzi cztery pierścienie: jeden benzenowy (pierścień A), dwa cykloheksanowe (pierścienie B i C) oraz jeden cyklopentanowy (pierścień D) (Kumirska i in. 2012).



Rys.1. Struktura steranu.

Ze względu na różnice strukturalne w pierścieniu D możemy wyróżnić:

- estron (E1), który zawiera grupę karbonylową w pozycji C17,
- estriol (E3), posiadający dwie grupy alkoholowe przy C16 i C17 oraz
- 17-estradiol (E2), zawierający dodatkową grupę hydroksylową przy C17. Ze względu na orientację (konformację) przestrzenną tej grupy, istnieją dwie formy tego związku:  $\alpha$  i  $\beta$ . (Rys.2.)



Rys.2. Wzory strukturalne naturalnych estrogenów.

Estrogeny przede wszystkim odpowiadają za kontrolę cyklu rozrodczego, prawidłowego przebiegu ciąży i uwytłumienie drugorzędowych cech płciowych u kobiet a ponadto wpływają na



dobrą kondycję skóry kości, układu sercowo-naczyniowego, przyspieszenie metabolizmu, zwiększenie stężenia tzw. „dobrego” cholesterolu, oraz zapobiegają osteoporozie poprzez wspomaganie mineralizacji kości. U mężczyzn, estrogeny regulują popęd płciowy i wspomagają dojrzewanie plemników. Kobiety produkują większe ilości hormonów estrogenowych niż mężczyźni, przy czym ilość ta nie jest stała i zmienia się w zależności od tego w jakim okresie życia jest kobieta. Największa produkcja estrogenów ma miejsce w czasie ciąży a najmniejsza - w okresie pomenopauzalnym (Tapiero i in. 2002). Szacuje się, że organizm kobiet w ciąży produkuje prawie 120 razy więcej  $17\beta$ -E2 niż organizm kobiet w czasie menopauzy. Średnie dzienne wydalanie estrogenów z moczem kobiet miesiączkujących wynosi 4,8  $\mu\text{g}$  E3, 8,0  $\mu\text{g}$  E1 i 3,5  $\mu\text{g}$  E2, natomiast średnie dzienne wydalanie tych związków przez kobiety w ciąży wynosi: 6000  $\mu\text{g}$  E3, 600  $\mu\text{g}$  E1 oraz 259  $\mu\text{g}$  E2. Średnie wydalanie E1, E2 i E3 z moczem przez kobiety po menopauzie wynosi ok. 7  $\mu\text{g}$ /dzień i odpowiada średniemu wydalaniu estrogenów przez dorosłych mężczyzn. U kobiet w okresie rozrodczym, największą aktywność posiada  $17\beta$ -E2. Około 5-krotnie mniejszą aktywność ma E1, który jest głównym estrogenem w okresie pomenopauzalnym. Najśłabsze działanie endokrynne ze wszystkich estrogenów posiada E3. Za wydzielenie estrogenów u kobiet odpowiedzialne są kora nadnerczy, jajniki i łożysko (Adeel i in. 2017). W organizmie mężczyzn głównym źródłem estrogenów a dokładniej E2 jest przemiana testosteronu w jądrach.

Estrogeny są pochodnymi cholesterolu więc podobnie jak on są metabolizowane w wątrobie. Wymiana grupy -OH na =O prowadzi do przemiany E2 w E1, który w wyniku dalszych przemian przekształca się w E3. W wyniku estryfikacji powstają glukuronowe i siarczanowe pochodne, które są wydalane z organizmu z żółcią, kałem lub moczem.

Wymienione estrogeny, wraz z produkowanym jedynie w czasie trwania ciąży E3, stanowią grupę naturalnych estrogenów (Kumirska i in. 2012). Oprócz nich istnieje wiele syntetycznych odpowiedników, które charakteryzują się znacznie słabszym działaniem niż naturalne hormony. Wyjątkiem są niektóre składniki preparatów farmaceutycznych, m.in. etynyloestradiol (EE) i dietylostilbestrol (DES) (Tapiero i in. 2002). Pierwszy z nich hamuje w organizmie syntezę naturalnych estrogenów i dzięki tym właściwościom jest składnikiem tabletek antykoncepcyjnych. Drugi z wymienionych podawany jest kobietom m.in. w celu podtrzymania ciąży. Istnieje też grupa fitohormonów, czyli związków pochodzenia roślinnego, które również są endokrynnie czynne. Zalicza się niej ponad 100 różnych substancji, które na podstawie struktury chemicznej dzieli się m.in. na flawony, izoflawony, lignany i dipertenoidy.

## 2.1 Właściwości fizykochemiczne estrogenów

Znając właściwości fizykochemiczne estrogenów można przewidzieć w jakich elementach środowiska będą się one kumulować. Estrogeny mają właściwości lipofilowe a więc wykazują tendencję do gromadzenia się zwłaszcza w tkance tłuszczowej ludzi i zwierząt oraz łatwo pokonują barierę krew-mózg (Tapiero i in. 2002). Dzięki obecności pierścienia A z grupą -OH, wykazują właściwości słabych kwasów. Są to związki słabo rozpuszczalne w wodzie, przy czym estrogeny naturalne są lepiej rozpuszczalne od syntetycznych (Dudziak, Bodzek 2005). W środowisku obojętnym najsłabiej rozpuszczalny jest EE (zawierający w swej strukturze dodatkowe grupy etynylenowe), lepiej –  $17$ -E2 a najlepiej – E1. W środowisku zasadowym (pH=10) rozpuszczalność wszystkich estrogenów jest większa. Parametrem, który wskazuje na zdolność do kumulacji związku, a właściwie na tendencję do rozpuszczania w wodzie w porównaniu do rozpuszczalności w n-oktanolu jest współczynnik podziału oktanol-woda (Kow). Im większa jest jego wartość parametru to tym większą zdolność do sorpcji na materiale stałym (osadzie) wykazuje badany związek. W przypadku naturalnych estrogenów, wartości log Kow są wysokie. Najwyższą wartością log Kow wynoszącą 4,01 cechuje się E2, a więc gdy związek ten trafi do środowiska to najprawdopodobniej będzie kumulować się na osadach i koloidach organicznych występujących w wodach powierzchniowych (Adeel i in. 2017). W warunkach aerobowych, okres półtrwania  $17\beta$ -E2 i E1 w wodzie wynosi odpowiednio 1,8 i 3,0 dni. EE jest bardziej trwały niż naturalne estrogeny zarówno w wodzie, jak i osadach a jego okres półtrwania wynosi 17 dni i jest 10-krotnie dłuższy niż E2 w tych samych warunkach.

### 3. Występowanie estrogenów w środowisku

Szacuje się, że cała światowa populacja ludzi, a więc ponad 7,5 miliarda osób corocznie uwalnia do środowiska około 30 000 kg naturalnych estrogenów oraz około 700 kg estrogenów syntetycznych, stosowanych głównie jako antykoncepcja hormonalna (Adeel i in. 2017).

Praktycznie wszystkie leki stosowane w medycynie i weterynarii mogą przedostać się do środowiska naturalnego (Rydzyski 2016). Mogą w nim występować w postaci niezmetabolizowanej lub w postaci tzw. metabolitów I bądź II fazy (Czech. 2012). Około 65% doustnie podanego E2 lub E1 jest wydalane z moczem a około 15% - z kałem. Hormonalne środki antykoncepcyjne (tabletki antykoncepcyjne) zawierają EE, który wydalany jest głównie w postaci sprzężonych siarczanów (80%).

Prawdopodobnie największym źródłem estrogenów w środowisku są wydaliny i odchody zwierzęce. Szacuje się, że hodowla zwierząt gospodarskich na masową skalę przyczynia się do emisji ponad dwukrotnie wyższej ilości estrogenów w porównaniu do ilości tych związków pochodzących z medycyny (83 000 kg/rok). Przykładowo, hormony estrogenowe są stosowane na szeroką skalę w przemyśle mleczarskim w celu zwiększenia tempa i efektywności wzrostu bydła oraz obecność u zwierząt masy mięśniowej pozbawionej tłuszczu (Adeel i in. 2017). Wg Andaluri i in. (2011) stężenie  $17\alpha$ -E2,  $17\beta$ -E2 i E1 w nawozach wynosi od 6 do 462 ng/g suchej masy. Biomasa ze zwierzęcego obornika jest często stosowana jako alternatywne źródło składników odżywczych w rolnictwie ekologicznym, czyli tzw. "nawóz naturalny". W takim przypadku, estrogeny i inne farmaceutyki obecne w odchodach zwierząt gospodarskich, mogą być z nich wymywane, wraz z opadami atmosferycznymi. W rezultacie, związki te trafiają do wód gruntowych skąd przedostają się do wód powierzchniowych. Rezerwuarem estrogenów są oczyszczalnie ścieków miejskich do których trafiają ścieki komunalne zawierające estrogeny i ich metabolity.  $17\beta$ -E2, E1 i E3 występują w ściekach w stężeniu, odpowiednio,  $<0,1-88$  ng/l,  $<0,1-220$  ng/l i  $<0,1-42$  ng/l. Syntetyczny EE obecny jest w ściekach na poziomie  $<0,053-62$  ng/l. W wodach powierzchniowych stężenia estrogenów są niższe niż w ściekach i wynoszą 0,05- 15 ng  $17\beta$ -E2/l,  $<0,1-17$  ng E1/l,  $<0,1-3,4$  ng E3/l oraz  $<0,053 - 30,8$  ng EE/l.

#### 3.1 Degradacja środowiskowa estrogenów

Warunki środowiskowe są czynnikiem, który w istotny sposób wpływa na szybkość rozkładu substancji w środowisku. Rozkład związków organicznych w środowisku bez udziału mikroorganizmów środowiskowych przebiega na drodze przemian fizycznych, chemicznych lub fotochemicznych. Przy ograniczonym dostępie tlenu, stopień degradacji estrogenów w środowisku jest niewielki. Niektóre z estrogenów, jak np. E2 i EE, ulegają degradacji pod wpływem promieniowania słonecznego (Adeel i in. 2017). Efektywność takiej reakcji zależy głównie od natężenia promieniowania, a więc od szerokości geograficznej, pory dnia i roku, zachmurzenia, lecz również od warunków eutroficznych, w tym od zawartości i rodzaju rozpuszczonej materii organicznej. Przykładowo, ze względu na ograniczoną dostępność światła słonecznego, procesy degradacji zachodzą wyłącznie w powierzchniowej warstwie gleby (do około 1 mm) natomiast w wodach powierzchniowych – do głębokości około 2 metrów. Z intensywnością promieniowania wiąże się temperatura. Przyjmuje się, że wzrost temperatury sprzyja zwiększeniu szybkości reakcji. Tym samym, procesy degradacji w sferze klimatycznej gorącej są znacznie intensywniejsze niż w strefie umiarkowanej i chłodnej. Najpowszechniejszym procesem odpowiedzialnym za abiotyczną degradację związków organicznych w środowisku jest hydroliza. W trakcie tej reakcji dochodzi do wymiany labilnej grupy obecnej w organicznym substracie na grupę -OH, dzięki czemu zwiększa się jego rozpuszczalność.

W rozkładzie związków organicznych w środowisku naturalnym uczestniczą też drobnoustroje a proces ten może przebiegać zarówno w warunkach beztlenowych (anaerobowych) jak i tlenowych (aerobowych). Dla mikroorganizmów zasiedlających wody i gleby, substraty organiczne stanowią źródło węgla, azotu i energii. Podatność związków organicznych na biodegradację zależy od ich struktury cząsteczkowej. Obecność licznych pierścieni, jak w przypadku estrogenów, oraz krótkich łańcuchów bocznych utrudnia lub nawet uniemożliwia rozkład tych związków przez drobnoustroje środowiskowe. Z tego powodu, estrogeny zalicza się do związków

trudnobiodegradowalnych. Ponadto estrogeny wykazują właściwości lipofilowe co oznacza, że w oczyszczalniach ścieków nie ulegają biodegradacji a jedynie sorpcji na kłaczkach osadu czynnego. Ponieważ rozkład zanieczyszczeń metodą biologiczną (osadu czynnego) jest dominującą metodą oczyszczania ścieków w oczyszczalniach, to niepełne usunięcie estrogenów wpływa na ich pojawienie się w środowisku wraz ze ściekami oczyszczonymi, które są odprowadzane do wód powierzchniowych.

#### **4. Skutki obecności estrogenów w środowisku**

Narażenie organizmów na kontakt (często długotrwały) z estrogenami może przyczynić się do wystąpienia różnych negatywnych skutków. Należy pamiętać, że działanie estrogenów nie ogranicza się wyłącznie do układu płciowego, ponieważ wpływają też na tkankę kostną, układ krwionośny, nerwy i limfatyczny.

Organizmy bytujące w środowisku wodnym są szczególnie wrażliwe na zanieczyszczenia estrogenami pochodzącymi z różnych źródeł. W ostatnich kilkudziesięciu latach zaobserwowano feminizację samców ryb słodkowodnych, jak i morskich, w wielu krajach europejskich oraz w USA i Japonii. Większość przypadków dotyczyła dzikich populacji ryb słodkowodnych: płoci, kiełbi, karpia, leszczy, kleni i pstrągów potokowych. Kontrolowane eksperymenty potwierdziły, że czynnikami sprawczymi tych zaburzeń były estrogeny. Feminizacja samców ryb objawia się, m.in indukcją wytwarzania witellogeniny w wątrobie, zmniejszonym wzrostem gonad, feminizacją męskich gonad i obniżeniem zdolności reprodukcyjnych poprzez produkowanie mniejszej ilości plemników, a także zmienionymi proporcjami płci. Feminizację stwierdzono w różnym stopniu u poszczególnych ryb, od łagodnych zmian po bardzo poważne zaburzenia męskiego układu rozrodczego. W populacji wielu gatunków jesiotra rozprzestrzenia się zjawisko występowaniem interseksualności (anormalnej postaci hermafrodytyzmu) - w jądrach samców obecne są wczesne stadia komórek jajowych a u niektórych osobników rozwija się przewód prowadzący jaja do jajowodu. Najwięcej osobników obojnaczych było w rzekach Delaware i Cooper (jesiotr krótkonosy) oraz Missisipi (łopatonos biały), na terenie Stanów Zjednoczonych. Z powodu opóźnienia w rozwoju męskich komórek rozrodczych zaobserwowano asynchronię w rozwoju komórek rozrodczych u samców i samic. Tylko 50% samców było zdolnych do tarła a u innych występowała zmniejszona objętość mleczu oraz zmniejszona gęstość i ruchliwość plemników. Wskazuje to na obniżoną płodność u silnie interseksualnych osobników męskich. Istnieją również badania które wykazały, że przez ekspozycję na estrogeny zdolności reprodukcyjne samic mogą zostać zmniejszone. Skutkiem zaburzenia normalnego cyklu dojrzewania komórek jajowych było zmniejszenie liczby jaj.

Z uwagi na obecność zaburzeń reprodukcyjnych populacji ryb, przeprowadzono szereg eksperymentów z kontrolowaną ekspozycją na estrogeny w celu ustalenia najniższego stężenia niezbędnego do uzyskania tych zmian. 17 $\beta$ -E2 indukował produkcję białka żółtka przy stężeniu 5 ng/l i wywoływał interseksualność przy 10 ng/l. Przy stężeniu od 10 do 50 ng 17 $\beta$ -E2/l dochodziło do hamowania rozwoju męskich komórek rozrodczych, a ponadto zaobserwowano obecność licznych zdegenerowanych komórek płciowych. Podobną lub nieco niższą aktywność estrogenową wykazał E1. Indukcję witellogeniny i pojawienie się interseksualności u samców zaobserwowano przy stężeniach, odpowiednio, 30 i 10 ng E1/l. Najsłabsze działanie estrogenne spośród trzech naturalnych estrogenów wykazywał E3. W warunkach *in vitro* był 30 razy słabszy niż E2 a w odniesieniu do indukcji interseksualności *in vivo* był około 100 razy słabszy. Pod względem wywoływania zaburzeń w męskim układzie rozrodczym EE okazał się silniejszy niż naturalne estrogeny. Indukcja witellogeniny i wystąpienie interseksualności u samców ryb obserwowano przy stężeniu 0,1 ng EE/l. Stężenie 0,6 ng EE/l wpłynęło na zmianę proporcji płci a szereg innych efektów rozrodczych, w tym hamowanie prawidłowego rozwoju plemników, zaobserwowano przy stężeniach poniżej 10 ng/l.

Różne gatunki ryb wykazują różną wrażliwość na estrogeny, przy czym u wszystkich osobników za najbardziej wrażliwe uważane są wczesne etapy życia, gdy następuje rozwój płci. Istnieją jednak również badania, które wykazały, że sukces reprodukcyjny samic może zostać zmniejszony przez ekspozycję na estrogen, tj. Poprzez zmniejszenie liczby jaj. Wydaje się, że dzieje się to poprzez zaburzenie normalnego dojrzewania komórek jajowych. Ponadto, okresowa ekspozycja organizmów wodnych na wysokie stężenie estrogenów skutkuje liczniejszymi i bardziej

niepożądanymi efektami niż ciągła ekspozycja na niższe stężenie a więc nawet krótkotrwałe uwalnianie do środowiska wysokich stężeń estrogenów i/lub związków estrogenowych może spowodować zmniejszenie płodności ryb. Obecność EE w ściekach prowadzi do zmniejszenia biomasy ryb i negatywnie wpływa także na inne organizmy zamieszkujące środowisko wodne. Stwierdzono, m.in. liczne zaburzenia czynności serca kijanek żaby ryczącej (Adeel i in. 2017).

W niektórych eksperymentach, stężenia E2, E1 i EE były wystarczająco wysokie aby wyjaśnić pojawienie się feminizacji samców ryb. W innych niepożądane efekty występowały nawet wówczas gdy stosowano stężenie poniżej najniższego, które mogło spowodować omawiane zaburzenia u osobników męskich. Jednak oceniając wpływ estrogenów na zdolności reprodukcyjne samców ryb należy pamiętać, że działanie tych związków w środowisku wodnym będzie addytywne. Dlatego stężenie pojedynczego estrogenu, który oddziałuje na osobniki męskie, będzie niższe, gdy będzie on obecny w mieszaninie estrogenów i ksenoestrogenów.

Omawiając temat niniejszej pracy warto również wspomnieć o fitoestrogenach a szczególnie o izoflawonach. Zaobserwowano, że u owiec wypasanych na łąkach bogatych w koniczynę i zawierającą wysokie stężenie fitoestrogenów, rozwija się trwała bezpłodność. Z kolei Newbold R. i in. zaobserwowali, że podawanie niemowlętom preparatów sojowych zawierających fitoestrogeny wpływa na ich otyłość w późniejszym wieku.

Z uwagi na ograniczenia, nie omówiono w pracy związków endokrynnie czynnych, w tym pestycydów i bisfenolu.

### **5. Wnioski**

Estrogeny stanowią ważną grupę hormonów produkowanych przez organizmy zwierząt w tym przez ludzi. Do naturalnie występujących estrogenów zalicza się estron, estradiol oraz estriol. Poza nim istnieje wiele syntetycznych odmian estrogenów oraz inne substancje wykazujące działania na układ hormonalny m.in. fitoestrogeny. Mimo wielu pozytywnych działań jakie powodują estrogeny, stanowią poważne zagrożenie dla środowiska naturalnego - szczególnie dla organizmów wodnych. Szkodliwe działanie estrogenów i ich pochodnych wynika zarówno z ich aktywności biologicznej, własności fizykochemicznych jak też odporności na biodegradację w środowisku. Największym źródłem estrogenów w środowisku są wydaliny i odchody zwierząt zwłaszcza z farm hodowlanych oraz ścieki komunalne i szpitalne. Powszechnym skutkiem obecności estrogenów w ściekach oczyszczonych i w wodach powierzchniowych rzek jest głównie feminizacja samców i wzrost liczby osobników obojnaczych w populacji ryb. Istotnym problemem jest fakt, że nawet krótkotrwałe uwalnianie do środowiska wysokich stężeń estrogenów i/lub związków estrogenowych może spowodować zmniejszenie płodności ryb. Ponadto działanie estrogenów jest addytywne i niepożądane efekty pojawiają się nawet wówczas gdy stężenie każdego z omawianych związków w środowisku wodnym jest niższe niż to, które może przyczynić się do pojawienia zaburzenia u osobników męskich.

### **6. Literatura**

- Adeel M, Song X, Wang Y, i in. (2017) "Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review" *Environment International*, 99, 107–119
- Andaluri, G., Suri R.P.S., Kumar, K. (2011). "Occurrence of estrogen hormones in biosolids, animal manure and mushroom compost." *Environmental Monitoring and Assessment*, 184(2), 1197–1205
- Andersson J, Woldegiorgis A, Remberger M i in. (2006) "Results from the Swedish National Screening Programme 2005"
- Czech B (2012) "Usuwanie farmaceutyków z wód i spieków z wykorzystaniem metod adsorpcyjnych i fotokatalitycznych" *Adsorbenty i Katalizatory Wybrane Technologie a Środowisko*, pod red. J. Ryczkowskiego:443–452;
- Dudziak M, Bodzek M (2005) "Możliwości wykorzystania nanofiltracji do usuwania estrogenów z roztworów wodnych" *Ochrona Środowiska*, 27 (2): 9-12

- Dudziak M, Bodzek M (2009) "The effect of presence of salts on the removal of xenoestrogens in nanofiltration" *Polish Journal of Environmental Studies*, 2B: 14-16
- Dudziak M., Luks-Betlej K. (2004) "Ocena obecności estrogenów steroidowych hormonów płciowych w wybranych wodach rzecznych w Polsce" *Ochrona Środowiska*, 26 (1): 21-24
- Hrydziuszko M (2017) "Historyczne uwarunkowania rozwoju rynku farmaceutycznego na świecie i w Polsce" *Marketing i Rynek* 12 :3-11
- Kot-Wasik A, Dębska J, Namieśnik J (2003) "Przemiany, stężenia i oznaczanie pozostałości środków farmaceutycznych w środowisku." W: *Nowe Horyzonty I Wyzwania W Analityce I Monitoringu środowiskowym*: 722-744
- Kumirska J, Potrykus M, Migowska N, i in. (2012) "Zastosowanie chromatografii gazowej do rozdzielania i oznaczania wybranych estrogenów w próbkach środowiskowych" *Camera Separatoria* 4 (1): 7-36;
- McLachlan JA (2016) "Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond" *Andrology*, 4(4):684–694
- Miller JS (2011) "Kinetyka degradacji wybranych ksenobiotyków w roztworach wodnych metodami fotochemicznymi." *Zeszyty Naukowe* Nr 1083
- Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN (2009) "Environmental estrogens and obesity" *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304(1-2), 84–89.
- Roguska B, Feliksiak M (2010) "Stosowanie leków dostępnych bez recepty" *CBOŚ BS/143/2010*
- Rydziński D (2016) "Zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego środkami farmaceutycznymi" *Wybrane zagadnienia z zakresu ochrony środowiska i energii odnawialnej* :191-199
- Rzepakowska M, Adamek D, Ostaszewska T i in. (2014) "Problem występowania osobników interseksualnych u ryb jesiotrowatych" *Przegląd Hodowlany* nr 3/2014: 47-48
- Szymonik A , Lach J (2012) "Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych" *Inżynieria i Ochrona Środowiska* 15 (3): 249-263
- Tapiero H, Nguyen Ba G, Tew K (2002) "Estrogens and environmental estrogens." *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(1), 36–44;
- Włodarczyk-Makula M (2015) "Wybrane związki endokrynnie aktywne EDC w środowisku wodnym"