

**SOCIETY OF ECOLOGICAL CHEMISTRY  
AND ENGINEERING**

---

# **Proceedings of ECOpole**

**Vol. 3**

**No. 1**

---

**2009**

## **EDITORIAL COMMITTEE**

**Maria WACŁAWEK (University, Opole) - Editor-in-Chief**  
**Milan KRAITR (Western Bohemian University Plzen, CZ)**  
**Jerzy SKRZYPSKI (University of Technology, Łódź)**  
**Witold WACŁAWEK (University, Opole)**

## **SCIENTIFIC BOARD**

Witold WACŁAWEK (University, Opole) - Chairman  
Jerzy BARTNICKI (Meteorological Institute DNMI, Oslo-Blindern, NO)  
Mykhaylo BRATYCHAK (National University of Technology, Lviv, UA)  
Bogusław BUSZEWSKI (University, Toruń)  
Andrzej GAWDZIK (University, Opole)  
Milan KRAITR (Western Bohemian University Plzen, CZ)  
Andrzej KULIG (University of Technology, Warszawa)  
Bernd MARKERT (International Graduate School [IHI], Zittau, DE)  
Jacek NAMIEŚNIK (University of Technology, Gdańsk)  
Vasil SIMEONOV (University of Sofia, Sofia, BG)  
Antonin SLABÝ (University, Hradec Králové, CZ)  
Wiesław WASIAK (University, Poznań)  
Roman ZARZYCKI (University of Technology, Łódź)  
Andrzej KŁOS (University, Opole) - Secretary

### **Editorial Office**

Opole University  
POB 313, ul. Oleska 48, 45-951 Opole  
tel./fax +48 77 455 91 49  
email: maria.waclawek@uni.opole.pl  
<http://tchie.uni.opole.pl>

### **Secretaries' Office**

tel. +48 77 401 60 42  
email: mrajfur@o2.pl

**Copyright © by**  
**Society of Ecological Chemistry and Engineering**

**Proceedings of ECOpole**  
**were partly financed by**  
**Ministry of Science and Higher Education**  
**Warszawa**

**ISSN 1898-617X**

## CONTENTS / SPIS TREŚCI

<b>Papers/Artykuły</b> .....	7
Anton AMANN, Julian KING, Alexander KUPFERTHALER Karl UNTERKOFLER, Helin KOC, Susanne TESCHL and Hartmann HINTERHUBER Exhaled breath analysis - quantifying the storage of lipophilic compounds in the human body .....	9
Balázs PLESZ, Péter SÁGI and Veronika TIMÁR-HORVÁTH Enhancement of solar panels' power generation by the usage of solar tracking .....	15
Mariusz TAŃCZUK and Roman ULBRICH Assessment of energetic potential of biomass .....	23
Lucie TRNKOVÁ, Iva BOUŠOVÁ, Lucie RYŠÁNKOVÁ, Petra VRABCOVÁ and Jaroslav DRŠATA Antioxidants and environmental stress: spectroscopic study on stability of natural compounds and their interaction with a molecule of protein in an <i>in vitro</i> model .....	27
<b>Artykuły/Papers</b> .....	35
<b>Chemia ekologiczna/Ecological chemistry</b> .....	37
Józef ANTONOWICZ Ołów i kadm w mikrowarstwie powierzchniowej wody płytkiego jeziora Dołgie Wielkie .....	39
Józef ANTONOWICZ i Jan TROJANOWSKI Kadm i mangan w mikrowarstwie powierzchniowej i w wodzie podpowierzchniowej estuariowego jeziora Gardno .....	45
Beata BOBEK, Aleksandra SMYŁŁA, Piotr RYCHTER, Robert BICZAK i Marek KOWALCZUK Degradacja wybranych poliestrów w glebie z udziałem mikroorganizmów .....	51
Anna CHRZAN, Maria MARKO-WORŁOWSKA i Tomasz ŁACIAK Metale ciężkie w glebie i organizmach bezkręgowców glebowych .....	59
Bożena DĘBSKA, Magdalena BANACH-SZOTT i Małgorzata DRĄG Polidispersyjność i właściwości hydrofilowe i hydrofobowe kwasów huminyowych gleb pod topolami .....	63
Jolanta KOWALSKA i Dariusz DROŹDŻYŃSKI Spinosad jako insektycyd w rolnictwie ekologicznym - możliwości stosowania i monitoring pozostałości .....	71

Anna KRZEPIŁKO i Agata ŚWIĘCIŁO Czy antyoksydanty przeciwdziałają skutkom toksycznego oddziaływania pyretroidów na komórki drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ? .....	77
Andrzej MAKOWSKI, Andrzej SOBCZAK, Danuta WCISŁO, Ewa ADAMEK Wojciech BARAN i Witold NOCOŃ Fotokatalityczna degradacja ampicyliny w roztworach wodnych .....	81
Andrzej MAKOWSKI, Andrzej SOBCZAK, Danuta WCISŁO, Ewa ADAMEK Wojciech BARAN i Maciej KOSTECKI Fotokatalityczna degradacja doksycykliny w roztworach wodnych .....	87
Joanna MATUSKA Inwazyjność i reprodukcja nicieni entomopatogennych <i>Heterorhabditis megidis</i> (Poinar, Jackson i Klein 1987) po kontakcie z jonami ołowiu(II) .....	95
Krystian T. OBOLEWSKI, Elżbieta SKORBIŁOWICZ i Mirosław SKORBIŁOWICZ Wpływ składu chemicznego osoki aloesowatej <i>Stratiotes aloides</i> L. na strukturę zasiedlającej ją makrofauny .....	101
Monika SKOWROŃSKA i Tadeusz FILIPEK Akumulacja azotu i fosforu przez kukurydzę pod wpływem ograniczonego nawożenia potasem .....	109
<b>Inżynieria środowiska/Environmental engineering .....</b>	<b>113</b>
Ewa OCIEPA, Adam KISIEL i Joanna LACH Ochrona wód powierzchniowych przed zrzutami ścieków deszczowych z sieci kanalizacyjnych .....	115
Wojciech BARAN, Ewa ADAMEK, Jolanta SOCHACKA, Andrzej SOBCZAK i Andrzej MAKOWSKI Prognozowanie kumulacji trudno biodegradowalnych zanieczyszczeń w odciekach ze składowisk odpadów .....	121
Tomasz CHOLEWA, Łukasz GUZ i Alicja SIUTA-OLCHA Wykorzystanie alternatywnych źródeł energii w instalacjach grzewczo-klimatyzacyjnych .....	127
Łukasz GUZ, Zbigniew SUCHORAB i Henryk SOBCZUK Kalibracja sond psychrometrycznych .....	133
Katarzyna JAROMIN, Tomasz BORKOWSKI, Grzegorz ŁAGÓD i Marcin WIDOMSKI Analiza wpływu rodzaju materiału oraz czasu i sposobu eksploatacji kolektorów kanalizacji grawitacyjnej na prędkość przepływu ścieków .....	139
Alia JLILATI, Katarzyna JAROMIN, Marcin WIDOMSKI i Grzegorz ŁAGÓD Charakterystyka osadów w wybranym systemie kanalizacji grawitacyjnej .....	147

Hanna KIERZKOWSKA-PAWLAK Absorpcja i desorpcja ditlenku węgla z przesyconych roztworów węglanu propylenu .....	153
Alina KOWALCZYK-JUŚKO Popiół z różnych roślin energetycznych .....	153
Joanna LACH i Ewa OCIEPA Wpływ prowadzenia procesu modyfikacji węgla aktywnego WG-12 z udziałem ciepła Joule'a i powietrza na sorpcję Cr(III) .....	165
Grzegorz ŁAGÓD Reaeracja ścieków w kanalizacji grawitacyjnej .....	171
Grzegorz ŁAGÓD, Henryk SOBCZUK i Zbigniew SUCHORAB Błona biologiczna w kanalizacji grawitacyjnej i jej wpływ na biodegradację ścieków .....	179
Karolina MIELCZAREK, Jolanta BOHDZIEWICZ i Anna KWARCIAK-KOZŁOWSKA Membrany polisulfonowe w oczyszczaniu ścieków koksowniczych .....	185
Ewa RADZIEMSKA i Piotr OSTROWSKI Zagospodarowanie proszku krzemowego, odzyskanego w procesach produkcji i recyklingu uszkodzonych ogniw fotowoltaicznych .....	191
Zbigniew SUCHORAB, Bartłomiej DENEKA, Grzegorz ŁAGÓD i Henryk SOBCZUK Możliwość pomiaru zasolenia w materiałach budowlanych za pomocą metody TDR .....	199
Zbigniew SUCHORAB, Magdalena JARMUŁA, Henryk SOBCZUK Zbyšek PAVLIK i Robert ČERNÝ Zastosowanie metody TDR do pomiaru podciągania kapilarnego w ściance modelowej z cegły ceramicznej pełnej .....	207
Elwira TOMCZAK i Dominika SZCZERKOWSKA Sorpcja z roztworów wieloskładnikowych na chitozanie suszonym sublimacyjnie .....	215
Roman ZARZYCKI, Zofia MODRZEJEWSKA Hanna KIERZKOWSKA-PAWLAK i Witold SUJKA Mechanizm sorpcji jonów metali w hydrożelu chitozanowym - badania kalorymetryczne .....	221
<b>Varia</b> .....	229
Invitation for 15 <sup>th</sup> International Conference on Heavy Metals in the Environment.....	231

Invitation for ECOpole'09 .....	233
Zaproszenie na ECOpole'09 .....	237
Guide for authors .....	241
Zalecenia dla autorów .....	242

Papers

Artykuły





Anton AMANN<sup>1,2</sup>, Julian KING<sup>1,2,3</sup>, Alexander KUPFERHALER<sup>1,2</sup>  
Karl UNTERKOFLE<sup>3,2</sup>, Helin KOC<sup>3,2</sup>, Susanne TESCHL<sup>4</sup>  
and Hartmann HINTERHUBER<sup>5,2</sup>

## EXHALED BREATH ANALYSIS - QUANTIFYING THE STORAGE OF LIPOPHILIC COMPOUNDS IN THE HUMAN BODY

### ANALIZA WYDECHU - OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW LIPOFILOWYCH W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

**Abstract:** Real-time analysis of exhaled breath is a promising new method to get quantitative information on lipophilic compounds stored in the human body. Some pilot results are presented on isoprene, which is produced as a by-product of the cholesterol synthesis and appears in exhaled breath at concentrations of about 100 parts-per-billion (ppb). The results have been obtained using proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS) from healthy volunteers undergoing an ergometer challenge test (with 75 W). Peak exhalation flow of isoprene is about 400 nmol/min shortly after start of the challenge. The setup holds great potential in capturing continuous dynamics of non-polar, low-soluble VOCs over a wide measurement range with simultaneous recording of physiological parameters affecting exhalation kinetics.

**Keywords:** exhaled breath analysis, isoprene, proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS)

Numerous organic compounds may be stored in the human body, and this is, in particular, so for lipophilic species. Determination of the amounts of such compounds in different compartments of the body (eg a hypothesized homogenous fat compartment or various organs) is an important task. A popular example in this framework is isoprene, a moderately cancerogenous C5 hydrocarbon, whose endogenous origin in mammals has mainly been attributed to the cholesterol synthetic pathway. Isoprene is also produced by plants in huge amounts. Other examples are hydrocarbons (C3-C13), which partly are of exogenous origin (kerosene, petrol) and partly may be due to metabolization of precursors by cytochrome P450 enzymes, by bacteria in the gut or are formed as a result from lipid peroxidation.

Considering their often high volatility, analysis of exhaled breath is the method of choice to reveal the presence of such compounds. Determination of their concentrations in a provided breath sample can be done by gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS), proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS), selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS), laser spectrometry or ion mobility spectrometry (IMS). Particularly, PTR-MS and SIFT-MS allow real-time measurements of exhaled breath, even with breath-to-breath resolution.

The concentration levels in exhaled breath change, depending on the stored amount of the compound in the body, but also depending on various physiological factors such as heart and breathing rate, rate of synthesis in the body, and rate of uptake from external sources.

<sup>1</sup> Innsbruck Medical University, Department of Operative Medicine, Anichstr. 35, A-6020 Innsbruck

<sup>2</sup> Breath Research Unit of the Austrian Academy of Sciences, Dammstr. 22, A-6850 Dornbirn

<sup>3</sup> Vorarlberg University of Applied Sciences, Hochschulstr. 1, A-6850 Dornbirn

<sup>4</sup> University of Applied Sciences Technikum Wien, Höchstädtplatz, A-1120 Wien

<sup>5</sup> Innsbruck Medical University, Department of Psychiatry, Anichstr. 35, A-6020 Innsbruck

Based on the real-time capability of PTR-MS and SIFT-MS, one may model and simulate the continuous flows of volatile compounds within the human body, and validate such simulations by experiments: eg, by measuring concentration levels during physical activity on an ergometer, or by looking at the concentration changes during sleep (with different sleep phases giving rise to different heart and breathing rate).

## Methods

A high-sensitivity proton transfer reaction mass spectrometer (PTR-MS, 3 turbopumps, Ionicon, Innsbruck, Austria) with Teflon rings (instead of Viton rings) was used for our measurements. The count rate of primary ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  was around  $10^7$  counts per second. Hydronium ions ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) and water clusters ( $\text{H}_3\text{O}^+ \text{H}_2\text{O}$ ) are primary ions, the parasitic primary ions  $\text{O}_2^+$  and  $\text{NH}_4^+$  are controlled (with counts being less than 2% of the primary ions, respectively). Isoprene (molecular weight 68 g/mol) and acetone (molecular weight 58 g/mol) were measured using their respective protonated forms at mass-to-charge ratios  $m/z$  69 and  $m/z$  59. Due to their contrasting physicochemical properties (isoprene is strongly lipophilic whereas acetone is hydrophilic) we view these two species as paradigmatic examples revealing valuable information on the broad spectrum of possible VOC responses according to distinct physiological conditions.

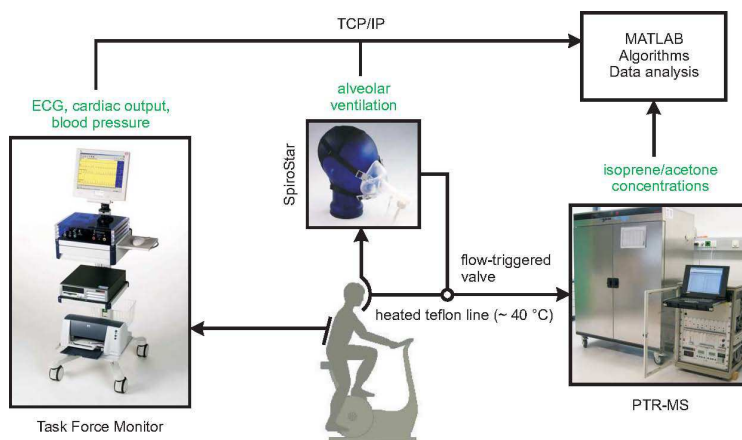


Fig. 1. Schematic presentation of the experimental setup for non-invasive real-time analysis of exhaled breath. Measurement of volatile compounds is performed by proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS) or by selected flow tube mass spectrometry (SIFT-MS, not shown). Alveolar ventilation is determined by a flow measurement (SpiroStar, Medikro Oy, Kuopio, Finland). The electrocardiogram (ECG), cardiac output and blood pressure are measured by the Task Force Monitor (CNSystems, Graz, Austria)

Respiratory flow is obtained by means of an OEM version of the Medikro SpiroStar USB differential pressure sensor (Medikro Oy, Kuopio, Finland) delivering volumetric flow rates with a sampling frequency of 100 Hz. Inhalation and exhalation occurs through pre-calibrated single-use flow transducers, which can be connected to sterilizable or personal silicone head masks (CORTEX biophysics GmbH, Leipzig, Germany). This

allows the test subject to breath freely through mouth and/or nose while simultaneously reducing the risk of hyperventilation (see Fig. 1).

## Results

The concentration of isoprene in healthy volunteers is around 100 ppb in mixed expiratory exhaled breath [1]. During a challenge experiment at an ergometer its concentration increases  $\sim 3$ -fold (see Fig. 2). Since the alveolar ventilation increases during pedalling at the ergometer by a factor  $\sim 5$ , the absolute concentration of isoprene *decreases* soon after having reached a peak concentration.

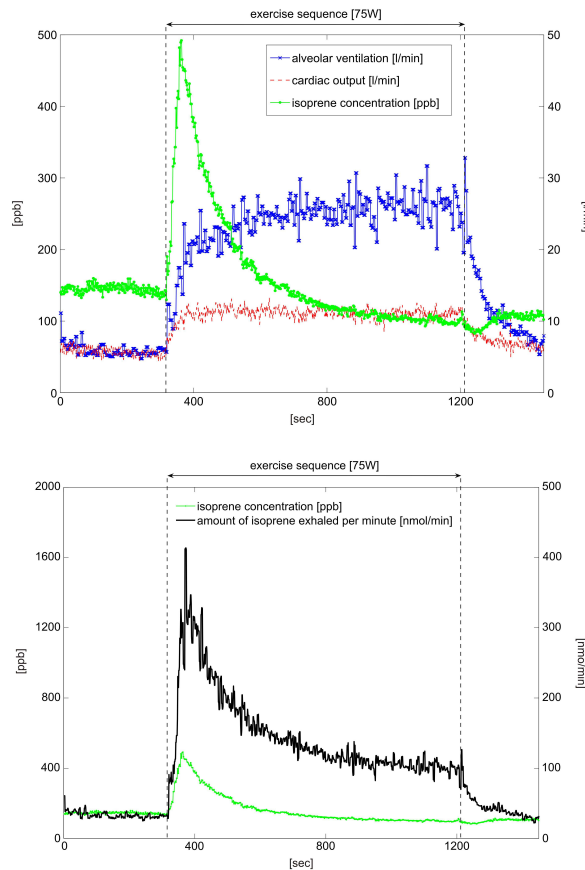


Fig. 2. Isoprene concentration (in ppb) during a challenge at an ergometer of one healthy volunteer (75 W, starting at 317 s, ending at 1213 s). Cardiac output and alveolar ventilation (in  $\text{dm}^3/\text{min}$ ) are shown. As soon as the volunteers starts pedalling at the ergometer, the concentration of isoprene shows a huge peak, with the concentration increasing  $\sim 3$ -fold. The increase in alveolar ventilation by a factor of  $\sim 5$  dilutes the amount of isoprene and therefore leads to a *decrease* in absolute concentration. The maximum amount of isoprene excreted per minute is  $\sim 12$  times the amount per minute at rest. The mean amount of isoprene excreted during pedalling (in this experiment) is  $\sim 3.2$  times the amount per minute at rest

The production rate of isoprene has been estimated as 0.34  $\mu\text{mol/h/kg}$  B.W., from which 0.31  $\mu\text{mol/h/kg}$  B.W. are metabolized [2]. Only 0.03  $\mu\text{mol/h/kg}$  B.W. isoprene are exhaled unchanged (net isoprene production), amounting to  $5 \times 10^{-5}$  mol/day for a 70 kg person. Elimination through the lungs happens at a concentration of about 100 ppb [1], corresponding to an alveolar concentration of  $\sim 140$  ppb ( $5.2 \times 10^{-9}$  mol/dm<sup>3</sup> at body temperature). Considering an alveolar minute ventilation flow of 5.25 dm<sup>3</sup>/min [3], this corresponds to  $\sim 4 \times 10^{-5}$  mol of isoprene/day ( $\sim 2.7 \times 10^{-8}$  mol of isoprene per minute), which is about 80% of the net isoprene production.

The *maximum amount* of isoprene excreted per minute (in the ergometer experiment described in Fig. 2) is  $\sim 12$  times the amount per minute at rest. The *mean amount* of isoprene excreted during pedalling (in this experiment) is  $\sim 3.2$  times the amount per minute at rest.

With a partition coefficient of 0.75 between arterial blood and alveolar air [2], the concentration of isoprene in arterial blood is estimated as  $3.9 \times 10^{-9}$  mol/dm<sup>3</sup>. The distribution constant between fat and blood in humans is  $\sim 82$  [2]. Hence, in steady state the concentration of isoprene in the fat compartment is estimated to be  $3.2 \times 10^{-7}$  mol/dm<sup>3</sup>. For an arterial blood volume of 2.8 dm<sup>3</sup> [4] and fat tissue volume of 13.3 dm<sup>3</sup> (19% of B.W.), the amount of isoprene in these compartments is estimated to be  $1.1 \times 10^{-8}$  mol and  $4.2 \times 10^{-6}$  mol, respectively. Therefore in steady state the amount of isoprene in the fat compartment is  $\sim 380$  times the amount of isoprene in the arterial blood.

## Discussion

Kinetic modeling and corresponding on-line determination of concentrations of lipophilic compounds in exhaled breath is a new interesting field of research, still in its infancy. In the future it will be a powerful tool for better understanding of the fate of volatile compounds within the body.

## Acknowledgement

The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-13) under grant agreement No. 217967. Julian King is a recipient of a DOC fellowship of the Austrian Academy of Sciences at the Breath Research Unit. We greatly appreciate the generous support of the Member of the Tyrolean regional government Dr. Erwin Koler and the Director of the University Clinic of Innsbruck (TILAK) MSc Andreas Steiner.

## References

- [1] Kushch I., Arendacka B., Stolc S., Mochalski P., Filipiak W., Schwarz K., Schwentner L., Schmid A., Dzien A., Lechleitner M., Witkovsky V., Miekisch W., Schubert J., Unterkofler K. and Amann A.: *Breath isoprene - aspects of normal physiology related to age, gender and cholesterol profile as determined in a proton transfer reaction mass spectrometry study*. Clin. Chem. Lab. Med., 2009, **47**(5), 550-560.
- [2] Filser J.G., Csanady G.A., Denk B., Hartmann M., Kauffmann A., Kessler W., Kreuzer P.E., Putz C., Shen J.H. and Stei P.: *Toxicokinetics of isoprene in rodents and humans*. Toxicology, 1996, **113**(1-3), 278-287.
- [3] West J.B.: *Respiratory Physiology. The Essentials*. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore 2005.
- [4] Mork A.K. and Johanson G.: *A human physiological model describing acetone kinetics in blood and breath during various levels of physical exercise*. Toxicol. Lett., 2006, **164**(1), 6-15.

## **ANALIZA WYDECHU - OZNACZANIE ZAWARTOŚCI ZWIĄZKÓW LIPOFILOWYCH W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA**

**Abstrakt:** Przedstawiono wstępne wyniki oznaczenia stężenia izoprenu w wydechu zdrowego człowieka. Izopren jest produktem ubocznym reakcji syntezy cholesterolu. Do oznaczenia zastosowano metodę reakcji przeniesienia protonu przy wykorzystaniu spektrometrii mas (PTR-MS).

**Słowa kluczowe:** analiza wydechu człowieka, izopren, metoda reakcji przeniesienia protonu wraz ze spektrometrią mas (PTR-MS)



Balázs PLESZ<sup>1</sup>, Péter SÁGI<sup>1</sup> and Veronika TIMÁR-HORVÁTH<sup>1</sup>

## ENHANCEMENT OF SOLAR PANELS' POWER GENERATION BY THE USAGE OF SOLAR TRACKING

### WZROST GENEROWANEJ MOCY MODUŁÓW NADAŻAJĄCYCH ZA SŁOŃCEM

**Abstract:** Solar energy will have a continuously rising importance in energy harvesting in the future. Despite all its potential and importance photovoltaic energy still has to be improved in some fields to become competitive with the conventional energy sources of today in large scale applications. One possibility to raise the energy produced by solar modules and panels is solar tracking. Solar tracking allows us to direct solar panels continuously in optimal position to the sun, thus improving the overall efficiency of a photovoltaic system. We calculated the theoretical possible excess energy that can be gained by application of solar tracking. Based on these preliminary calculations we designed and built a complex system using two-axis positioning and electronically realized maximum power point tracking at the same time. Thanks to the built-in radio-wave communication infrastructure it is possible to monitor, control and synchronize different trackers remotely. The extension and scalability of the system enables building solar farms consisting of dozens of individual units.

**Keywords:** solar tracking, two axis tracking, energy enhancement

Nowadays the importance of alternative energy sources and especially solar energy has been steadily increasing. Solar cells give the opportunity to convert the sunlight directly into electrical energy. However, the energy delivered by the solar cells depends on various factors, eg the construction and efficiency of the solar cell, the temperature and of course the intensity of the irradiated light. Even under clear weather conditions (steady amount of solar radiation) the position of the sun changes during the day, which in case of fix installed solar panels leads to changes in the effective surface of the solar panels towards the sun and a decreased output power. The optimal position is, when the solar panels are perpendicular to the light; in this case the effective surface equals to the surface of the solar panel. This optimal position can be maintained with solar tracking. Despite the fact that solar tracking enhances the generated power the cost effectiveness and pay-back time is still frequently disputed.

### Types of solar tracking

Solar tracking can be performed using different solutions and types of control systems. Depending on the movement's degree of freedom two different types of tracking can be distinguished:

- one axis tracking,
- two axis tracking.

The first one has the advantage of a simpler mechanics and the necessity of a tilting mechanism for only one axis, but the rotated panels cannot follow the seasonal changes in the sun's ecliptic, unlike in case of the two axis tracking.

---

<sup>1</sup> Department of Electron Devices, Budapest University of Technology and Economics, H-1521. Budapest, Hungary, email: plesz@eet.bme.hu, peter.sagi@gmail.com, timarne@eet.bme.hu

Solar trackers can also be categorised by the type of tracking control, where they can be divided into two groups:

- passive tracking,
- active tracking.

Normally the passive trackers do not incorporate sensors or actuators, but use any physical phenomenon to position the solar panels, eg thermal expansion of gases [1]. Active trackers are systems whose motion is performed by actuators controlled by signals of a sensor. The most common types of active control are the *time* and the *intensity controlled* tracking. The first one calculates the sun position from the given geographical location and the local time; the latter one tracks the brightest spot on the sky.

### Theoretical gain of solar tracking

Based on data collected in our previous long-term outdoor measurements [2] we calculated the possible excess power that could be gained by two axis solar tracking. Figure 1 shows the comparison of the electric powers delivered by fixed (45 degree inclination, faced south) and tracking installations. These calculations showed that using tracking the harvested amount of energy could be increased by more than 30% (37% for the particular day in Figure 1) and this corresponds to the energy gains experienced by some manufacturers of solar trackers [3, 4]. The tracking does not increase the peak power, but the excess energy is mainly produced in the time period, where the position of the fixed system is not optimal, eg the morning and the evening hours.

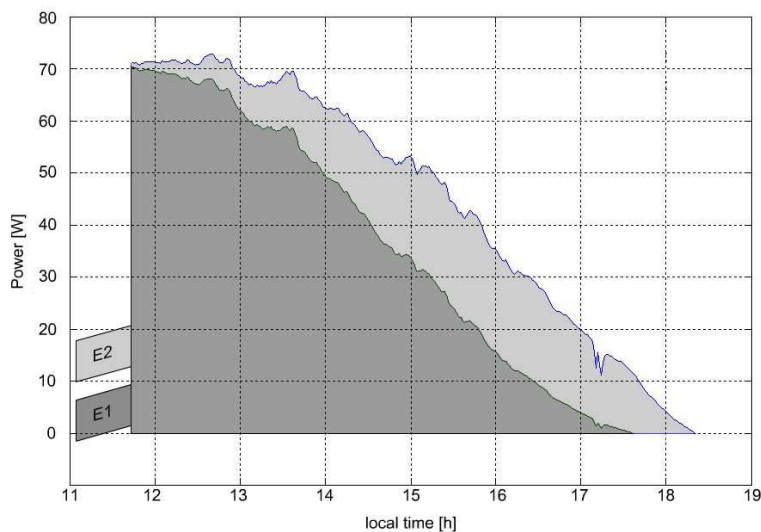


Fig. 1. Calculated energy gain during one day,  $E1$  is the energy in case of a fixed module,  $E2$  in case of rotated module (calculation for an 80 W monocrystalline Si module, based on data from Oct. 6<sup>th</sup>, 2006)

We also performed calculations for the yearly exploitable excess energy based on data gathered in Hungary in the year 2000 [5]. The results of the calculations are shown in



Figure 2 in monthly distribution. The calculation shows that on the average an excess power of about 33% can be gained by tracking.

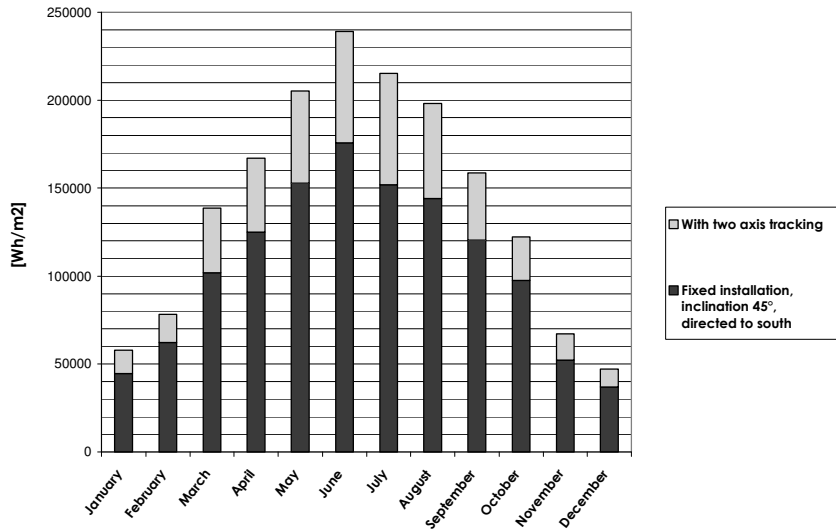


Fig. 2. Calculated yearly energy gain in monthly distribution (incoming energy/m<sup>2</sup> on the surface of fixed and rotated solar panels)

### Concept of the Heliotrex solar tracking system

During the design of our system we kept two purposes in mind. The first was to build a solar tracker to perform long-term investigations, and to receive reliable data about the efficiency of tracking with photovoltaic solar panels. In addition our goal was to create a system that could be applicable in large scale energy harvesting applications like solar farms, for photovoltaics as well as for photo-thermal applications.

Thinking about future industrial applications we chose to build a fully automated system with remote controlling and monitoring possibilities. Because its attractive results in energy gain [3, 6] we decided to use two-axis tracking. Another requirement was the scalability of the system, which means trackers of different sizes and power ratings can be built with minimal changes to the design. Finally low power consumption and low manufacturing costs were also our requirements.

To achieve low power consumption DC motors with high torque gear transmissions were chosen to perform the rotation.

#### Electronics

Because of the mixed calculation and control tasks the electronics are based on microcontrollers. A modular structure was chosen to ensure the scalability with minimum changes to the electronics. The electronics consist of three main modules such as: the Tracking Control, the Maximum Power-Point Tracking (MPPT) module and the

Communication Module. The block diagram is shown in Figure 3. To perform the tracking only the tracking control unit is needed, the other two units are optional.

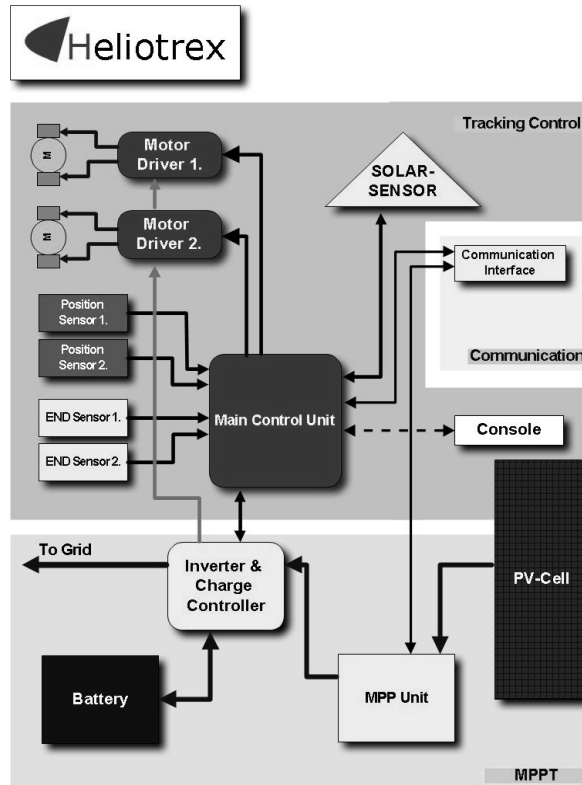


Fig. 3. Electronics scheme of the Heliotrex solar tracking system

The MPPT unit's function is to set the optimal electrical load electronically, thus reaching the maximal power-point. The maximum power-point is determined from the measured voltage and current with the "perturb and observe" (P&O) method [7]. The MPPT contains a Charge Controller circuit to control the appropriate charging of batteries and to prevent incidental overcharging or deep discharging. If applied, the MPPT unit is used as a power supply for all electronics too.

Measured values can be transmitted via the Communication Module to serve monitoring purposes. For RF transmission the 433 MHz ISM band is used. The software on the monitoring PC may transmit control commands to each of the electronic units.

The different units are connected to the Communication Module over an 8-bit parallel bus and are addressed; this allows the connection of more than one Tracking Control Unit and additional MPPT modules if needed. With the further planned TDMA communication several Communication Modules can transmit the data of different trackers, so the monitoring and control of a solar farm could be managed from a single monitoring centre (Fig. 4).

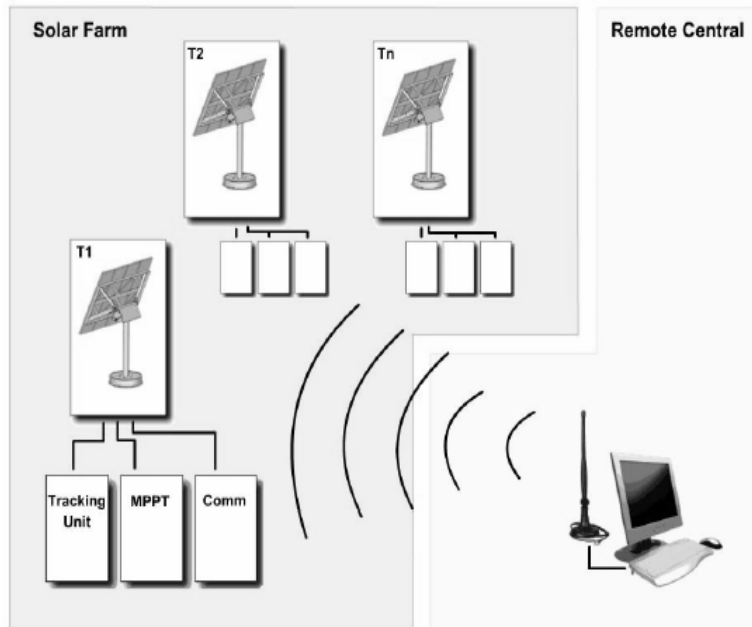


Fig. 4. Structure of a Heliotrex system solar farm

### *The tracking algorithm*

The tracker applies both intensity- and time-controlled tracking modes. For the intensity-controlled tracking and for the detection of the weather conditions a self-developed solar sensor is used. For the time-controlled tracking a real-time clock chip is used.

The selection of the control mode can be made manually or is decided upon the weather conditions by the tracker in automatic selection mode.

The algorithm checks the intensity and the current position every 30 seconds. In automatic selection mode, if the intensity is below a certain (adjustable) level, the tracker switches to time-controlled mode, above this level the intensity-controlled mode gets activated.

In time-controlled mode the tracker performs every 8 minutes a movement of 2 degrees around the vertical axis. The rotation around the horizontal axis is performed once every hour. In intensity-controlled mode the hysteresis of the algorithm is 2 degrees.

### *The mechanical construction*

The current version of the tracker is suitable to carry and rotate four 50 W crystalline silicon photovoltaic modules. The total weight of the rotated modules can be up to 30 kg.

The mechanical work consisted of the design of the framework and the drives for two different kinds of movement. Because the drive gears have to provide enough braking force even in the case of strong wind (100÷150 km/h) a self-locking worm-gear drive had been chosen. The structure of the tracker is shown in Figure 5.

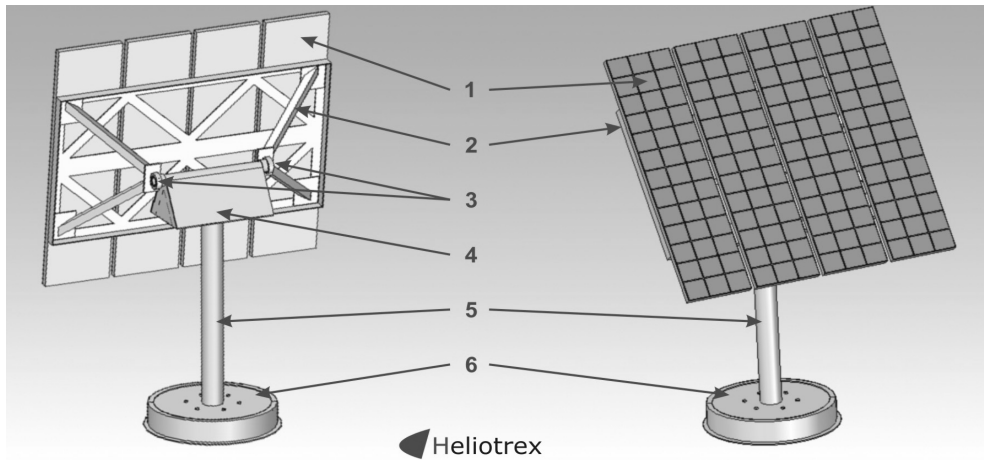


Fig. 5. Structure of the tracker: 1 - solar modules, 2 - framework with bracing, 3 - bearings, 4 - housing for the electronics and the tilting drive gear, 5 - shaft, 6 - housing for the rotating drive gear

The domains of the two axes' displacement are the followings:

- 1) rotation around the vertical axis:  $270^\circ$ ,
- 2) tilting of the framework:  $70^\circ$ .

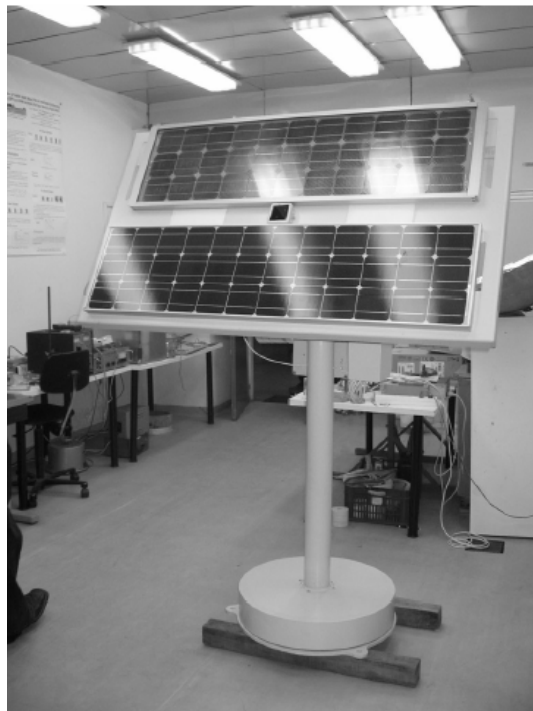


Fig. 6. The Heliotrex system with two mounted solar modules during first tests in the laboratory

The speed of rotation is not critical: 1 deg/s. The same type of motor is used for both axes with drive gears of similar structure but different gear ratio. The structural elements of the tracker are made from steel, the system is designed to be stable at wind velocities up to 150 km/h.

### Costs

The theoretical calculations of the possible energy gain achievable by solar tracking were given above. In the case of an electric powered system this has to be reduced by the power consumed for operation. Based on the power consumption measured during the tests of the system, we calculated the ratio of the energy consumed for operating the system and the excess energy (Fig. 7). The calculation resulted that over a year in average only 4.6% of the excess energy is consumed for system's operation. In total this results in a calculated gain of 32.3% in comparison with the investigated fixed system.

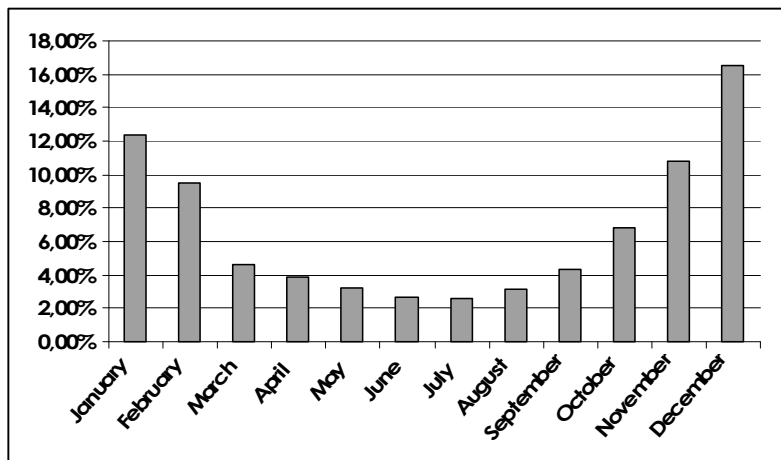


Fig. 7. Energy consumed for the operation of the tracking system in percentage of the excess energy

Like other photovoltaic systems solar tracking enhanced photovoltaics can not compete nowadays with the prices of the electrical energy produced from conventional energy sources. On the other hand our preliminary calculations showed that a tracker with mounted panels of 1 kW<sub>p</sub> power can replace fixed installations in the size of 1.3 kW<sub>p</sub>. Calculated with the nowadays common total installation cost of approx. 4 Euro/W<sub>p</sub>, we found that the usage of a tracking system for 1 kW<sub>p</sub> amounts to 80% of the cost of installation of the additional 0.3 kW<sub>p</sub> fixed panels. Thus everywhere, where the conditions for photovoltaics are given (stand-alone systems, appropriate subventions, etc) solar tracking is a considerable option.

### Conclusions

The possible energy gain of solar tracking and a micro-controller based fully automated solar tracking system was shown that can operate both in intensity and time

control mode. The system is equipped with a maximum power point tracking module for the energy enhancement and an RF communication subsystem for monitoring and remote control purposes.

Based on the power consumption of the system the total excess energy gained by tracking was calculated and resulted in 32.3%, which makes solar tracking to a considerable option in photovoltaic installations.

The next step is to perform long-term outdoor measurements, to confirm the preliminary calculations, and to determine the optimal tracking algorithm. All data of the long-term operation will be stored in a database and used for monitoring and statistical purposes.

The main aspect of the further developments to the tracking system is the ability to come to the market. With the planned TDMA communication numerous trackers can be installed and easily managed in one solar power plant.

### Acknowledgments

The authors wish to express their appreciations to electrical engineering students László Jablonkai and István Rácz for the design of the MPPT and Communication subsystems and to mechanical engineering students Dávid Fekete and Krisztián Gyurák for the design and construction of the mechanical structure, as well as to Gábor Buza for participating in the calculations of excess energy gain.

This work was supported by the GVOP-3.1.1-2004-05-0282/3.0 project of the Ministry of Economy in Hungary.

### References

- [1] Roth P. et al: *Energy Convers. Manage.*, 2005, **46**, 1179-1192.
- [2] Plesz B., Pánczél S., Timár-Horváth V. and Mizsei J.: 3rd International Workshop on Teaching in Photovoltaics, Proceedings 2006, Prague, 97-101.
- [3] Homepage: <http://www.degerenergie.de>
- [4] Homepage: <http://www.solar-trackers.com>
- [5] Imre L., Bitai A. and Hecker G.: *Megújuló energiaforrások*. Budapest 2000.
- [6] Mazen M. Abu-Khadra, Omar O. Badran and Salah Abdallah: *Renew. Sustain. Ener. Reviews*, 2008, **12**(3), 864-873.
- [7] Femia N.: *Optimization of perturb and observe maximum power point tracking method*. *IEEE Transact. Power Electron.*, 2005, **20**(4), 963-973.

## WZROST GENEROWANEJ MOCY MODUŁÓW NADĄŻAJĄCYCH ZA SŁOŃCEM

**Abstrakt:** Energia słoneczna w przyszłości będzie miała coraz większe znaczenie. Przed jej powszechnym wykorzystaniem muszą jednak zostać usunięte pewne bariery, co spowoduje, że będzie ona konkurencyjna w porównaniu z konwencjonalnymi źródłami energii. Jednym ze sposobów zwiększenia sprawności modułów jest ich nadążanie za Słońcem. Sprawia ono, że moduły przez cały dzień pracy pozostają w optymalnym położeniu względem Słońca i generują znacznie więcej energii elektrycznej niż ta zużyta przez system napędowy. W pracy omówiono budowę i działanie elektronicznie sterowanego, dwuosiowego systemu nadążającego. Dzięki komunikacji radiowej jest możliwe monitorowanie, kontrolowanie i zdalna synchronizacja różnych systemów nadążnych. Skalowalność i możliwość rozszerzenia systemu umożliwia jego zastosowania w wielu modułach elektrowni fotowoltaicznej.

**Słowa kluczowe:** nadążanie za Słońcem, dwuosiowy system nadążający, przyrost generowanej energii

Mariusz TAŃCZUK<sup>1</sup> and Roman ULBRICH<sup>1</sup>

## ASSESSMENT OF ENERGETIC POTENTIAL OF BIOMASS

### OCENA POTENCJAŁU ENERGETYCZNEGO BIOMASY

**Abstract:** In the paper the authors present the algorithm of the evaluation of energetic potential of green biomass and animal wastes for specific geographical area. Main assumptions of the algorithm have been presented as well as interrelations between different kinds of potentials. On the basis of statistical agricultural data about area of particular tillages, wastelands, forests and the number of hogs the energetic potential of biomass has been computed for the exemplary rural district of Opole province. For the chosen kinds of green biomass and animal wastes theoretical and technical potentials of energy has been found on the assumption that energy conversion takes places during process of firing biofuels in order to produce heat. Technical biomass potential has been shown with reference to heat demand of the rural district.

**Keywords:** green biomass, energetic potential, assessment of the potential

Usage of energy potential of biomass, both on large (global) and small (local) scale, depends on a number of factors. The most crucial is economic factor that determines development of installations of energetic usage of biomass as a fuel. Extent of biomass usage on small scale (for instance in rural district) results from proper assessment of biomass production of analyzed area [1].

The process of computing the quantity of energy that is likely to be produced from biomass is called evaluation of energetic potential of biomass.

#### Methodology of evaluation of energetic potential of biomass

According to the Energy Law local authorities are obligated to work out heat, electricity and gaseous fuels supply plans that should also include possibilities of usage of local alternative energy resources. Unfortunately, it is prevalent that local authorities are not well prepared to make a proper assessment of renewable energy resources due to lack of suitable procedures, methods and data [2]. Each kind of biomass requires specific method of evaluation of energetic potential according to its physical and chemical quality, accessibility and efficiency of usage final energy product for a specific technology. For the reason of big variety of biomass usage technologies the evaluation of energy potential of biomass has been done according to the kind of biomass. The unit of energy has been standardized to GWh per year for heat alike the electricity. It makes preparing quantitative comparisons more convenient for the sake of different kinds of biomass as well as for comparing biomass potential of different analyzed areas (for example rural districts).

According to practical usage of derived results it is reasonable to classify energetic potential of biomass as follows:

- theoretical potential - energy amount achieved from biomass on the condition that efficiency of energy conversion processes equals 100% (energy losses and processes flaw in devices are not taking into consideration). It is also assumed that potential at this level is used exclusively for energetic purposes;

---

<sup>1</sup> Department of Environmental Engineering, Opole University of Technology, 5 Stanisław Mikołajczyk St., 45-271 Opole, tel./fax 077 400 61 92, email: m.tanczuk@po.opole.pl, r.ulbrich@po.opole.pl

- technical potential - a portion of theoretical potential. The efficiency of technical processes of energy production as well as internal energy demand of the processes is included. Computing this kind of potential requires running accurate technical analyses for the most part;
- economical potential (economic, market) - depends on fuel and energy prices, taxes, financial structure and economic indexes such as payback time and others. This is the portion of technical potential that can be used taking into consideration economic criterions;
- usable potential (operational) - amount of energy that can be finally used for energetic purposes;

Deriving of theoretical and technical potential is the quick and simple way to obtain the general information on how to fulfill energy demand of the district. However, presented method has a serious disadvantage due to necessity of generalizing and approximating both at the stage of taking assumptions and while computing [3].

### Evaluation results

On the basis of input data and assumptions (tables 1-3) the value of theoretical and technical potential of biomass has been derived for specified kinds of biomass for the district. The calculations have been made for three different kinds of conversion of chemical energy of biomass: conversion via burning in water boilers, conversion via alcoholic fermentation and conversion via anaerobic fermentation.

Statistical agricultural data (tillage and land area, quantity of animal farming), crop yield and accessibility of particular kinds of biomass as well as its physical and chemical quality, efficiency of conversion of chemical energy to the heat has been presented in tables 1-3.

Table 1  
Assumptions and input data for calculating technical energetic potential of biomass fired in water boiler

Green biomass	Area	Accessibility	Crop yield/ Increment	Yearly logging	Low heating value	Efficiency of energy conversion
	A [ha]	D [%]	I	P [%]	$W_d$	$\eta$ [%]
Salix - fallow lands	469	60	11 Mg · ha	100	13.5 GJ/Mg	85
Salix - meadows	1 537	60	11 Mg · ha	100	13.5 GJ/Mg	85
Miscanthus grass - meadows	1 537	60	10 Mg · ha	100	14.2 GJ/Mg	85
Corn seeds	9 596	20	4 Mg · ha	100	14 GJ/Mg	80
Straw	9 596	62	4 Mg · ha	100	17.8 GJ/Mg	80
Forest wood	7 690	16	7.73 m <sup>3</sup> · ha	56	12.2 GJ/m <sup>3</sup>	80

Value of technical potential of biomass has been derived by multiplying each quantity placed in tables 1-3, according to each kind of biomass. In case of potential of biomass transformed in anaerobic fermentation of animal wastes (table 3) density of excrements has been taken into account. Results of calculation have been presented in tables 1-3 and in figure 1.



Table 2

Assumptions and input data for calculating technical energetic potential of biomass used for alcoholic fermentation to produce biogas as a fuel for water boiler

Biomass	Area	Accessibility	Crop yield	Bioethanol production	Low heating value	Efficiency of energy conversion
	A [ha]	D [%]	I [Mg/ha]	S [dm <sup>3</sup> /Mg]	W <sub>d</sub> [GJ/dm <sup>3</sup> ]	η [%]
Beets	431	10	40	80	23,4	85
Potatos	302	20	25	80		
Corn seeds	9 596	15	4	330		

Table 3

Assumptions and input data for calculating technical energetic potential of biomass used for anaerobic fermentation to produce biogas as a fuel for water boiler

Biomass wastes	Number of cattle	Accessibility	Unitary excrement production	Organic dry matter content	Biogas production	Low heating value	Efficiency of energy conversion
	Z [animal]	D [%]	O [dm <sup>3</sup> /animal · day]	ODM <sub>%</sub> [%]	B [m <sup>3</sup> /kg of ODM]	W <sub>d</sub> [GJ/m <sup>3</sup> ]	η [%]
Stock	3 003	60	30	12	0.40	21.5	85
Swine	9 480	70	6	5	0.45		
Poultry	47 449	60	0.066	17	0.46		

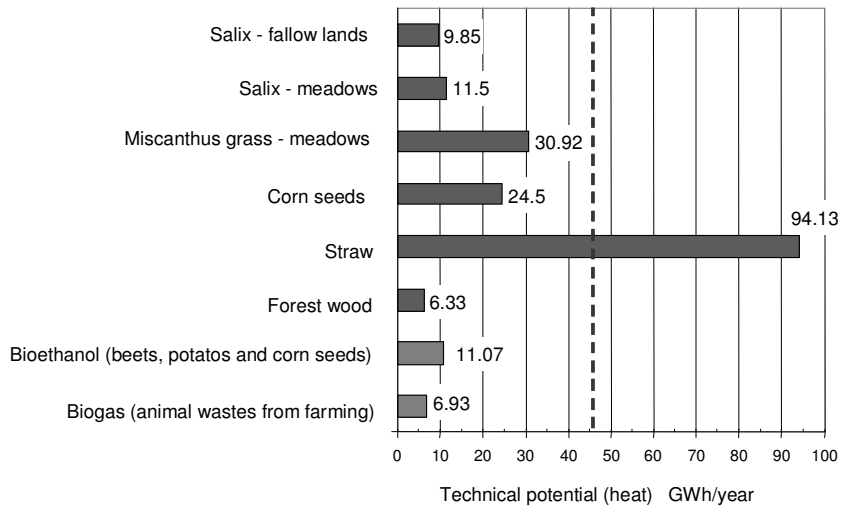


Fig. 1. Technical energetic potential of different kinds biomass derived for specified rural district

Derived values of technical potential of biomass shown in Figure 1 have been referred to the heat demand of the analyzed rural district. This demand is equal to 45 GWh and is marked with dashed line. It can be noticed from the figure that potential of straw is twice more bigger than demand.

## Conclusions

On the basis of the analyses it can be stated that:

1. Created evaluation algorithm can be a useful and convenient tool for computing energetic potential of biomass at theoretical and technical level.
2. Utility value of estimating energetic potential of biomass at theoretical and technical level is low for the reason of a big difference between theoretical level and economical and usable ones.
3. Results obtained by means of presented method are the basis for farther research made for specified areas (for instance for a rural district) with use of economic instruments and technical and economical analyses for investments oriented for biomass production and its conversion into usable forms of energy.
4. Evaluating of biomass should take place for closed area (for exemplary for rural district) taking into consideration possibilities of local production of biomass as well as local consumption of generated energy.

## References

- [1] Trinczek K.: Dobór parametrów pracy urządzenia do zdecentralizowanej produkcji ciepła i energii elektrycznej z biomasy. Praca doktorska. Wydział Mechaniczny, Politechnika Opolska, Opole 2005.
- [2] Włodarski M.: Modelowe rozwiązania w zakresie tworzenia powiatowej strategii wykorzystania energii odnawialnej. Gminne plany energetyczne. Materiały Konferencyjne „Technologie pozyskiwania i wykorzystania taniej i przyjaznej środowisku biomasy na cele grzewcze”. Zielona Góra 26.09.2002, 10-16.
- [3] Trinczek K. and Ulbrich R.: Biomasa szansą dla rozwoju kogeneracji w gminach - sposoby szacowania potencjału biomasy w gminach. Prezentacja wyników szacowania w gminach województwa opolskiego. Kogeneracja rozproszona - równoczesne wytwarzanie ciepła i prądu w gminie i przedsiębiorstwie. OW Politechnika Opolska, Opole 2007, 143-152.
- [4] Nowak S.: Chemia nieorganiczna. WNT, Warszawa 1990.

## OCENA POTENCJAŁU ENERGETYCZNEGO BIOMASY

**Abstrakt:** Przedstawiono algorytm szacowania potencjału energetycznego biomasy pochodzenia roślinnego i zwierzęcego dla określonego obszaru geograficznego. Zaprezentowano zależności pomiędzy różnymi rodzajami potencjałów oraz koncepcję algorytmu szacowania. Na podstawie przyjętych informacji o areale poszczególnych upraw, nieużytków, obszarów leśnych oraz liczbie trzody chlewnej dokonano obliczeń wartości potencjału energetycznego dla jednej z gmin województwa opolskiego. Dla wybranych rodzajów biomasy zielonej i pochodzenia zwierzęcego wyznaczono potencjał teoretyczny i techniczny energii możliwej do uzyskania w wyniku jej odpowiedniego przetworzenia do nośnika energii w postaci ciepła. Wartość potencjału technicznego dla poszczególnych rodzajów biomasy odniesiono do całkowitego zapotrzebowania na ciepło grzewcze analizowanej gminy.

**Słowa kluczowe:** biomasa zielona, potencjał energetyczny, szacowanie potencjału, algorytm, zapotrzebowanie na ciepło

Lucie TRNKOVÁ<sup>1,2</sup>, Iva BOUŠOVÁ<sup>2</sup>, Lucie RYŠÁNKOVÁ<sup>1</sup>, Petra VRABCOVÁ<sup>1</sup>  
and Jaroslav DRŠATA<sup>1,2</sup>

## ANTIOXIDANTS AND ENVIRONMENTAL STRESS: SPECTROSCOPIC STUDY ON STABILITY OF NATURAL COMPOUNDS AND THEIR INTERACTION WITH A MOLECULE OF PROTEIN IN AN *IN VITRO* MODEL

### ANTYOKSYDANTY A STRES ŚRODOWISKOWY, BADANIA SPEKTRALNE STABILNOŚCI SUBSTANCJI NATURALNYCH I ICH ODDZIAŁYWANIE Z MOLEKUŁĄ BIAŁKA

**Abstract:** The stability of eight hydroxycinnamic acids (HCAs) during long-term incubation under physiological conditions was studied by UV-VIS absorption spectroscopy and their possibility of binding to a model protein (bovine serum albumin, BSA) under physiological conditions was investigated by tryptophan fluorescence quenching method. The obtained results suggest that the stability of hydroxycinnamic acids is dependent upon its individual structure and duration of incubation. The monosubstituted derivatives (coumaric acids) were stable within the course of long-term incubation, while di- and trisubstituted derivatives decomposed easily. It was found out that all studied compounds changed fluorescence emission spectrum of BSA. The Stern-Volmer analysis was employed in order to explore binding of HCAs to BSA in details. The binding constants ( $K_b$ ), number of binding sites ( $n$ ) and the free energy changes ( $\Delta G^0$ ) were determined. The binding affinity was strongest for rosmarinic acid and ranked in the following order rosmarinic acid > chlorogenic acid > sinapic acid > caffeic acid > ferulic acid > *o*-coumaric acid > *p*-coumaric acid > *m*-coumaric acid. All free energy changes ( $\Delta G^0$ ) possessed negative sign indicating the spontaneity of HCAs binding to BSA.

**Keywords:** oxidative stress, antioxidant, hydroxycinnamic acid, serum albumin, protein-ligand binding

There is a large amount of air pollutants in our environment and many of them show adverse oxidative effects on living organisms [1]. Although the properties of air pollutants vary markedly, they all have one common feature. They can cause oxidative stress, a state in which the prooxidant-antioxidant balance is seriously impaired. This imbalance can occur when the generation of reactive oxygen species overwhelms endogenous antioxidant systems. Oxidative stress can have serious impact on human health [1, 2]. Recently, considerable attention has been focused on the study of naturally occurring compounds with antioxidant effects (eg flavonoids, hydroxycinnamic acids, carotenoids) which can protect body against environmental pollutants. Hydroxycinnamic acids (HCAs) are natural compounds widely distributed in higher plants and are used in folk medicine because of their antioxidant and other effects [3, 4]. Serum albumin was used as a model protein because it is one of the most abundant proteins in circulatory system of a wide variety of organisms and one of the most extensively studied proteins at all. It possesses a wide range of physiological functions involving the binding, transport and deposition of many endogenous and exogenous ligands present in blood circulation [5, 6]. It is well known that

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Faculty of Education, University of Hradec Králové, Rokitanského 62, 500 03 Hradec Králové, Czech Republic, tel. +420 49 333 11 59, fax +420 49 333 11 66, email: lucie.trnkova@uhk.cz

<sup>2</sup>Department of Biochemical Sciences, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

many drugs are bound to serum albumin and that their effectiveness depends on their binding ability [6]. But on the other hand, drugs can cause various changes in protein conformation, which may influence its physiological function and these impaired proteins may be consequently pathologically accumulated in body tissues. Spectroscopic techniques are an ideal tool to observe conformational changes in structure of protein since it allows non-destructive measurements of compounds present at low concentration under physiological conditions. In the presented study the interactions of HCAs with the molecule of BSA were studied using UV-VIS absorption spectroscopy and fluorescence quenching method which is based on quenching of protein fluorescence by drug. The Stern-Volmer analysis is often used in order to analyze obtained data and to elucidate protein-drug (ligand) binding mechanism [7].

## Experimental

### *Chemicals and preparation of stock solutions*

Bovine serum albumin and all hydroxycinnamic acids (Fig. 1) were obtained from Sigma-Aldrich GmbH, Germany. All other chemicals were of analytical grade. Bovine serum albumin was dissolved in sodium phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 M; 0.05% sodium azide) in order to yield solution with concentration of 2  $\mu$ M for fluorescence spectroscopic experiments. Individual HCAs were dissolved in 20 mM NaOH in order to yield 10 mM stock solutions. BSA and HCA solutions were freshly prepared before each measurement.

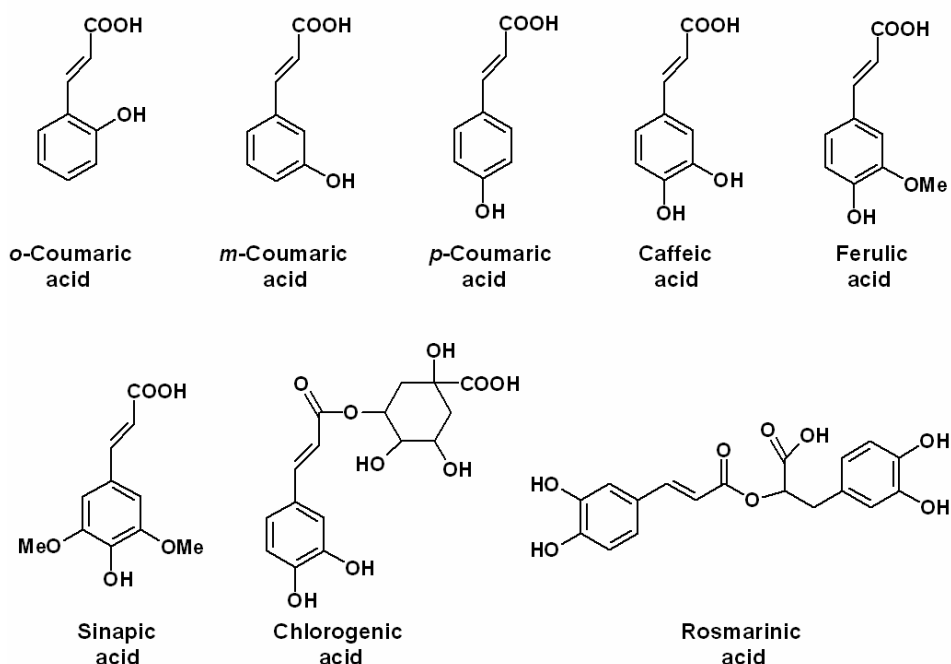


Fig. 1. Chemical structures of tested hydroxycinnamic acids

*UV-VIS absorption spectroscopy*

Absorption spectra were measured using spectrophotometers Lambda 25 (Perkin Elmer, United Kingdom) and Helios  $\beta$  (Spectronic Unicam, United Kingdom) in a 10 mm quartz cuvette. 50  $\mu\text{M}$  solutions of HCAs in sodium phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 M; 0.05% sodium azide) were incubated for up to 28 days at 37°C. The absorption UV-VIS spectra were recorded from 190 to 550 nm at the time 0, 1 hour and day 1, 7, 14, 21, and 28. The sample temperature was maintained at 37°C.

*Fluorescence spectroscopy*

Fluorescence spectra were recorded using a luminescence spectrometer LS 50B (Perkin Elmer, United Kingdom) in a 10 mm quartz Suprasil cuvette. Quantitative analysis of the potential interaction between individual HCA and BSA was performed by the fluorimetric titration. Briefly, solution of BSA (2  $\mu\text{M}$ ) was titrated in cuvette by successive additions of HCA solution (10 mM) to a final concentration of 20  $\mu\text{M}$ . Fluorescence emission spectra were recorded from 300 to 530 nm with excitation at 295 nm while stirring. The excitation and emission slits were both set to 5 nm and scanning speed to 200 nm/min. All experiments were carried out at 37°C. Fluorescence intensity was read at emission wavelength of 350 nm.

*Principles of fluorescence quenching*

Dynamic (collisional) quenching occurs when the excited-state fluorophore is deactivated upon contact with some other molecule (quencher) and no molecule is chemically altered during this process. In the case of static quenching, a non-fluorescent complex is formed between molecules of fluorophore and quencher. Collisional quenching of fluorescence is described by the well-known Stern-Volmer equation as follows [7]

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

In this equation,  $F_0$  and  $F$  are the fluorescence intensities of BSA in the absence and presence of quencher, respectively,  $[Q]$  is the quencher concentration,  $k_q$  is the bimolecular quenching constant, and  $\tau_0$  is the lifetime of the fluorophore in the absence of quencher. The Stern-Volmer quenching constant ( $K_{SV}$ ) is given by  $k_q \tau_0$ . The static and dynamic quenching can be distinguished by the Stern-Volmer diagram (dependence of  $F_0/F$  on quencher concentration). When the plot of Stern-Volmer diagram shows exponential dependence, both static and dynamic quenching is present. In case the plot shows linear dependence, the quenching is either purely static or dynamic. One criterion for distinguishing of type of quenching is the fact that the obtained bimolecular quenching constant  $k_q$  is larger than the limiting diffusion rate constant of the biomolecule ( $2.0 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) [7], and so the static quenching process can be postulated to obtain the binding parameters according to the following equation

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (2)$$

where  $K_b$  represents binding constant for quencher-protein interaction,  $n$  the number of binding sites per BSA, and  $F_0$ ,  $F$  have the same meaning as in Eq. (1). The values of  $K_b$  and

n could be measured from the intercept and slope by plotting  $\log (F_0 - F)/F$  against  $\log [Q]$  [2]. Utilizing  $K_b$ , the free energy change ( $\Delta G^0$ ) value can be estimated from the following equation [8]

$$\Delta G^0 = -R T \ln K_b \quad (3)$$

## Results and discussion

Changes in UV-VIS absorption spectra were employed to check stabilities of stock solutions of hydroxycinnamic acids. Each HCA has characteristic profile of its UV-VIS spectrum at physiological conditions (pH 7.40; 37°C). No changes in UV-VIS spectra of monosubstituted derivatives (coumaric acids) were observed during their incubation. Profile of spectrum of ferulic acid was not altered throughout the incubation, but the intensity of absorbance in maximum slowly decreased. The spectra of other four tested derivatives (caffeic, sinapic, chlorogenic, and rosmarinic acid) showed remarkable changes (Fig. 2) which suggest that these compounds were decomposed probably to catechol and its substituted derivatives within first 24 hours of incubation. It can be concluded that coumaric acids are stable within the course of long term incubation, while di- and trisubstituted derivatives decompose easily and therefore they are not suitable for long lasting experiments.

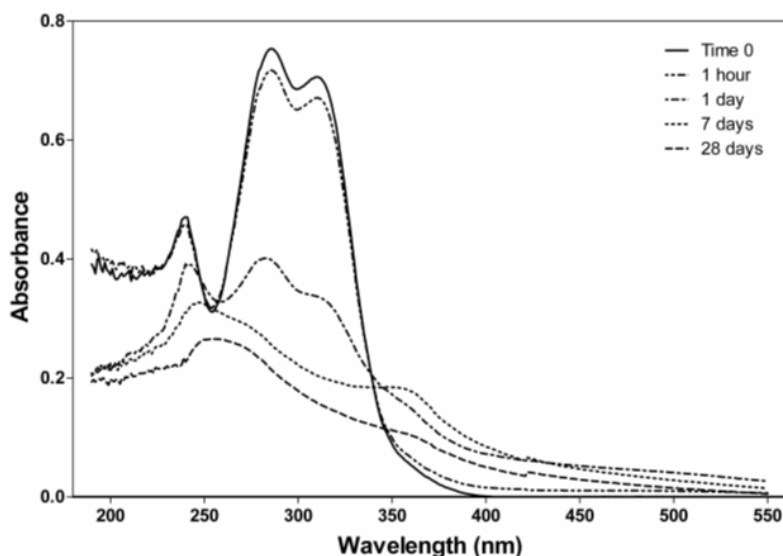


Fig. 2. Effect of long term incubation (28 days at 37°C) on characteristic UV-VIS absorption spectrum of 50  $\mu$ M caffeic acid in sodium phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 M; 0.05% sodium azide)

Quenching of protein intrinsic (tryptophan) fluorescence was employed for more detailed study of HCA-BSA binding. Fluorescence emission spectra were recorded upon excitation at 295 nm and possessed maximum at 350 nm. The excitation at 295 nm was used to ensure that the light was absorbed by tryptophan residues only [7]. Protein solution was titrated by successive additions of individual HCAs solutions. Fluorescence intensity

of BSA gradually decreased with increasing concentration of hydroxycinnamic acid (Fig. 3). This may indicate alterations in microenvironment around tryptophan residues in protein molecule upon interaction with tested compound. Red shifts of protein fluorescence emission bands in dependence on increasing concentration of tested compound were observed in the case of sinapic, chlorogenic and rosmarinic acids. Emission maximum of BSA was shifted by 2, 4 and 5 nm towards longer wavelength after BSA interaction with sinapic, chlorogenic, and rosmarinic acids in 20  $\mu\text{M}$  concentration, respectively. Significant red shifts by 12 and 18 nm were observed by other authors upon interaction of human serum albumin with sinapic acid [9] and chlorogenic acid [10] but the concentrations of tested compounds that caused so remarkable shifts of emission maxima were as much as 150  $\mu\text{M}$ . The red shift of protein emission band is caused by decrease in hydrophobic property of binding cavity near tryptophan in BSA suggesting that tryptophan has been brought to more hydrophilic environment [10] and protein secondary structure has been changed [11]. Other tested HCAs did not show any shifts in their spectra, which indicates that these HCAs can bind to BSA without affecting the immediate environment of the tryptophan residues [8].

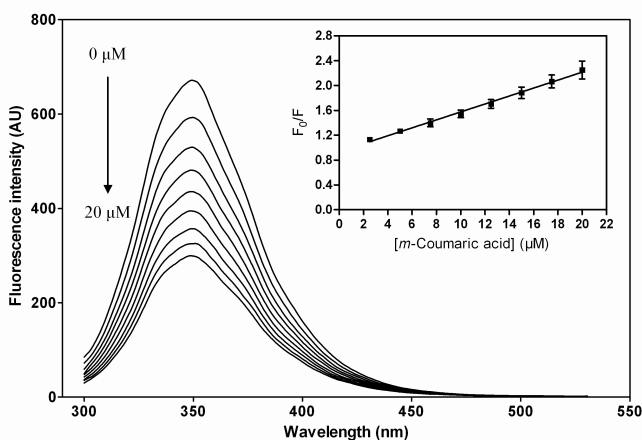


Fig. 3. Fluorescence emission spectra of BSA (2  $\mu\text{M}$ ) in the absence and in the presence of increasing amounts of *m*-coumaric acid (0–20  $\mu\text{M}$ ) in sodium phosphate buffer (pH 7.4; 0.1 M; 0.05% sodium azide) at  $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$  and 37°C. The insert shows the corresponding Stern-Volmer diagram of the *m*-coumaric acid-BSA system ( $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ ),  $R^2 = 0.9951$

The type of fluorescence quenching was determined using the Stern-Volmer diagrams. Apart from rosmarinic acid the linear dependence in the Stern-Volmer diagram was found out in all tested HCAs and type of quenching was distinguished by the bimolecular quenching constants ( $k_q$ ). In the case of rosmarinic acid the plot exhibited exponential dependence (Fig. 4) indicating that both static and dynamic type of quenching was asserted. The bimolecular quenching constants ( $k_q$ ) of the rosmarinic acid-BSA system were obtained from the linear range (concentrations of 0–10  $\mu\text{M}$ ) of the diagram. The bimolecular quenching constants of all HCAs (Table 1) were found to be higher than  $10^{10} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  [7] which is the maximum value of  $k_q$  for a diffusion controlled quenching process. This fact suggests that the static quenching mechanism between each

HCA and BSA is the main reason of protein fluorescence quenching and binding parameters can be determined according to the equation (2) (Fig. 5). The binding constants ( $K_b$ ), binding sites ( $n$ ) and free energy change ( $\Delta G^0$ ) are showed in Table 1. The binding affinity was the strongest for rosmarinic acid and ranked in the order rosmarinic acid > chlorogenic acid > sinapic acid > caffeic acid > ferulic acid > *o*-coumaric acid > *p*-coumaric acid > *m*-coumaric acid. The obtained results suggest that the binding affinity depends on the number and the position of hydroxyl groups. Di- and trisubstituted derivatives have stronger binding affinity than monosubstituted derivatives. Binding of rosmarinic acid to BSA proceeds the most easily due to higher number and suitable position of hydroxyl groups on the aromatic ring. The negative sign for  $\Delta G^0$  indicates that the binding of HCAs to the molecule of BSA is spontaneous process.

Table 1

The bimolecular quenching constants ( $k_q$ ), the binding constants ( $K_b$ ), the number of binding sites ( $n$ ) and the free energy change ( $\Delta G^0$ ) of the HCA-BSA system at 37°C

Tested compound	$k_q^1$ [ $\times 10^{13}$ dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	$K_b$ [ $\times 10^5$ dm <sup>3</sup> ·mol <sup>-1</sup> ]	$n$	$\Delta G^0$ [kJ·mol <sup>-1</sup> ]
<i>o</i> -coumaric acid	1.19	3.34	1.17	-32.73
<i>m</i> -coumaric acid	1.19	1.31	1.08	-30.36
<i>p</i> -coumaric acid	1.43	1.81	1.10	-30.98
caffeic acid	0.86	4.16	1.18	-33.12
ferulic acid	0.97	3.39	1.18	-32.75
sinapic acid	0.85	4.19	1.21	-33.36
chlorogenic acid	1.07	6.67	1.23	-34.55
rosmarinic acid	16.39 <sup>2</sup>	96.16	1.40	-41.43

Standard deviation (mean value of three independent measurements) was lower than 10%.

<sup>1</sup> $k_q = K_{SV}/\tau_0$ ;  $\tau_0 = 5 \times 10^{-9}$  s [7]

<sup>2</sup>assessed in the linear range (1÷10  $\mu$ M)

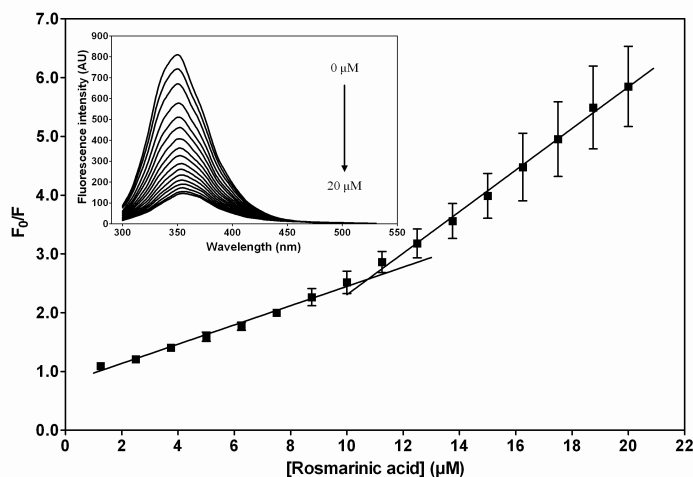


Fig. 4. The Stern-Volmer diagram of the rosmarinic acid-BSA system obtained by the titration with rosmarinic acid at physiological conditions (37°C; pH 7.4). [BSA] = 2  $\mu$ M, [rosmarinic acid] = 0÷20  $\mu$ M,  $\lambda_{ex}$  = 295 nm and  $\lambda_{em}$  = 350 nm.  $R_1^2$  = 0.9895 and  $R_2^2$  = 0.9957. The insert shows the corresponding fluorescence quenching spectra



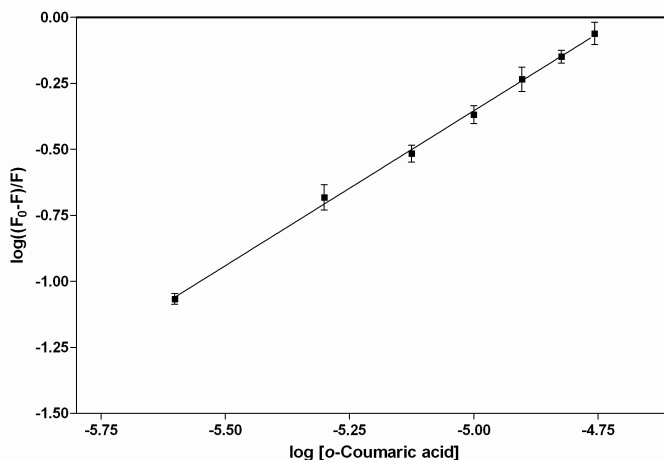


Fig. 5. Logarithmic plots of fluorescence quenching of BSA treated with different concentrations of *o*-coumaric acid at physiological conditions (37°C; pH 7.4). [BSA] = 2  $\mu$ M, [*o*-coumaric acid] = 0–20  $\mu$ M,  $\lambda_{\text{exc}}$  = 295 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  = 350 nm.  $R^2 = 0.9983$

## Conclusions

It can be concluded that coumaric acids are stable within the course of long term incubation, while di- and trisubstituted derivatives decompose easily and therefore they are not suitable for long lasting experiments. All HCAs are able to bind spontaneously to the protein molecule with different affinity depending on the number and the position of hydroxyl groups. This binding may influence physiological function of altered protein.

## Acknowledgements

The presented study was supported by the Specific research 2008 of the University of Hradec Králové and by the Development project of Czech Ministry of Education No. 141/2008.

## References

- [1] Kelly F.J.: Proc. Nutr. Soc., 2004, **63**, 579-585.
- [2] Stadtman E.R. and Levine R.L.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 2000, **899**, 191-208.
- [3] Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K. and Taniguchi H.: J. Agric. Food Chem., 2002, **50**, 2161-2168.
- [4] Halliwell B., Aeschbach R., Löliger J. and Aruoma O.I.: Food Chem. Toxicol., 1995, **33**(7), 601-617.
- [5] Peters T.: All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Academic Press, San Diego 1996.
- [6] Carter D.C. and Ho J.X.: Adv. Protein Chem., 1994, **45**, 153-203.
- [7] Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Press, New York 1999.
- [8] Liu Y., Xie M.X., Jiang M. and Wang Y.D.: Spectr. Acta Pt. A - Mol. Biomol. Spectr., 2005, **61**, 2245-2251.
- [9] Kang J., Liu Y., Xie M.X., Li S., Jiang M. and Wang Y.D.: Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj., 2004, **1674**, 205-214.
- [10] He W., Li Y., Xue Ch., Hu Z., Chen X. and Sheng F.: Bioorg. Med. Chem., 2005, **13**, 1837-1845.
- [11] Shang L., Jiang X. and Dong S.: J. Photochem. Photobiol. A - Chemistry, 2006, **184**, 93-97.

## **ANTYOKSYDANTY A STRES ŚRODOWISKOWY, BADANIA SPEKTRALNE STABILNOŚCI SUBSTANCJI NATURALNYCH I ICH ODDZIAŁYWANIE Z MOLEKUŁĄ BIAŁKA**

**Abstrakt:** Badano trwałość ośmiu kwasów hydrooksycynamonowych, HCAs, podczas inkubacji długoterminowej w warunkach fizjologicznych i możliwość ich wiązania się z modelowym białkiem (albuminą, BSA). Uzyskane wyniki pokazały, że trwałość tych kwasów zależy od ich indywidualnej budowy oraz czasu inkubacji. Wyznaczono stałe trwałości ( $K_b$ ), liczbę miejsc wiązania ( $n$ ) oraz zmianę wartości energii Gibbsa ( $\Delta G^0$ ) wiązania HCAs do BSA, który to proces przebiegał samorzutnie.

**Słowa kluczowe:** stres oksydacyjny, antyoksydant, kwas hydrooksycynamonowy, albumina (BSA), wiązanie białka z ligandem

Artykuły

Papers



Chemia  
ekologiczna

Ecological  
chemistry



Józef ANTONOWICZ<sup>1</sup>

## ÓŁÓW I KADM W MIKROWARSTWIE POWIERZCHNIOWEJ WODY PŁYTKIEGO JEZIORA DOŁGIE WIELKIE

### LEAD AND CADMIUM IN SURFACE MICROLAYERS OF SHALLOW LAKE DOŁGIE WIELKIE

**Abstrakt:** Próbkę mikrowarstwy powierzchniowej wody pobierano z lagunowego jeziora Dołgie Wielkie w cyklu kwartalnym w latach 2000-2004. Na jeziorze usytuowano trzy stanowiska badawcze reprezentujące część wschodnią, zachodnią i środkową. Próbkę wody pobierano trzema sposobami: techniką szklanej płyty (SM) zbierano mikrowarstwę powierzchniową wody o grubości około 0,1 mm. Technika siatki Garretta (GM) pobierano mikrowarstwę powierzchniową o grubości około 0,25 mm, licząc od powierzchni, natomiast warstwę wody podpowierzchniowej (SUB) pobierano z głębokości 15 cm. W pozyskanych próbkach oznaczono stężenie kadmu i ołowiu metodami spektrometrii atomowej ze wzbudzeniem elektromagnetycznym.

**Słowa kluczowe:** mikrowarstwa powierzchniowa, metale ciężkie, jezioro

Mikrowarstwa powierzchniowa stanowi interfazę występującą na powierzchni każdego zbiornika wodnego. Stanowi ona strefę wymiany między hydrosferą i atmosferą. Warstwa ta reprezentuje znikomą część środowiska wodnego, tworząc specyficzny ekoton na granicy tej strefy wymiany. Jest ona środowiskiem szczególnym pod względem chemicznym i fizycznym w porównaniu do wody podpowierzchniowej [1]. Cechą charakterystyczną tego ekotonu jest jego zdolność do kumulowania substancji chemicznych oraz mikroorganizmów w ilościach często znacznie większych niż obserwuje się w warstwie wody podpowierzchniowej [2, 3]. Mikrowarstwa powierzchniowa odgrywa ważną rolę w wymianie gazowej i transporcie różnych substancji z kolumny wody do atmosfery i na odwrót. Rozpuszczone substancje chemiczne i materia nierozpuszczona oraz mikroorganizmy są transportowane do tej unikatowej strefy przez dyfuzję prostą, unoszenie m.in. przez ruchy konwekcyjne z osadów dennych oraz wody podpowierzchniowej. W tym samym czasie mikrowarstwa powierzchniowa jest zasilana przez opad atmosferyczny w pyły i aerozole. Prowadzi to do akumulacji substancji chemicznych i mikroorganizmów w mikrowarstwie powierzchniowej wody [4].

Celem pracy było porównanie zdolności do kumulowania kadmu i ołowiu w mikrowarstwach powierzchniowych wody lagunowego bałtyckiego jeziora Dołgie Wielkie.

#### Materiały i metody

Badania prowadzono w lagunowym jeziorze Dołgie Wielkie usytuowanym na terenie Słowińskiego Parku Narodowego. Badane jezioro o powierzchni 156,4 ha i średniej głębokością 1,4 m zlokalizowane jest w zlewni typowo leśnej, która stanowi naturalną otulinę tego zbiornika wodnego [5]. Próbkę wody do badań w jeziorze Dołgie Wielkie pobierano w cyklu kwartalnym w latach 2000-2004 roku na trzech stanowiskach

<sup>1</sup> Zakład Chemii Środowiskowej, Akademia Pomorska, ul. adm. K. Arciszewskiego 22b, 76-200 Słupsk, email: antonowicz@apsl.edu.pl

badawczych: stanowisko 1 usytuowano we wschodniej części jeziora, stanowisko 2 w środkowej części, natomiast stanowisko 3 w części zachodniej.

Wodę do analiz pobierano trzema metodami:

- a) techniką szklanej płyty (SM) [6] zbierano wodę powierzchniową grubości około  $100 \pm 20 \mu\text{m}$ . Płytę zanurzano w wodzie i po ustabilizowaniu się powierzchni wody wyjmowano ją z prędkością od 5 do  $20 \text{ cm s}^{-1}$ ,
- b) techniką siatki Garretta (GM) [7] pobierano mikrowarstwę powierzchniową o grubości  $240 \pm 50 \mu\text{m}$ . Siatkę zanurzano w wodzie podobnie jak płytę szklaną i następnie wycieraczką ściągano wodę do pojemnika,
- c) wodę podpowierzchniową (PW) pobierano na głębokości 15 cm od lustra wody. Próbkę wody podpowierzchniowej pobierano jako próbkę porównawczą dla mikrowarstw pobranych poprzednimi metodami.

#### *Analiza chemiczna i statystyczna*

Zmineralizowane próbki wody oznaczano za pomocą spektrofotometru absorpcji atomowej Carl-Zeiss Jena AAS3. Do oznaczeń ołowiu i kadmu stosowano spektrofotometr absorpcji atomowej wyposażony w atomizer elektromagnetyczny EA3 i automatyczny podajnik próbek [8]. Program pracy elektromagnetycznego atomizera ustalano zgodnie ze wskazówkami zawartymi w instrukcji użytkownika [9] i wbudowanymi danymi w komputer pokładowy aparatu. W każdym przypadku przygotowywano odpowiednie skale wzorców i uwzględniano poprawkę na próbę zerową.

Analizę wariancji, której celem było porównanie warstwy wody podpowierzchniowej między trzema stanowiskami pobierania próbek pobranych z jeziora Dołgie Wielkie, wykonano za pomocą programu Statistica [10]. W celu porównania dwóch badanych środowisk: wody z mikrowarstwy powierzchniowej i wody podpowierzchniowej użyto współczynników wzbogacenia (EF), które obliczano ze wzoru:

$$EF = C_M / C_P$$

gdzie:  $C_M$  - stężenie analizowanego składnika w odpowiedniej mikrowarstwie powierzchniowej;  $C_P$  - stężenie tego samego składnika w wodzie podpowierzchniowej [1, 11].

#### **Wyniki i ich omówienie**

Jezioro Dołgie Wielkie charakteryzowało się wodą o średnim stężeniu kadmu  $0,55 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Największą jego zawartość zaobserwowano na stanowisku środkowym i była ona większa o 45% niż na pozostałych stanowiskach badawczych (tab. 1). Mimo tej różnicy, duża zmienność tej cechy spowodowała (duże wartości CV), że test ANOVA nie wykazał różnic między stanowiskami.

Średni współczynnik wzbogacenia EF obliczony dla jeziora Dołgie Wielkie wynosił odpowiednio 4,09 dla mikrowarstwy SM i 2,99 dla mikrowarstwy GM. Na stanowisku pierwszym  $EF_{SM}$  był największy (5,04), o 71% większy niż na stanowisku drugim (tab. 1). Natomiast współczynnik wzbogacenia dla mikrowarstwy GM w jeziorze Dołgie Wielkie był podobny na wszystkich stanowiskach. Średnie stężenie ołowiu w wodzie podpowierzchniowej Jeziora Dołgie Wielkie wynosiło  $2,32 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  i było podobne na wszystkich stanowiskach. Nie stwierdzono w tym jeziorze statystycznie istotnych różnic



między stanowiskami (tab. 2). Zawartość ołowiu w mikrowarstwach SM i GM badanych jezior zawsze była większa niż w wodzie podpowierzchniowej.

Tabela 1

Stężenia średnie kadmu [ $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ] w jeziorze Dołgie Wielkie; średnia arytmetyczna (X), rozstęp (R), odchylenie standardowe (SD), współczynnik zmienności (CV), współczynnik wzbogacenia (EF), analiza wariancji ANOVA obliczona dla warstwy PW porównująca stanowiska pobierania próbek

Table 1

Cadmium concentration [ $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ] in waters of Lake Dołgie Wielkie; arithmetic mean (X), range (R), standard deviation (SD), coefficient of variation (CV), enrichment factor (EF), analysis of variance ANOVA and Tukey's test calculated for the PW layers, comparing sampling stations

	<b>X</b>	<b>R</b>	<b>SD</b>	<b>CV [%]</b>	<b>EF</b>
1SM	1,65	4,59	1,25	75,9	5,04
1GM	1,15	2,64	0,75	64,7	2,91
<b>1PW</b>	<b>0,46</b>	<b>0,83</b>	<b>0,28</b>	<b>60,2</b>	
2SM	1,58	3,10	1,01	63,6	2,94
2GM	1,35	2,86	0,95	70,1	2,83
<b>2PW</b>	<b>0,69</b>	<b>2,28</b>	<b>0,58</b>	<b>83,8</b>	
3SM	1,35	2,45	0,68	50,4	4,28
3GM	1,19	2,58	0,86	72,7	3,22
<b>3PW</b>	<b>0,49</b>	<b>1,16</b>	<b>0,32</b>	<b>66,5</b>	
wartości uśrednione dla całego jeziora:				X	EF
SM				1,53	4,09
GM				1,23	2,99
<b>PW</b>				<b>0,55</b>	
ANOVA (PW)		df = 45, F = 1,46, p > 0,05		ns	

Tabela 2

Stężenia średnie ołowiu [ $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ] w jeziorze Dołgie Wielkie; średnia arytmetyczna (X), rozstęp (R), odchylenie standardowe (SD), współczynnik zmienności (CV), współczynnik wzbogacenia (EF), analiza wariancji ANOVA obliczona dla warstwy PW porównująca stanowiska pobierania próbek

Table 2

Lead concentration [ $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ] in waters of Lake Dołgie Wielkie; arithmetic mean (X), range (R), standard deviation (SD), coefficient of variation (CV), enrichment factor (EF), analysis of variance ANOVA and Tukey's test calculated for the PW layers, comparing sampling stations

	<b>X</b>	<b>R</b>	<b>SD</b>	<b>CV [%]</b>	<b>EF</b>
1SM	3,54	7,26	1,73	49,2	1,87
1GM	4,13	8,29	1,97	47,7	2,64
<b>1PW</b>	<b>2,47</b>	<b>5,15</b>	<b>1,35</b>	<b>54,6</b>	
2SM	4,79	13,50	3,39	70,7	2,25
2GM	4,48	13,70	3,28	73,1	2,12
<b>2PW</b>	<b>2,29</b>	<b>4,41</b>	<b>1,19</b>	<b>52,2</b>	
3SM	3,90	6,71	1,85	47,3	1,92
3GM	4,19	12,54	2,88	68,8	2,60
<b>3PW</b>	<b>2,19</b>	<b>4,09</b>	<b>1,05</b>	<b>48,1</b>	
wartości uśrednione dla całego jeziora:				X	EF
SM				4,08	2,01
GM				4,27	2,45
<b>PW</b>				<b>2,32</b>	
ANOVA (PW)		df = 45, F = 0,21, p > 0,05		ns	

W jeziorze Dołgie Wielkie średni współczynnik wzbogacenia dla mikrowarstwy powierzchniowej SM wyniósł 2,01 i był mniejszy niż ten obserwowany w mikrowarstwie GM (2,45) (tab. 2). W przypadku ołowiu największe współczynniki wzbogacenia obserwowano w warstwie GM na stanowiskach 1 i 3. Interesujące jest, że na stanowisku środkowym, gdzie obserwowano największy współczynnik wzbogacenia w mikrowarstwie  $EF_{SM} = 2,25$ , stwierdzono najmniejszy współczynnik wzbogacenia  $EF_{GM} = 2,12$ . Mogło to być spowodowane przemieszczaniem się ołowiu z warstw niższych (GM) do wyższych (SM). Zamieszczone w tabeli 3 współczynniki wzbogacenia potwierdzają możliwość zasilania mikrowarstw powierzchniowych ołowiem z niżej położony partii wody.

Tabela 3  
Współczynniki korelacji dla Cd i Pb między mikrowarstwą SM i warstwą PW oraz mikrowarstwą GM i warstwą PW (n = 48, podkreślono współczynniki korelacji statystycznie istotne,  $p < 0,05$ )

Table 3  
Correlation coefficients for Cd and Pb between microlayer SM and the PW layer, and microlayer GM and the PW layer (n = 48, statistically significant correlation coefficients are underlined,  $p < 0.05$ )

	Cd	Pb
Dołgie W. SM	0,16	<u>0,59</u>
Dołgie W. GM	0,24	<u>0,32</u>

Z literatury [4, 12-14] wynika, że materiał dostaje się do interfejsu woda - powietrze z toni wodnej i z atmosfery. Z atmosfery substancje przenikają do powierzchniowych mikrowarstw wody poprzez opady lub w wyniku porywania składników powietrza przez rozpryskujące się fale. Z prac prowadzonych na terenie środkowego Pomorza wynika, że współczynniki korelacji uzyskane dla jezior polskiego Pomorza wskazują na kumulację substancji w mikrowarstwie powierzchniowej pochodzących w głównej mierze z hydrosfery [1, 15]. Tabela 3 przedstawia wyniki korelacji obliczonych dla Cd i Pb uzyskanego w badanym wieloleciu między mikrowarstwami a wodą podpowierzchniową. Jak wyżej wspomniano, statystycznie istotne współczynniki korelacji uzyskane dla ołowiu wskazują, że większość tych związków w mikrowarstwie prawdopodobnie pochodzi z toni wodnej. W przypadku kadmu w jeziorze Dołgie Wielkie nie uzyskano związku korelacyjnego w zawartości tego składnika w wodzie podpowierzchniowej i analizowanych warstwach. Dlatego należy sądzić, że prawdopodobnie jego źródłem są opady atmosferyczne. Możliwość zasilania mikrowarstwy powierzchniowej w kadm potwierdza bardzo duża zawartość tego pierwiastka w opadach atmosferycznych mierzonych w okolicach Trójmiasta i Świnoujścia [16].

### Podsumowanie

Kadm i ołów kumuluje się w mikrowarstwach powierzchniowych analizowanego jeziora w ilościach większych niż obserwuje się w wodzie podpowierzchniowej. Kadm w największych ilościach kumulował się w mikrowarstwie pobranej techniką szklanej płyty, natomiast ołów techniką siatki Garretta.

## Podziękowanie

Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi drowi hab. Janu Trojanowskiemu za wszechstronną pomoc w realizacji tej pracy.

## Literatura

- [1] Trojanowski J., Trojanowska C. i Antonowicz J.: *Nitrogen and phosphorus in surface microlayers of the lake Gardno*. *Ecohydrol. & Hydrobiol.*, 2001, **1**(4), 457-453.
- [2] Antonowicz J.: *Daily changes in concentrations of selected heavy metals in relation to chlorophyll content in surface water microlayer of lake Gardno*. *Ecol. Chem. Eng. S*, 2008, **15**(4), 473-481.
- [3] Estep K., Maki J., Danos S. i Remson C.: *The retrieval of material from the surface microlayer with screen and plate samples and its implications for partitioning of material within the microlayer*. *Freshwater Biol.*, 1985, **15**, 15-19.
- [4] Norkrans B.: *Surface microlayer in aquatic environments*, *Adv. Microb. Ecol.*, 1980, **4**, 51-85.
- [5] *Przyroda Słowińskiego Parku Narodowego*, H. Piotrowska (red.). WN Bogucki, Poznań-Gdańsk 1997.
- [6] Harvey G. i Buzzell L.: *A simple microlayer method for small samples*. *Limnol. Oceanogr.* 1972, **17**, 156-157.
- [7] Garrett W.: *Collection of slick forming materials from the sea surface*. *Limnol. Oceanogr.*, 1965, **10**, 602-605.
- [8] *Spektrofotometr absorpcji atomowej AAS3*, Instrukcja użytkownika. Carl Zeiss Jena, 1984.
- [9] *Elektromagnetyczny atomizer ETA*, Instrukcja użytkownika. Carl Zeiss Jena, 1984.
- [10] Stanisław A.: *Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA\_PL na przykładach z medycyny*. StatSoft Polska Sp. z o.o., Kraków 1998.
- [11] Guitart C., Garcia-Flor N., Dachs J., Bayona J. i Albaigas J.: *Evaluation of sampling devices for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface microlayer coastal waters*. *Mar. Pollut. Bull.*, 2004, **48**, 961-968.
- [12] Estep K. i Remsen C.: *Influence of the surface microlayer on nutrients, chlorophyll and algal diversity of a small eutrophic bog pond*. *Hydrobiology.*, 1985, **121**, 203-213.
- [13] Maki J. i Hermansson M.: *The dynamics of surface microlayers in aquatic environments*. [w:] *The biology of particles in aquatic systems*. Wotton R.S. (red.). Lewis Publishers, 1994, **7**, 161-181.
- [14] Grammatika M. i Zimmerman W.: *Microhydrodynamics of flotation processes in the sea surface layer*. *Dynam. Atmos. Oceans.*, 2001, **34**, 327-348.
- [15] Antonowicz J. i Trojanowski J.: *Accumulation of zinc and copper in surface water microlayers and in subsurface water of inland lake Jasień*. *Ecol. Chem. Eng.* (in press).
- [16] Szefer P. i Szefer K.: *Some metals and their possible sources in rain water of the southern Baltic coast, 1976 and 1978-1980*. *Sci. Total Environ.*, 1986, **57**, 79-89.

## LEAD AND CADMIUM IN SURFACE MICROLAYERS OF SHALLOW LAKE DOŁGIE WIELKIE

**Abstract:** Samples of surface water microlayer were collected from a lagoon lake Dołgie Wielkie on a quarterly basis in the years 2000-2004. Three experimental stations were located on the lake, representing the eastern, western and central part. Water samples were collected by three methods: using a glass plate (SM) the surface water microlayer approx. 0.1 mm thick was sampled. The Garrett mesh (GM) was used to sample the surface microlayer with a thickness of approx. 0.25 mm counting from the surface and the subsurface water layer (SUB) sampled from a depth of 15 cm. In collected samples the concentration of cadmium and lead was determined by atomic spectrometry with electromagnetic excitation.

**Keywords:** surface microlayer, heavy metals, lake



Józef ANTONOWICZ<sup>1</sup> i Jan TROJANOWSKI<sup>1</sup>

## KADM I MANGAN W MIKROWARSTWIE POWIERZCHNIOWEJ I W WODZIE PODPOWIERZCHNIOWEJ ESTUARIOWEGO JEZIORA GARDNO

### CADMIUM AND MANGANESE IN SURFACE MICROLAYER AND IN SUBSURFACE WATER OF ESTUARINE LAKE GARDNO

**Abstrakt:** Badając wpływ zasolenia na stężenie kadmu i manganu w mikrowarstwie powierzchniowej wody, próbki tej mikrowarstwy pobierano z estuariowego jeziora Gardno w cyklu kwartalnym przez okres 4 lat. Na jeziorze usytuowano trzy stanowiska badawcze w reprezentatywnych jego punktach. Jezioro Gardno jest zbiornikiem estuariowym i można w nim wyróżnić trzy zasadnicze strefy o różnym zasoleniu. W zależności od stosowanej techniki pobierania próbek wody zbierano mikrowarstwę powierzchniową wody o grubości około 0,1 mm i około 0,25 mm. Wodę podpowierzchniową pobierano na głębokości 15 cm od lustra wody. W pozyskanych próbkach wyznaczono stężenie kadmu i manganu metodami spektrometrii atomowej.

**Słowa kluczowe:** mikrowarstwa powierzchniowa, metale ciężkie, jezioro estuariowe

Mikrowarstwa powierzchniowa wody jest cienką warstwą występującą na styku powierzchni wody i atmosfery. Warstwa ta reprezentuje znikomą część środowiska wodnego, tworząc specyficzny ekoton na granicy tych dwóch stref. Jest ona środowiskiem szczególnym pod względem chemicznym i fizycznym, i w zasadniczy sposób różniącym się od wody podpowierzchniowej [1, 2]. Mikrowarstwa powierzchniowa odgrywa ważną rolę w wymianie gazowej oraz transporcie różnych substancji z kolumny wody do atmosfery i na odwrót. Rozpuszczone substancje, cząstki i mikroorganizmy są transportowane do tej unikatowej strefy przez dyfuzję prostą i unoszenie, m.in. przez ruchy konwekcyjne, z osadów dennych oraz z toni wodnej. W tym samym czasie mikrowarstwa powierzchniowa jest również zasilana przez opad atmosferyczny, pyły i aerozole. Prowadzi to do akumulacji różnych substancji chemicznych i mikroorganizmów w mikrowarstwie powierzchniowej wody [3].

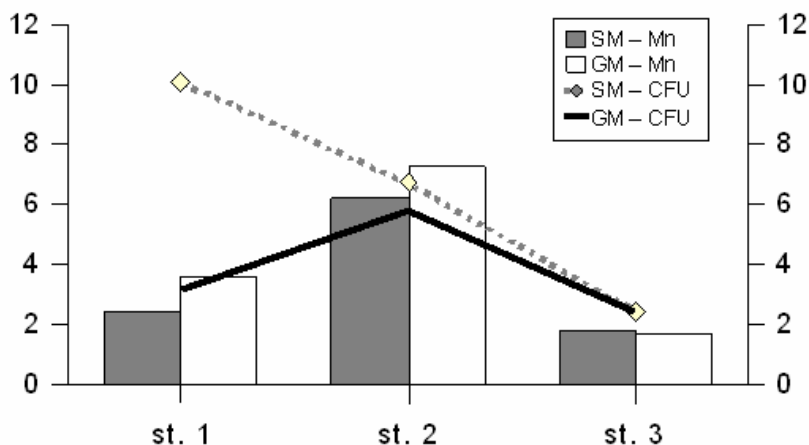
Celem pracy było porównanie zdolności do kumulowania mikrowarstw powierzchniowych wody jeziora Gardno w kadmu i manganu w trzech rejonach jeziora, charakteryzujących się różnym stopniem wymieszania wody słodkiej z morską.

#### Materiały i metody

Obiektem badań było estuariowe jezioro Gardno, które cechuje się powierzchnią 2468 ha, niewielką głębokością średnią 1,3 m i maksymalną 2,6 m oraz słonawymi wodami [4]. Współrzędne geograficzne jeziora wynoszą: szerokość geograficzna 53°39,4', długość geograficzna 17°07,1'. Na jeziorze usytuowano trzy stanowiska badawcze (rys. 1). Pierwsze u ujścia rzeki Łupawy do jeziora, gdzie wody jeziora wykazują cechy lądowe, drugie w części środkowej, a trzecie w pobliżu kanału łączącego jezioro z Morzem Bałtyckim. Na stanowisku trzecim obserwowano największe stężenie jonów chlorkowych ze względu na

<sup>1</sup>Zakład Chemii Środowiskowej, Akademia Pomorska, ul. adm. K. Arciszewskiego 22, 76-200 Słupsk, email: antonowicz@apsl.edu.pl

silne mieszanie się wód morskich z jeziornymi podczas silnych wiatrów i sztormów, powodujących wlewanie się wód Morza Bałtyckiego do jeziora.



Rys. 1. Współczynniki wzbogacenia mikrowarstwy powierzchniowej SM i GM w bakterie heterotroficzne [21] i manganu w jeziorze Gardno

Fig. 1. Enrichment factors of surface microlayer enrichment SM and GM in heterotrophic bacteria [21] and manganese in Lake Gardno

Próbki wody do analiz pobierano przez 4 lata od 1998 do 2002, w cyklu kwartalnym, trzema metodami:

- techniką szklanej płyty (SM) [5] zbierano wodę powierzchniową o grubości około  $(100 \pm 20) \mu\text{m}$ . Płytę zanurzano w wodzie i po ustabilizowaniu się powierzchni wody wyjmowano ją z prędkością około  $15 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ;
- techniką siatki Garretta (GM) [6] pobierano mikrowarstwę powierzchniową o grubości  $(240 \pm 50) \mu\text{m}$ . Siatkę zanurzano w wodzie podobnie jak płytę szklaną i następnie wycieraczką ściągano wodę do pojemnika;
- wodę podpowierzchniową (PW) pobierano do szklanego pojemnika na głębokości 15 cm od lustra wody. Próbki wody podpowierzchniowej pobierano jako próbkę porównawczą dla mikrowarstw pobranych poprzednimi metodami.

### Analiza chemiczna i statystyczna

Zmineralizowane próbki wody oznaczano za pomocą spektrofotometru absorpcji atomowej Carl - Zeiss Jena AAS3. Analizę wykonywano w płomieniu acetylenowo-tlenowym przy długości fali  $\lambda = 279,5 \text{ nm}$  dla manganu [7]. Do oznaczeń kadmu stosowano przystawkę z atomizerem elektromagnetycznym EA3 i automatycznym podajnikiem próbek [8]. Analizę wykonywano przy długości fali  $\lambda = 228,8 \text{ nm}$ .

Analizę wariancji wraz z testem Tukeya, której celem było porównanie warstwy wody podpowierzchniowej między trzema stanowiskami pobierania próbek z jeziora Gardno, wykonano w programie Statistica [9]. Zdolność kumulacyjną badanych mikrowarstw

powierzchniowej wody w odniesieniu do kadmu i manganu analizowano, używając współczynników wzbogacenia ( $EF$ ), które obliczano z wzoru:

$$EF = C_M / C_P$$

gdzie:  $C_M$  - stężenie analizowanego składnika w odpowiedniej mikrowarstwie powierzchniowej;  $C_P$  - stężenie tego samego składnika w wodzie podpowierzchniowej [1, 10].

### Wyniki oraz ich omówienie i analiza

Jeziorno Gardno, łącząc się z Morzem Bałtyckim, okresowo zasilane jest wodami morskimi, w związku z czym można w nim wyróżnić trzy strefy o różnym zasoleniu. W pierwszej strefie (st. 1) dominują wody słodkie, które charakteryzują się najniższym stężeniem jonów  $Cl^-$ . W strefie środkowej (st. 2) stężenie tych jonów jest pośrednie, a największe ich stężenie obserwowano w trzeciej strefie (st. 3), będącej pod największym wpływem wody morskiej [1].

Tabela 1

Stężenie kadmu [ $\mu g \cdot dm^{-3}$ ] w wodach jeziora Gardno; średnia arytmetyczna ( $X$ ), rozstęp ( $R$ ), odchylenie standardowe ( $SD$ ), współczynnik zmienności ( $CV$ ), współczynnik wzbogacenia ( $EF$ ), analiza wariancji ANOVA oraz test Tukeya obliczony dla warstwy PW, porównujący stanowiska pobrania próbek

Table 1

Cadmium concentration [ $\mu g \cdot dm^{-3}$ ] in waters of Lake Gardno; arithmetic mean ( $X$ ), range ( $R$ ), standard deviation ( $SD$ ), coefficient of variation ( $CV$ ), enrichment factor ( $EF$ ), analysis of variance ANOVA and Tukey's test calculated for the PW layers, comparing sampling stations

	<b>X</b>	<b>R</b>	<b>SD</b>	<b>CV [%]</b>	<b>EF</b>
1SM	2,75	11,93	3,51	127,4	3,11
1GM	3,25	10,42	2,88	88,4	4,15
<b>1PW</b>	<b>0,82</b>	<b>0,89</b>	<b>0,28</b>	<b>33,4</b>	
2SM	1,65	1,67	0,47	28,7	6,82
2GM	1,35	1,88	0,48	35,7	4,52
<b>2PW</b>	<b>0,42</b>	<b>0,88</b>	<b>0,27</b>	<b>63,3</b>	
3SM	2,13	1,65	0,55	26,1	4,73
3GM	2,16	3,46	1,12	51,6	5,49
<b>3PW</b>	<b>0,68</b>	<b>0,78</b>	<b>0,30</b>	<b>45,1</b>	

ANOVA (PW)	df = 33, F = 6,30, p < 0,01	**
Test Tukeya	* (st. 2 - st. 1); ** (st. 2 - st. 3)	

W tabeli 1 przedstawiono średnie stężenia kadmu w badanych warstwach wody jeziora Gardno, a w tabeli 2 - stężenia manganu. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zawartość obydwóch pierwiastków była większa w mikrowarstwach powierzchniowej wody niż w warstwie wody podpowierzchniowej (tabela 1 i 2). Sytuacja taka zgodna jest z wynikami badań prowadzonych [11-16] zarówno w wodach morskich, jak i w wodach słodkich. Wynika to prawdopodobnie z większych zdolności absorpcyjnych i wiążących zawartych w mikrowarstwie powierzchniowej substancji chemicznych i mikroorganizmów.

Tabela 2

Stężenie manganu [ $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ] w wodach jeziora Gardno; średnia arytmetyczna (X), rozstęp (R), odchylenie standardowe (SD), współczynnik zmienności (CV), współczynnik wzbogacenia (EF), analiza wariancji ANOVA oraz test Tukeya obliczony dla warstwy PW porównujący stanowiska pobrania próbek

Table 2

Manganese concentration [ $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ] in waters of Lake Gardno; arithmetic mean (X), range (R), standard deviation (SD), coefficient of variation (CV), enrichment factor (EF), analysis of variance ANOVA and Tukey's test calculated for the PW layers, comparing sampling stations

	X	R	SD	CV [%]	EF
1SM	101,94	291,52	77,95	76,5	2,41
1GM	151,90	282,70	92,13	60,7	3,61
<b>1PW</b>	<b>82,77</b>	<b>231,94</b>	<b>79,25</b>	<b>95,8</b>	
2SM	144,67	331,25	88,30	61,0	6,20
2GM	198,50	887,76	233,61	117,7	7,25
<b>2PW</b>	<b>76,33</b>	<b>254,13</b>	<b>72,88</b>	<b>95,5</b>	
3SM	329,41	1119,85	296,70	90,1	1,86
3GM	298,86	883,83	244,67	81,9	1,71
<b>3PW</b>	<b>174,10</b>	<b>219,85</b>	<b>59,51</b>	<b>34,2</b>	

ANOVA (PW)	df = 33, F = 7,11, p < 0,01	**
Test Tukeya	st. 3 - st. 1 i st. 3 - st. 2	**

Analizując stężenie kadmu i manganu w badanych warstwach wody powierzchniowej jeziora Gardno w zależności od stanowiska, należy stwierdzić, że stężenie kadmu było najniższe zarówno w mikrowarstwach, jak i wodzie podpowierzchniowej w strefie środkowej jeziora (st. 2). W przypadku tego metalu wyraźnie uwidacznia się korelacja między jego koncentracją w wodzie podpowierzchniowej a koncentracją w mikrowarstwach, co sugeruje, że kadm w omawianym jeziorze migruje do mikrowarstwy powierzchniowej głównie z toni wodnej, do której dostaje się prawdopodobnie z osadów dennych. Takiej zależności nie obserwowano w przypadku manganu. Koncentracja tego metalu w mikrowarstwach wzrastała w miarę wzrostu zasolenia wody. Natomiast w wodzie podpowierzchniowej stężenie tego metalu, podobnie jak kadmu, było najniższe w strefie środkowej (st. 2).

Wyznaczone współczynniki wzbogacenia (tabele 1 i 2) pozwalają określić zdolność kumulacyjną badanych mikrowarstw powierzchniowej wody jeziornej w stosunku do kadmu i manganu. Uzyskane średnie współczynniki wzbogacenia dla kadmu wzrastały wraz ze zwiększającym się stężeniem jonów chlorkowych (tab. 1). Szczególnie wyraźnie jest to widoczne w mikrowarstwie GM, dla której wartość EF wzrasta od 4,15 (st. 1) do 5,49 (st. 3). Z przeglądu literaturowego dotyczącego badań mikrowarstwy wynika, że współczynniki wzbogacenia mikrowarstwy powierzchniowej wody morskiej dla większości metali są większe niż obserwowane w jeziorach o wodach słodkich [17]. Dlatego też można sądzić, że zmieniające się zasolenie wpływało na kumulację kadmu, szczególnie w mikrowarstwie GM. Duży współczynnik wzbogacenia kadmu w warstwie SM na st. 2 koreluje z wysokim współczynnikiem obserwowanym w tym miejscu dla manganu. W przypadku obu mikrowarstw analizowanych pod względem zawartości manganu obserwuje się najwyższy współczynnik wzbogacenia w strefie środkowej jeziora (SM = 6,20 i GM = 7,25), a najniższy w strefie o największych cechach morskich (st. 3).



Prawdopodobnie ważnym czynnikiem wpływającym na kumulację kadmu i manganu w mikrowarstwie powierzchniowej jeziora Gardno jest zasolenie oraz towarzysząca temu obecność różnych grup mikroorganizmów o różnych preferencjach do zasolenia. W przypadku manganu małe wzbogacenie warstwy SM w stosunku do GM w jeziorze Gardno można wiązać z wpływem wody morskiej i zachowaniem mikroorganizmów. Wpływ ten jest wyraźnie widoczny w przypadku mikrowarstwy GM. Współczynniki wzbogacenia w tej mikrowarstwie korelują ze współczynnikami wzbogacenia dotyczącymi liczebności bakterii heterotroficznych (CFU) (rys. 1). Na stanowisku drugim tego jeziora obserwowano wyjątkowo wysokie współczynniki wzbogacenia zarówno dla Mn, jak i CFU (odpowiednio  $EF_{GM} = 7,25$  i  $EF_{GM} = 5,82$ ), mimo że stężenie manganu w wodzie podpowierzchniowej na tym stanowisku jest mniejsze niż na stanowiskach 1 i 3. Jednocześnie liczebność bakterii heterotroficznych, mimo że jest najmniejsza w tym rejonie, wykazuje również wysokie współczynniki wzbogacenia w tej mikrowarstwie. W tym przypadku mangan, jako pierwiastek niezbędny do życia, prawdopodobnie stymuluje liczebność bakterii w mikrowarstwie powierzchniowej tego jeziora. Być może przyczyną dużej liczby bakterii heterotroficznych w mikrowarstwie SM na stanowisku 1 jest większe stężenie substancji biogennych [18] kumulujących się w tej mikrowarstwie niż w mikrowarstwie GM, stąd na stanowisku 1 zmiany wartości CFU i Mn nie pokrywają się. W literaturze [19-21] znane są przykłady, gdzie liczebność bakterii heterotroficznych zależna jest od stężenia metali ciężkich rozpuszczonych w wodzie będącej środowiskiem życia tych organizmów.

## Wnioski

Kadm i mangan wykazują zdolność do kumulowania się w mikrowarstwach powierzchniowych jeziora Gardno w ilościach znacznie większych niż występują w wodzie podpowierzchniowej. Stężenie kadmu w mikrowarstwach powierzchniowych tego jeziora zależy głównie od jego stężenia w wodzie podpowierzchniowej. Zdolność do wzbogacania mikrowarstwy powierzchniowej w przypadku kadmu zależna było od mieszania się wody morskiej z wodą słodką. Natomiast w przypadku manganu prawdopodobnie czynnikiem stymulującym wzbogacanie oprócz wody morskiej były bakterie heterotroficzne.

## Literatura

- [1] Trojanowski J., Trojanowska C. i Antonowicz J.: *Ecohydrol. & Hydrobiol.*, 2001, **1**(4), 457-453.
- [2] Antonowicz J.: *Daily changes in concentrations of selected heavy metals in relation to chlorophyll content in surface water microlayer of lake Gardno*. *Ecol. Chem. Eng. S*, 2008, **15**(4), 473-482.
- [3] Norkrans B.: *Adv. Microb. Ecol.*, 1980, **4**, 51-85.
- [4] Lipczyński W. (red.): *Związek miast i gmin dorzecza rzeki Słupi i Łupawy. Zasoby przyrodnicze Dorzecza Słupi i Łupawy*. WFOŚiGW w Gdańsku, Słupsk 2002.
- [5] Harvey G. i Burzell L.: *Limnol. Oceanogr.*, 1972, **17**, 156-157.
- [6] Garrett W.: *Limnol. Oceanogr.*, 1965, **10**, 602-605.
- [7] *Spektrofotometr absorpcji atomowej AAS3*. Instrukcja użytkownika. Carl Zeiss Jena 1984.
- [8] *Elektromagnetyczny atomizer ETA*. Instrukcja użytkownika. Carl Zeiss Jena 1984.
- [9] Stanisław A.: *Przystępny kurs statystyki w oparciu o program STATISTICA\_PL na przykładach z medycyny*. StatSoft Polska Sp. z o.o., Kraków 1998.
- [10] Guitart C., Garcia-Flor N., Dachs J., Bayona J. i Albaigas J.: *Mar. Pollut. Bull.*, 2004, **48**, 961-968.
- [11] Elzerman A.W. i Armstrong D.E.: *Limnol. Oceanogr.*, 1979, **24**, 133-144.
- [12] Brüggemann L., Bernard P. i van Grieken R.: *Mar. Chem.*, 1992, **38**, 303-323.
- [13] Hong H. i Lin J.: *Acta Oceanol. Sin.*, 1990, **9**, 81-90.

- [14] Migon C. i Nicolas E.: *Mar. Pollut. Bull.*, 1998, **36**, 273-277.
- [15] Grotti M., Soggia F., Abelmochi M., Rivaro P., Magi E. i Frache L.: *Mar. Chem.*, 2001, **76**, 189-209.
- [16] Hardy J., Crecelius E., Antrim L., Kiesser S. i Broadhurst V.: *Mar. Chem.*, 1990, **28**, 333-351.
- [17] Antonowicz J. i Trojanowski J.: *Accumulation of zinc and copper in surface water microlayers and in subsurface water of inland lake Jasień*. *Ecol. Chem. Eng.* (przesłane do publikacji).
- [18] Mudryk Z., Trojanowski J., Antonowicz J. i Skórczewski P.: *Polish J. Environ. Stud.*, 2002, **12**(2), 199-206.
- [19] Mudryk Z., Donderski W., Skórczewski P. i Walczak M.: *Oceanolog. Stud.*, 2000, **29**, 89-99.
- [20] Rumbold D. i Snedaker S.: *Mar. Environ. Res.*, 1999, **47**, 457-472.
- [21] Antonowicz J., Mudryk Z., Trojanowski J. i Dwulit M.: *Concentrations of heavy metals and bacterial numbers and productivity in surface and subsurface water layers in coastal lake Dołgie Wielkie*. *Ecol. Chem. Eng.* (przesłane do publikacji).

### **CADMIUM AND MANGANESE IN SURFACE MICROLAYER AND IN SUBSURFACE WATER OF ESTUARINE LAKE GARDNO**

**Abstract:** In order to investigate the effect of salinity level on the concentration of cadmium and manganese in the surface microlayer, several samples were collected from an estuarine lake Gardno in a quarterly cycle over the period of four years. Three testing stations were established in locations typical of this lake. In the lake, one can distinguish three areas with various levels of salinity, with a sampling site for each of these areas. The volume of water taken as samples varied, depending on the techniques used. During the experiment, surface microlayer samples of ca 0.1 and 0.25 mm were obtained. The subsurface water was obtained at the depth of 15 cm. The collected samples were analysed with an atomic spectrometer in order to determine the concentration of cadmium and manganese.

**Keywords:** surface microlayer, heavy metals, estuarine lake

Beata BOBEK<sup>1</sup>, Aleksandra SMYŁŁA<sup>1</sup>, Piotr RYCHTER<sup>1</sup>, Robert BICZAK<sup>1</sup>  
i Marek KOWALCZUK<sup>1,2</sup>

## DEGRADACJA WYBRANYCH POLIESTRÓW W GLEBIE Z UDZIAŁEM MIKROORGANIZMÓW

### MICROBIAL DEGRADATION OF SELECTED POLYESTERS IN SOIL

**Abstrakt:** Obecnie w wielu gałęziach przemysłu niedegradowalne tworzywa sztuczne zastępuje się polimerami przyjaznymi środowisku. Wprowadzenie tych biodegradowalnych materiałów do codziennego użytku pomoże zredukować ilość powstających odpadów stałych, których recykling jest nieoptymalny. Chociaż biodegradowalne polimery są produkowane z myślą o ich kompostowaniu po zużyciu, niestety nie ma możliwości uniknięcia stosowania tzw. niewłaściwych praktyk (zaśmiecania), które prowadzą do powstawania nielegalnych, niekontrolowanych składowisk odpadów. Ponieważ wiadomo, że biopoliestry mogą ulegać degradacji w glebie w obecności szerokiej gamy mikroorganizmów, takich jak: bakterie, promieniowce czy grzyby, istnieje potrzeba badania oddziaływania tych materiałów na środowisko glebowe. Prezentowane wyniki dotyczą testu biodegradacji wybranych poliestrów (alifatyczno-aromatyczny kopolimer tereftalan-butanodiol/adypinian-butanodiol *BTA*, krystaliczny i amorficzny polilaktyd *PLA*, ataktyczny poli[(R,S)-3-hydroksymaślan] *a-PHB*) oraz ich mieszanin w glebie, przygotowanego w formie eksperymentu wazonowego, prowadzonego w warunkach kontrolowanych. Próbkę tych poliestrów w postaci żyłek umieszczono w glebie, a następnie w określonych odstępach czasu dokonywano analizy na obecność mikroorganizmów. Zmiany liczebności mikroorganizmów glebowych w testowanych poliestrach wykrywano na różnych podłożach selektywnych: bakterie na podłożach *YS*, promieniowce na ekstrakcie glebowym i grzyby na podłożu *DRBC*. Rodzaj i liczebność bakterii rozkładających polimery oznaczano na podłożach zawierających *BTA*, *PLA* i *a-PHB* jako jedyne źródło węgla przy użyciu podłoży selektywnych. Zaobserwowano, że liczebność bakterii zdolnych do tworzenia kolonii zależała od czasu trwania doświadczenia i rodzaju zastosowanych polimerów. Liczebność bakterii obecnych na podłożu zawierającym *a-PHB* była większa w porównaniu do podłoży z pozostałymi poliestrami. Wśród bakterii zdolnych do rozkładu biopolimerów dominowały Gram-dodatnie laski przetrwalnikujące oraz Gram-ujemne pałeczki.

**Słowa kluczowe:** biodegradacja, degradacja z udziałem mikroorganizmów, poliestry biodegradowalne

W ostatnich latach produkcja i zużycie materiałów polimerowych znacznie wzrosła, powiększając tym samym ilość odpadów uciążliwych dla środowiska. Wszechstronność zastosowań klasycznych tworzyw sztucznych, w tym głównie opakowań, wynika z ich walorów użytkowych, takich jak: niska cena, funkcjonalność, duża elastyczność, niewielka masa, chemiczna stabilność, nieprzepuszczalność, strukturalna różnorodność, odporność na rozkład mikrobiologiczny czy atmosferyczny. Produkty te z powodzeniem zastępują wiele tradycyjnych materiałów, takich jak: papier, szkło, drewno oraz metale.

Niekorzystnym efektem tak szerokiego zastosowania tworzyw jest duża ilość odpadów trafiających do środowiska, których znaczna większość jest niedegradowalna, a ich recykling jest mało optymalny. Dlatego wydaje się być ważne zastąpienie nieulegających degradacji tworzyw sztucznych takimi, które są w pełni biodegradowalnymi, tj. przyjaznymi środowisku materiałami polimerowymi otrzymywanymi głównie ze źródeł

<sup>1</sup> Instytut Chemii i Ochrony Środowiska, Akademia im. Jana Długosza, al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa, email: b.bobek@ajd.czyst.pl, a.smylla@ajd.czyst.pl, p.rychter@ajd.czyst.pl, r.biczak@ajd.czyst.pl

<sup>2</sup> Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych, Polska Akademia Nauk, ul. M. Curie-Skłodowskiej 34, 41-819 Zabrze, email: cchpmk@bachus.ck.gliwice.pl

odnawialnych zdolnych do samorzutnej degradacji hydrolitycznej bądź enzymatycznej po wymaganym czasie eksploatacji.

Obecnie polimerami biodegradowalnymi cieszącymi się dużym zainteresowaniem są m.in. polimery uzyskiwane bezpośrednio z surowców odnawialnych (polisacharydy naturalne, takie jak skrobia, celuloza i ich pochodne), naturalne poliestry produkowane przez mikroorganizmy (poli-3-hydroksymaślan PHB, jego kopolier z kwasem 3-hydroksywalerianowym PHBV), polimery produkowane przez klasyczną syntezę chemiczną z monomerów pochodzenia naturalnego (polilaktyd, PLA) oraz polimery wytwarzane z surowców petrochemicznych jak poli( $\epsilon$ -kaprolakton) PCL [1-3].

Szybkość procesu degradacji biodegradowalnych materiałów polimerowych w środowisku przyrodniczym zależy zarówno od budowy i właściwości samego materiału, jak i od warunków otoczenia, w którym się znajduje. Najważniejszym biologicznym czynnikiem występującym w środowisku naturalnym (kompost, gleba, osad czynny), wpływającym na tempo mineralizacji biopolimeru, jest aktywność obecnych tam mikroorganizmów, a zwłaszcza bakterii, promieniowców i grzybów [4-5].

## **Materiały i metody**

Badania nad udziałem mikroorganizmów glebowych w rozkładzie biopolimerów prowadzono na próbkach polimerów w postaci wytłoczonych żyłek przygotowanych w Centrum Materiałów Polimerowych i Węglowych PAN w Zabrze. Wykorzystane w doświadczeniu wazonowym materiały poliestrowe to: alifatyczno-aromatyczny kopolimer tereftalan-butanodiol/adypinian-butanodiol (BTA), krystaliczny (PLLA) i amorficzny (PDLLA) polilaktyd, ataktyczny poli[(R,S)-3-hydroksymaślan] (a-PHB). Dodatkowo, oprócz żyłki BTA, do testu biodegradacji przygotowano próbkę tego samego polimeru w postaci folii.

Gleba użyta do badań należała do grupy piasku luźnego, o pH zbliżonym do obojętnego. Eksperyment prowadzono w temperaturze  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  z zachowaniem stałej wilgotności próbek gleby. Badania mikrobiologiczne przeprowadzono w pierwszym, trzecim, dziesiątym, piętnastym oraz dwudziestym trzecim miesiącu inkubacji polimerów w glebie. Oprócz tych poliestrów badano następujące binarne mieszaniny z ich udziałem: PDLLA/a-PHB(90/10), PDLLA/a-PHB(95/5), BTA/PDLLA(70/30), BTA/PLLA(70/30), oraz mieszaniny trójskładnikowe: BTA/PDLLA/a-PHB(40/40/20) i BTA/PDLLA/a-PHB(90/5/5).

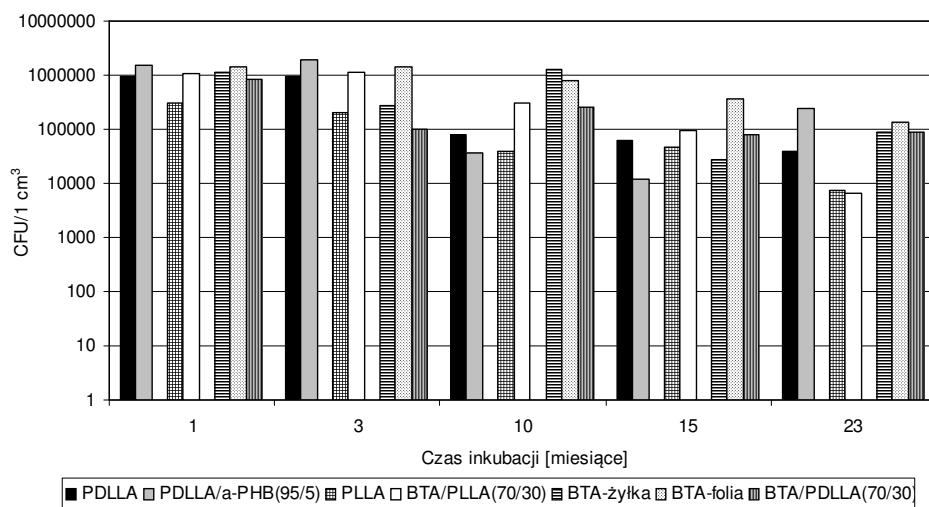
Próbki polimerów po wyjęciu z gleby umieszczano w  $10\text{ cm}^3$  0,1% roztworu Tween 80 w 0,9% NaCl i wytrząsano przez 10 minut. Liczebność bakterii heterotroficznych i promieniowców określano na podłożu YS (wyciąg glebowy z ekstraktem drożdżowym), grzyby mikroskopowe na podłożu DRBC (z chloramfenikolem i różem bengalskim). Do podłoża z polimerami oraz YS dodawano nystatyny oraz actidionu w ilości  $50\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$  podłoża w celu zahamowania wzrostu grzybów. Kolonie bakterii heterotroficznych liczone po 48 godzinach inkubacji w temperaturze  $28^{\circ}\text{C}$ , po 14 dniach liczone promieniowce, a po 7 dniach liczebność grzybów mikroskopowych. Wynik podano jako ogólną liczebność mikroorganizmów w  $1\text{ cm}^3$  [6-8].

Występowanie bakterii zdolnych do degradacji polimerów określono w próbkach po 23 miesiącach inkubacji. Materiał posiewano na podłoża zawierające polimery PLLA, PDLLA, BTA, a-PHB jako jedyne źródło węgla. Polimery rozpuszczono w chloroformie,

a następnie zhomogenizowano w mineralnym podłożu przy użyciu dezintegratora firmy Bandelin electronics typ: UW 2070 [9]. Po 14 dniach inkubacji obserwowano wokół kolonii bakterii strefy przejaśnienia zwane „halo” wskazujące na degradację polimeru znajdującego się w podłożu.

### Wyniki, ich omówienie i analiza

W trakcie badań największa liczebność bakterii heterotroficznych wystąpiła w pierwszych miesiącach badań, a mniejsza w końcowych miesiącach, co prawdopodobnie wiąże się z wyczerpywaniem substratów w podłożu. Wyniki te znajdują potwierdzenie w badaniach [8] i [10], w których stwierdzono, że aktywny wzrost mikroorganizmów glebowych jest ograniczony przez dostęp substancji pokarmowych, zwłaszcza źródeł węgla. Liczebność bakterii heterotroficznych w trakcie całych badań była większa niż pozostałych badanych grup mikroorganizmów (promieniowców i grzybów mikroskopowych). W pracach [3, 8, 10] również bakterie stanowiły dominującą grupę mikroorganizmów, zaś promieniowce i grzyby były mniej liczne.



Rys. 1. Liczebność bakterii obecnych na powierzchni wybranych próbek polimerowych

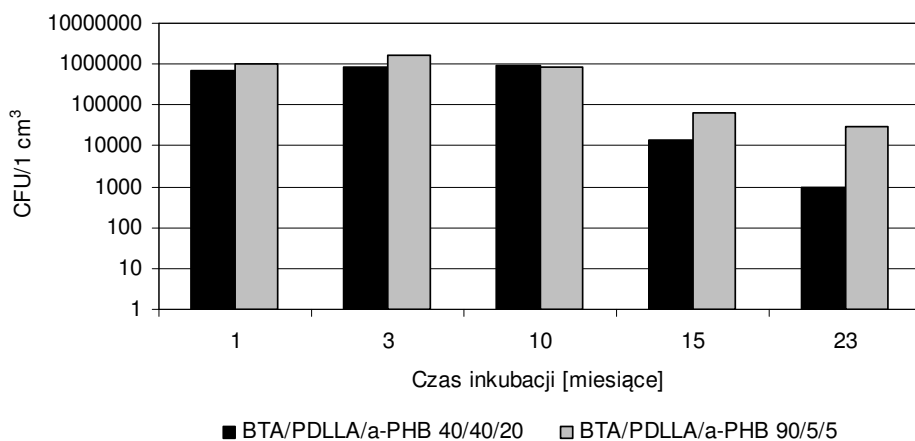
Fig. 1. Number of bacteria presented on surface of selected polymer samples

Liczebność bakterii heterotroficznych zasiedlających poszczególne polimery była zróżnicowana (rys. 1). Stwierdzono, że najliczniej zasiedlanym poliestrem był BTA, przy czym więcej bakterii obserwowano na folii niż na żyłce, co mogłoby wskazywać, że folia z racji większej powierzchni w porównaniu do żyłki jest bardziej dostępna dla mikroorganizmów. Wyniki te znajdują potwierdzenie w badaniach Wanga [11], który wykazał, że szybkość rozkładu polimerów jest zależna od rodzaju powierzchni, tj. polimery o powierzchni niejednorodnej (szorstkie) były szybciej rozkładane niż gładkie.

Porównując zasiedlanie przez bakterie PDLLA i PLLA (rys. 1) zaobserwowano, że PLLA jest gorzej i wolniej zasiedlany przez bakterie niż PDLLA, co wskazuje, że forma amorficzna polilaktydu (PDLLA) szybciej ulega degradacji hydrolitycznej, a następnie enzymatycznej. Przegląd literatury światowej wskazuje, że polilaktyd jest wolno degradowany mikrobiologicznie i przez niewiele szczepów bakterii, szczególnie w niższych temperaturach [12-14].

W badaniach własnych wykazano, że krystaliczny PLLA w mieszaninie z kopoliestrem BTA charakteryzuje się wyższym stopniem zasiedlenia przez bakterie w porównaniu do homopolimeru PLLA. Obecność ataktycznego poli[(R,S)-3-hydroksymaślanu] w mieszaninie z amorficznym PDLLA w 1, 3 i 23 miesiącu analizy powoduje wzrost przyswajalności przez mikroorganizmy tego ostatniego (rys. 1).

W mieszaninach trójskładnikowych BTA/PDLLA/a-PHB z dużym udziałem kopoliestru BTA zwiększa się stopień zasiedlenia próbek przez bakterie w porównaniu do mieszanin o małej zawartości tego składnika (rys. 2).



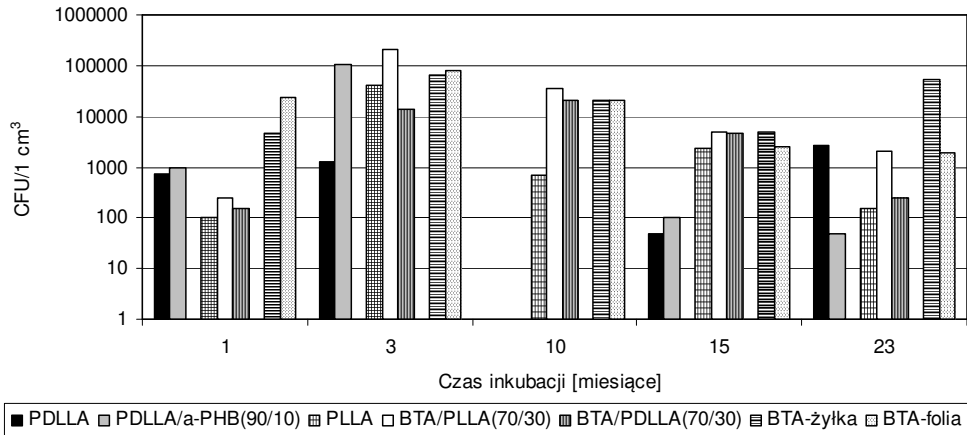
Rys. 2. Liczebność bakterii obecnych na powierzchni trójskładnikowych próbek polimerowych

Fig. 2. Number of bacteria presented on surface of BTA/PDLLA/a-PHB polymer samples

Grzyby szybciej zasiedlają BTA niż PLLA i PDLLA, przy czym, podobnie jak u bakterii, duża powierzchnia folii BTA odznacza się większą ilością grzybów niż żyłka BTA.

Zasiedlanie polimeru PDLLA przez grzyby było większe w mieszaninie z a-PHB w porównaniu z samym homopolimerem PDLLA. W przeciwieństwie do bakterii odnotowano, że PLLA jest w 3 i 15 miesiącu badań łatwiej zasiedlana przez grzyby niż amorficzny PDLLA.

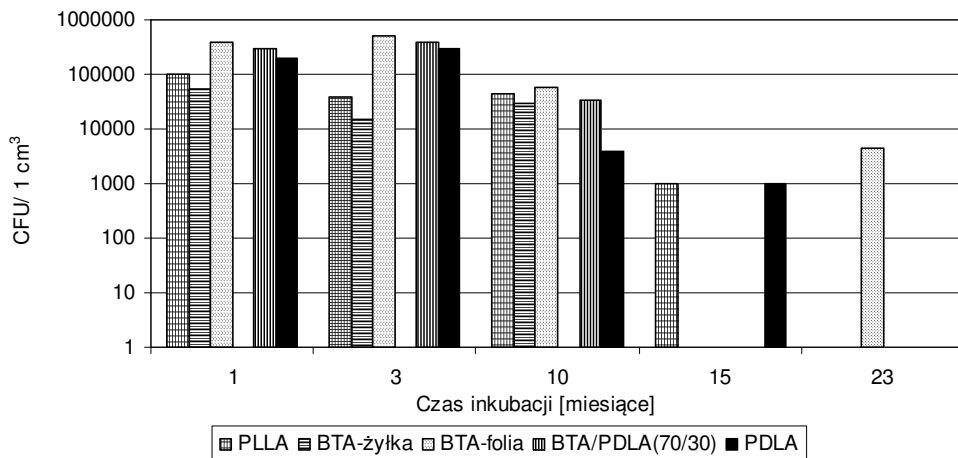
Obecność syntetycznego, alifatyczno-aromatycznego BTA w mieszaninie z krystalicznym PLLA czy amorficznym PDLLA powoduje łatwiejsze i szybsze zasiedlanie tych mieszanin w porównaniu tych homopolimerów zasiedlanych każdy z osobna. Z kolei dodatek PDLLA do BTA pogarsza zasiedlanie w stosunku do czystego BTA (rys. 3).



Rys. 3. Liczebność grzybów obecnych na powierzchni wybranych próbek polimerowych

Fig. 3. Number of fungi presented on surface of selected polymer samples

Obecność promieniowców obserwowano do 10 miesiąca badań, w 15 i 23 miesiącu powojy były sporadyczne, co mogło być spowodowane wyczerpywaniem się substratów w glebie [8, 10]. Również i w tym przypadku BTA w postaci folii charakteryzowała się większą liczebnością promieniowców w stosunku do żyłki. Relatywnie dużą liczebność zaobserwowano także na mieszaninie BTA/PDLLA. Wprowadzenie BTA do mieszaniny z PDLA powoduje, że próbka jest łatwiej zasiedlana niż czysty PDLA (rys. 4).

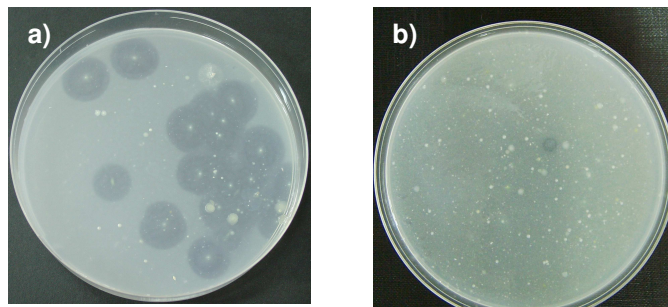


Rys. 4. Liczebność promieniowców obecnych na powierzchni wybranych próbek polimerowych

Fig. 4. Number of actinomycetes presented on surface of selected polymer samples

Wśród bakterii zdolnych do wzrostu na polimerach, jako jedynym źródle węgla, największą liczbę kolonii, otoczonych wyraźną strefą halo, obserwowano na podłożu

zawierającym a-PHB (rys. 5a); na pozostałych podłożach z polimerami występowały pojedyncze kolonie otoczone niewielką strefą halo (rys. 5b).



Rys. 5. Zdjęcia cyfrowe kolonii bakterii z widoczną strefą „halo”: a) na podłożu a-PHB, b) na podłożu BTA

Fig. 5. Digital photographs of bacterial colonies with ‘halo’ surrounded: a) a-PHB medium, b) BTA medium

Bakterie te należały głównie do tlenowych laseczek przetrwalnikujących z rodzaju *Bacillus*, wystąpiły również nieliczne pałeczki Gram-ujemne należące do *Pseudomonadaceae*.

### Podsumowanie i wnioski

1. Szereg dostępności badanych polimerów dla mikroorganizmów kształtuje się następująco: BTA folia > BTA żyłka > PDLA > PLLA.
2. Degradację poliesterów można przyspieszyć poprzez tworzenie mieszanin z innymi materiałami biodegradowalnymi, ułatwiając w ten sposób zasiedlanie trudniej biologicznie rozkładalnych polimerów przez mikroorganizmy glebowe.

### Literatura

- [1] Chiellini E., Cinelli P., D’Antone S. i Ilieva V., Environmentally degradable polymeric materials (EDPM) in agricultural applications - an overview. *Polimery* 2002, **47**(7-8), 538-544.
- [2] Mucha M.: *Polimery a ekologia*. Wyd. Polit. Łódzkiej, Łódź 2002.
- [3] Savenkova L., Gercberga Z., Nikolaeva V., Dzene A., Bibers I. i Kalnin M.: *Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films*. *Process Biochem.*, 2000, **35**, 573-579.
- [4] Pielichowski J. i Puszyński A.: *Technologia tworzyw sztucznych*. WNT, Warszawa 2003.
- [5] Tan F.T., Cooper D.G., Maric M. i Nicell J.A.: *Biodegradation of a synthetic co-polyester by aerobic mesophilic microorganisms*. *Polymer Degradat. Stabil.*, 2008, **93**, 1479-1485.
- [6] Badura L. i Smyła A.: *Wybrane metody izolowania promieniowców z gleby*. Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Warszawa 1979.
- [7] Atlas R.M.: *Microbiological Media*. CRS Press. Boca Raton, New York 1997.
- [8] Taylor J.P., Wilson B., Mills M.S. i Burns R.G.: *Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques*. *Soil Biol. Biochem.*, 2002, **34**, 387-401.
- [9] Ishigaki T., Sugano W., Nakanishi A., Tateda M., Ike M. i Fujita M.: *The degradability of biodegradable plastics in aerobic and anaerobic waste landfill model reactors*. *Chemosphere*, 2004, **54**, 225-233.
- [10] Griffiths B., Ritz K., Ebbelwhite N. i Dobson G.: *Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates*. *Soil Biol. Biochem.*, 1999, **31**, 145-153.
- [11] Wang Y.-W., Mo W., Yao H., Wu Q., Chen J. i Chen G.-Q.: *Polymer Degradat. Stabil.*, 2004, **85**, 815-821.
- [12] Tomita K., Tsuji H., Nakajima T., Kikuchi Y., Ikarashi K. i Kieda N.: *Degradation of poly(D-lactic acid) by a thermophile*. *Polymer Degradat. Stabil.*, 2003, **81**, 167-171.



- [13] Tomita K., Nakajima T., Kikuchi Y. i Miwa N.: *Degradation of poly(L-lactic acid) by a newly isolated thermophile*. Polymer Degradat. Stabil., 2004, **84**, 433-438.
- [14] Itavaara M., Karjomaa S. i Selin J-F.: *Biodegradation of polylactide in aerobic and anaerobic thermophilic conditions*. Chemosphere, 2002, **46**, 879-885.

## MICROBIAL DEGRADATION OF SELECTED POLYESTERS IN SOIL

**Abstract:** Nowadays in a lot of industrial branches non-degradable plastics have been replaced by environmental friendly polymers. Introducing these biodegradable materials to human's daily life help reduce harmful solid waste, which recycling is impractical and uneconomical. Generally, biodegradable polymers are produced to be composted after disposal, however there is no possibility to avoid improper practices dealing to produce illegal, uncontrolled landfill sites. As generally known, that biopolyesters can be degraded in soil by the action of a wide range of microorganisms such as bacteria, actinomycetales, and fungi, there is a big necessity for studying ecotoxicological impact of these materials placed in soil. The present results deals with biodegradation test of selected polyesters (aliphatic-aromatic copolymer (terephthalate-butylene/adipate-butylene, *BTA*, crystalline and amorphous polylactide *PLA*, and atactic poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate], *a-PHB*) and their blends incubated in soil, performed under controlled conditions in the pot experiment. Samples of monofilaments prepared from mentioned above polyesters were placed in soil medium and analyzed for microbial activity after specified period of time. The changes of the number of soil microorganism on tested polyesters using a number of different selective media were detected on: YS - for bacteria, soil extract for actinomycetales, DRBC for fungi. Species and number of polymer-degrading microorganisms were estimated on media containing BTA, PLA, and a-PHB as only carbon sources using a number of different selective media. It was found that numbers of all tested culturable microorganisms were dependent upon both on tested polymers and time of experiment. In the presence of polymer BTA, PLA, and a-PHB in medium, more bacteria on a-PHB as only carbon sources, than the other have been noticed. Among bacteria capable of degrading tested polymers Gram-positive sporulated bacilli and Gram-negative rods was dominated.

**Keywords:** biodegradation, microbial degradation, biodegradable polyesters



Anna CHRZAN<sup>1</sup>, Maria MARKO-WORŁOWSKA<sup>1</sup> i Tomasz ŁACIAK<sup>2</sup>

## METALE CIĘŻKIE W GLEBIE I ORGANIZMACH BEZKRĘGOWCÓW GLEBOWYCH

### HEAVY METALS IN THE SOIL AND IN THE ORGANISMS OF THE INVERTEBRATES INHABITING THE SOIL

**Abstrakt:** W celu oceny toksyczności metali dla mezofauny glebowej zbadano zróżnicowanie, liczebność oraz zawartość Pb, Cd, Ni, Zn zarówno w glebie, jak i w ciele zasiedlającej ją fauny wybranych siedlisk trawiastych. Badane stanowiska były położone blisko traktów komunikacyjnych o różnym stopniu nasilenia ruchu pojazdów mechanicznych i dla porównania w parku miejskim. Gleby charakteryzował podobny odczyn oraz mała wilgotność. Różniły się one natomiast zawartością metali ciężkich. Gleba w parku miejskim wykazała mniejszą zawartość Pb i małą pozostałych metali ciężkich, a jednocześnie największe zagęszczenie mezofauny. Natomiast w organizmach badanych zwierząt glebowych stwierdzono duże stężenia metali ciężkich na stanowiskach o dużej zawartości tych metali w glebie.

**Słowa kluczowe:** mezofauna, zagęszczenie, metale ciężkie

Metale ciężkie ze źródeł antropogenne zanieczyszczenia powietrza, wody i gleby ulegają w nich rozproszaniu i skażają bezpośrednio lub pośrednio przez rośliny lub martwą materię organiczną żyjące w nich organizmy [1]. Ich szkodliwość polega na możliwości kumulowania się w organizmach żywych i ich chronicznej toksyczności [2].

Zwiększona zawartość metali ciężkich wpływa szkodliwie na właściwości biologiczne gleby poprzez zmniejszenie jej żyzności, aktywności enzymatycznej i zmiany jej zakwaszenia. Zwiększona ilość metali w glebie może działać toksycznie na mikroflorę, rośliny, zwierzęta glebowe i człowieka, bowiem stają się one w mniejszym lub większym stopniu częścią łańcucha pokarmowego [3, 4]. Mechanizmy szkodliwego oddziaływania metali ciężkich na organizmy żywe są zróżnicowane i mogą prowadzić do zmian fizjologicznych powodujących obumieranie komórek i tkanek, a także wywoływać zmiany mutagenne i kancerogenne w organizmach [5].

W celu oceny toksyczności metali dla mezofauny glebowej zbadano zróżnicowanie, liczebność oraz zawartość Pb, Cd, Ni i Zn zarówno w glebie, jak i w zasiedlającej ją faunie.

#### Materiał i metodyka

Materiał badawczy stanowiła gleba z czterech trawników położonych blisko traktów komunikacyjnych o różnym stopniu nasilenia ruchu pojazdów mechanicznych oraz dla porównania gleba z parku miejskiego oddalonego o około 200 m od traktu komunikacyjnego:

Stanowisko I usytuowane w odległości ok. 1 m od ulicy

Stanowisko II usytuowane w odległości ok. 5 m od ulicy

Stanowisko III usytuowane w odległości ok. 4 m od ulicy

<sup>1</sup> Zakład Ekologii, Badań Łowieckich i Ekoturystyki, Instytut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny, ul. Podbrzezie 3, 31-054 Kraków, tel. 012 662 67 02, email: chrzan@ap.krakow.pl, mmw@ap.krakow.pl

<sup>2</sup> Zakład Zoologii Kręgowców, Instytut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny, ul. Podbrzezie 3, 31-054 Kraków, email: tlaciak@ap.krakow.pl

Stanowisko IV usytuowane w odległości ok. 0,5 m od ulicy

Stanowisko V usytuowane w odległości ok. 200 m od ulicy

Na badanych stanowiskach pobierano wiosną 2008 r. serie próbek za pomocą ramy glebowej o wymiarach 25 cm x 25 cm, którą wbijano w glebę do głębokości 10 cm. Każda seria składała się z 16 próbek o łącznej powierzchni 1 m<sup>2</sup>. Mezofaunę wyplaszano metodą dynamiczną w zmodyfikowanym aparacie Tullgrena. Po oznaczeniu szczegółowej analizie poddano jej zróżnicowanie i zagęszczenie. Badano również wilgotność, temperaturę oraz pH gleby, a także oznaczono zawartość ołowiu, kadmu, niklu i cynku metodą AAS na absorpcyjnym spektrofotometrze atomowym (firmy Cole-Parmer, BUCK 200A) zarówno w glebie, jak i w wyekstrahowanej mezofaunie.

## Wyniki

Gleby charakteryzował podobny lekko alkaliczny odczyn (7,33÷7,74) oraz podobna wilgotność mieszcząca się w przedziale 16,1÷20,4% (tab. 1).

Charakterystyka gleby badanych stanowisk w Krakowie

Tabela 1

Soil characteristics of the analysed localities in Kraków

Table 1

Wybrane parametry	Stanowisko I	Stanowisko II	Stanowisko III	Stanowisko IV	Stanowisko V
Wilgotność [%]	16,5	16,1	20,4	18,9	18,85
pH gleby	7,33	7,38	7,72	7,74	7,53
Temperatura powietrza [°C]	11,5	9,8	12,6	12,9	8,5
Temperatura gleby [°C]	9,3	11,1	11,4	11,9	8,8

Stanowisko I	ul. J.K. Dietla
Stanowisko II	Most J. Piłsudskiego
Stanowisko III	Most Grunwaldzki
Stanowisko IV	ul. Podgórska
Stanowisko V	Park Bednarskiego

Niewielkie różnice w wilgotności nie miały wpływu na zagęszczenie mezofauny. Nie stwierdzono większych zmian w różnorodności mezofauny na badanych stanowiskach (tab. 2).

Zagęszczenie i różnorodność pedofauny na badanych stanowiskach

Tabela 2

Density and diversity of the pedofauna in analysed localities

Table 2

Wybrane parametry	Stanowisko I	Stanowisko II	Stanowisko III	Stanowisko IV	Stanowisko V
Zagęszczenie mezofauny [l os./m <sup>2</sup> ]	440	566	396	592	1484
Różnorodność (liczba grup systematycznych)	9	9	10	9	11

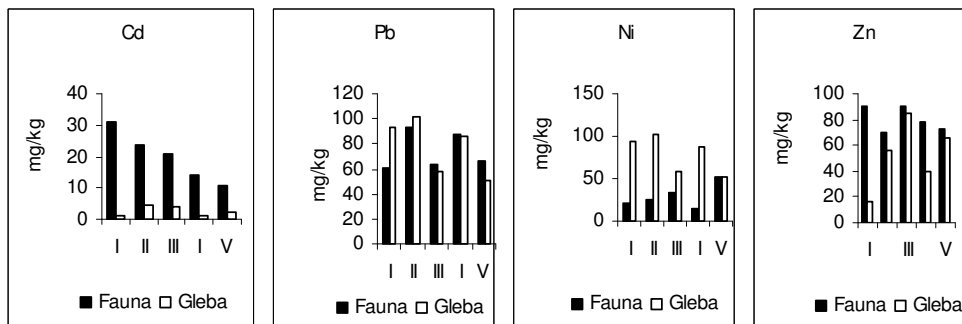
Stanowisko I	ul. J.K. Dietla
Stanowisko II	Most J. Piłsudskiego
Stanowisko III	Most Grunwaldzki
Stanowisko IV	ul. Podgórska
Stanowisko V	Park Bednarskiego

Istotne różnice dotyczyły natomiast zarówno zawartości metali ciężkich w glebie, jak i w zamieszkującej ją mezofaunie.

Gleba w parku miejskim wykazała najmniejsze stężenie Pb oraz stosunkowo małe Cd i Ni. Jednocześnie stwierdzono tu największe zagęszczenie mezofauny. Na tym stanowisku odnotowano 1484 osobniki na m<sup>2</sup>, podczas gdy na pozostałych zagęszczenie mezofauny było od ponad dwóch do ponad trzech razy mniejsze (tab. 2).

Mezofauna parku zawierała najmniejsze stężenie Cd, stosunkowo małe Pb i Zn oraz największe stężenie Ni mimo jego małej zawartości w glebie (rys. 1). Może to świadczyć o braku bezpośredniej zależności między zawartością Ni w glebie i zamieszkującej ją faunie.

Na stanowiskach o dużym nasileniu ruchu pojazdów mechanicznych (II, III) stwierdzono w glebie największe stężenia Cd, Ni i Zn przy jednocześnie małym zagęszczeniu mezofauny i dużej zawartości Cd w ich ciele. Jednak w ciele mezofauny największą koncentrację Cd stwierdzono na stanowisku I, Ni na stanowisku V i Zn na stanowisku I (rys. 1), gdzie glebę charakteryzowała najmniejsza koncentracja ww. pierwiastków. W przypadku Pb jego największą koncentrację odnotowano w ciele mezofauny stanowiska II, gdzie jednocześnie stwierdzono największą zawartość tego pierwiastka w glebie (rys. 1).



Rys. 1. Zawartość metali ciężkich w glebie i mezofaunie glebowej w mg/kg

Fig. 1. Heavy metal content in the soil and in mesofauna in mg/kg

- I ul. J.K. Dietla
- II Most J. Piłsudskiego
- III Most Grunwaldzki
- IV ul. Podgórska
- V Park Bednarskiego

## Wnioski

1. Niewielkie różnice wartości pH i wilgotności badanych gleb nie miały wpływu na zagęszczenie mezofauny.
2. Duża zawartość Cd, Pb, Ni i Zn w glebie wpływa ograniczająco na ilość zasiedlającą ją mezofauny.
3. Duża zawartość Cd i Zn w ciele mezofauny jest czynnikiem ograniczającym jej zagęszczenie.

4. W odniesieniu do Cd, Ni i Zn nie stwierdzono bezpośredniej zależności między ich ilością w glebie a ilością tych metali w ciele mezofauny ją zasiedlającej.
5. Duża ilość drzew i krzewów oraz większa odległość od traktów komunikacyjnych chroni glebę przed dostawaniem się do niej Pb.

### Literatura

- [1] Gorlach E. i Gambuś F.: *Potencjalnie toksyczne pierwiastki śladowe w glebach (nadmiar, szkodliwość i przeciwdziałanie)*. Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln., 2000, **472**, 275-296.
- [2] Gruca-Królikowska S. i Waclawek W.: *Metale w środowisku. Cz. II. Wpływ metali ciężkich na rośliny*. Chem. Dydakt. Ekol. Metrol., 2006, **11**(1-2), 41-54.
- [3] Paoletti M.G., Iovane E. i Cortese M.: *Pedofauna bioindicators and heavy metals in five agroecosystems in north-east Italy*. Rev. écol. biol. sol., Paris, 1988, **25**(1), 33-58.
- [4] Stawarz R., Formicki G. i Zakrzewski M.: *Heavy metals content in shell, foot and liver gland of Roman snail (Helix pomatia) living in different environments*. Ecol. Chem. Eng., 2006, **13**(1-2), 133- 137.
- [5] Dziadek K. i Waclawek W.: *Metale w środowisku. Cz. I. Metale ciężkie (Zn, Cu, Ni, Pb, Cd) w środowisku glebowym*. Chem. Dydakt. Ekol. Metrol., 2005, **10**(1-2), 33-44.

## HEAVY METALS IN THE SOIL AND IN THE ORGANISMS OF THE INVERTEBRATES INHABITING THE SOIL

**Abstract:** The heavy metals that get into the organisms influence their vital processes. In order to evaluate the toxicity of metals to mesofauna of the soil the diversity, the number and the content of Pb, Cd, Ni, Zn in the soil and in the body of the fauna of grass habitats were analyzed. The chosen areas were situated near the roads with different rates of traffic flow and, to compare, in the city park. The soils were characterized by similar pH reaction and the low humidity. They differ in the content of the heavy metals. The soil in the city park showed the lowest concentration of Pb and low for the other heavy metals and, at the same time, the highest density of mesofauna. Whereas in the organisms of the animals of the soil analyzed the high concentration of the heavy metals on the habitats with the high concentration of these metals in the soil was detected.

**Keywords:** soil mesofauna, abundance, diversity, heavy metals

Bożena DĘBSKA<sup>1</sup>, Magdalena BANACH-SZOTT<sup>1</sup> i Małgorzata DRĄG<sup>1</sup>

## POLIDYSERSYJNOŚĆ I WŁAŚCIWOŚCI HYDROFILOWE I HYDROFOBOWE KWASÓW HUMINOWYCH GLEB POD TOPOLAMI

### POLYDISPERSITY AND THE HYDROPHILIC AND HYDROPHOBIC PROPERTIES OF HUMIC ACIDS OF SOILS UNDER DIFFERENT USE

**Abstrakt:** Celem pracy było określenie stopnia polidispersyjności oraz właściwości hydrofilowo-hydrofobowych kwasów huminowych gleb spod plantacji topolowych oraz gleb użytkowanych rolniczo. Do badań wykorzystano próbki gleb pływowych, glejowych i rdzawych pobrane na obszarze centralnej i zachodniej części Polski, z różnowiekowych - 7, 17, 30, 32, 45 i 57 lat - plantacji topolowych, założonych na gruntach porolnych oraz próbki gleb uprawnych i gleby łąkowej. Próbkę pobierano z głębokości 0÷7,5 i 7,5÷25 cm. Z próbek gleb wyizolowano kwasy huminowe (KH) ogólnie przyjętą metodą IHSS. Wykazano, że kwasy huminowe niezależnie od sposobu zagospodarowania cechują się większym udziałem frakcji hydrofobowych (HOB) niż hydrofilowych (HIL). Kwasy huminowe pod plantacjami topolowymi cechowały się większymi wartościami stosunku HIL/HOB w porównaniu z KH gleb uprawnych i gleby łąkowej. KH warstwy powierzchniowej, niezależnie od sposobu zagospodarowania, cechowały się większymi wartościami HIL/HOB w porównaniu z KH warstwy głębszej. Udział powierzchni piku w widmach HPSEC kwasów huminowych związanego z obecnością molekuł o większych rozmiarach wahał się w przedziale od 0 do 26,2%, dlatego dominujący okazał się pik II o dłuższym czasie retencji, charakterystyczny dla molekuł o mniejszych rozmiarach.

**Słowa kluczowe:** plantacje topolowe, kwasy huminowe HPLC, HPSEC

Kwasy huminowe (KH) stanowią grupę specyficznych związków organicznych powstających w skomplikowanych procesach biochemicznej kondensacji i polimeryzacji produktów rozkładu resztek pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz produktów przemian materii mikroorganizmów [1-3]. W związku z tym powstanie dwóch identycznych struktur jest praktycznie niemożliwe. Budowa (połączenia aromatyczne, łańcuchy alifatyczne, grupy funkcyjne) i właściwości kwasów huminowych sprawiają, że biorą one udział we wszystkich procesach zachodzących w glebie i wpływają na jej właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne [2, 4].

Jak wynika z doniesień literaturowych [4], właściwości substancji humusowych są cechą charakterystyczną dla danego typu gleby, jednak w pewnym zakresie mogą być modyfikowane poprzez sposób użytkowania gleb. W glebach uprawnych dużą rolę w kształtowaniu właściwości substancji humusowych odgrywają resztki pozbiiorowe pozostawione corocznie po sprężeniu uprawianych roślin, a w glebach leśnych opad roślinny. Jak wynika z doniesień literaturowych [1, 4, 5], skład chemiczny materiałów roślinnych jest jednym z podstawowych czynników kształtujących właściwości powstających substancji humusowych oraz przebieg procesu humifikacji. Jednym z parametrów zmieniających się w procesie humifikacji jest stopień polidispersyjności molekuł substancji humusowych [1, 6] oraz udział frakcji hydrofobowych i hydrofilowych [6-8]. Powyższe parametry są ważne z ekologicznego punktu widzenia, gdyż wzajemne

<sup>1</sup> Wydział Rolniczy, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, ul. Bernardyńska 6, 85-029 Bydgoszcz, tel. 052 374 95 11, fax 052 374 95 05, email: debska@utp.edu.pl, magdybe@poczta.fm, mdrag@utp.edu.pl

proporcje tych frakcji decydują o rozpuszczalności kwasów huminowych, a w konsekwencji o ich migracji w głąb profilu glebowego.

Celem niniejszej pracy było określenie właściwości hydrofilowo-hydrofobowych oraz stopnia polidispersyjności kwasów huminowych różnych typów gleb pod plantacjami topolowymi oraz sąsiadujących z tymi plantacjami gleb użytkowanych rolniczo.

### **Materiał i metody**

Do badań wykorzystano kwasy huminowe wyizolowane z próbek gleb płowych, glejowych i rdzawych, pobranych na obszarze centralnej i zachodniej części Polski, z różnowiekowych - 7, 17, 30, 32, 45 i 57 letnich - plantacji topolowych, założonych na gruntach porolnych oraz próbki gleb uprawnych i gleby łąkowej. Próbkę pobierano z głębokości  $0 \div 7,5$  i  $7,5 \div 25$  cm. Kwasy huminowe wyizolowano ogólnie przyjętą metodą IHSS. Dla wyseparowanych kwasów huminowych o zawartości popiołu nieprzekraczającej 2% wykonano analizy:

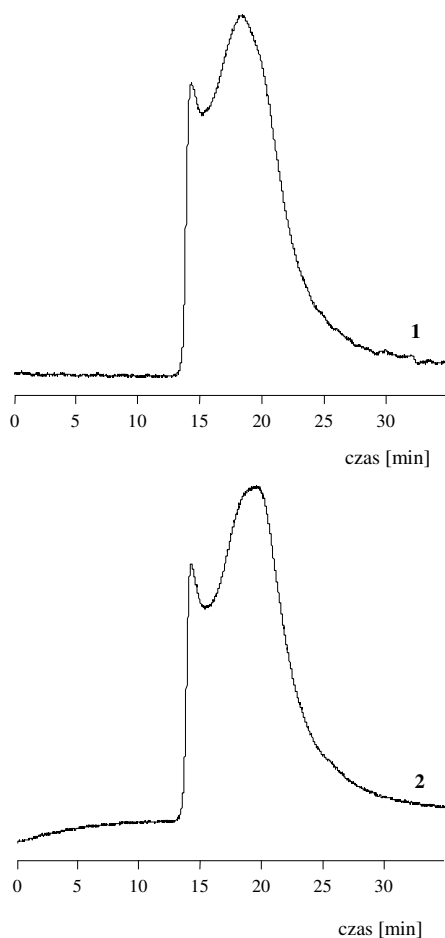
- rozdziału na frakcje makro- i małowielkularne, metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej wykluczania (HPSEC) przy użyciu chromatografu cieczowego firmy PerkinElmer Series 200 wyposażonego w detektor DAD, na kolumnie BioSep-SEC-S 3000 o wymiarach  $600 \times 7,8$  mm (prekolumna BioSep-SEC-S3000 o wymiarach  $35 \times 7,8$  mm). Na podstawie uzyskanych chromatogramów wyznaczono następujące pola powierzchni: S0 - całkowita powierzchnia, S1 - powierzchnia pod pierwszym pikiem, S2 - powierzchnia pod drugim pikiem, a także stosunek powierzchni pików pierwszego do drugiego S1/S2 [6, 9, 10];
- rozdziału na frakcje hydrofobowe i hydrofilowe chromatografem HPLC series 200 firmy PerkinElmer. Zastosowano kolumnę analityczną X-Terra C18 o rozmiarach cząstek  $5 \mu\text{m}$  i wymiarach  $250 \times 4,6$  mm I.D. Stężenie KH w  $0,01$  M NaOH wynosiło  $2 \text{ g/dm}^3$ . Nastrzyk -  $100 \text{ mm}^3$ , detekcja -  $\lambda = 254 \text{ nm}$ . Na podstawie wyznaczonych powierzchni pod pikami obliczono w molekułach kwasów huminowych udział frakcji hydrofilowych (HIL) i frakcji hydrofobowych (HOB-1, HOB-2) oraz parametr  $\text{HIL}/(\text{HOB-1}+\text{HOB-2})$  [6-8, 11, 12].

### **Wyniki i ich omówienie oraz analiza**

#### *Stopień polidispersyjności molekuł kwasów huminowych*

Zarówno zastosowane warunki pomiarowe, jak i dobór kolumny (TSK GEL 3000SW) pozwalają na rozdział wyizolowanych kwasów huminowych ze względu na rozmiar molekuł. Pierwszy pik (czyli ten o krótszym czasie retencji) kryje pod swoją powierzchnią cząstki o większych rozmiarach, zaś pik o dłuższym czasie retencji jest charakterystyczny dla cząstek o mniejszych rozmiarach [6, 9, 10]. Rozdział analizowanych kwasów huminowych nie był wyraźnie zaznaczony, a w niektórych przypadkach otrzymano jeden szeroki pik bez wyraźnych tendencji do rozdziału występujący w przedziale od ok. 12,0 do ok. 28,0 min (rys. 1). W widmach kwasów huminowych, w których wyodrębniono dwie frakcje, pierwszy pik występował w zakresie od ok. 12 do ok. 15,5 min, a drugi w zakresie  $15,5 \div 28,0$  min (rys. 1). Otrzymane zależności wskazują na dużą polidispersyjność omawianych KH.





Rys. 1. Przykładowe chromatogramy HPSEC kwasów huminowych (1 - gleba płowa - wiek topoli 32 lata; 2 - gleba płowa - uprawna)

Fig. 1. Selected HPSEC chromatograms spectra of humic acids (1 - Luvisols - years of poplar plantation - 32; 2 - Luvisols - arable soil)

Dla kwasów huminowych, których przebieg chromatogramów umożliwił wyodrębnienie dwóch frakcji, obliczono powierzchnie pod pikami i ich udziały. Udział powierzchni pików związanych z obecnością makromolekularnych frakcji kwasów huminowych (S1) w widmach HPSEC wahał się w przedziale od 6,3 do 26,2%, w związku z tym dominujący był pik II, o czym również świadczą otrzymane wartości stosunku powierzchni pików S1/S2 (tab. 1). Na podstawie wartości stosunku S1/S2 można stwierdzić, że polidispersyjność KH z jednej strony zależy od typu gleby, z drugiej od sposobu zagospodarowania. Uprawa topoli w pewnym zakresie modyfikowała wartości parametru S1/S<sub>2</sub>, na ogół KH warstwy powierzchniowej pod topolami cechowały się większymi wartościami omawianego parametru w porównaniu z KH warstwy powierzchniowej gleb uprawnych.

Tabela 1

Parametry rozdziału kwasów huminowych metodą HPSEC

Table 1

Parameters of chromatographic resolution of humic acids HPSEC methods

Gleba (Soil)		Głębokość (Depth)	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>1/2</sub>
Gleba płowa	1	0÷7,5 cm	19,2	80,8	0,238
	1	7,5÷25 cm	19,5	80,5	0,242
Luvisols	2	0÷7,5 cm	26,2	73,8	0,355
7 lat	2	7,5÷25 cm	17,4	82,6	0,211
Gleba glejowa	1	0÷7,5 cm	11,5	88,5	0,130
Gleysols	1	7,5÷25 cm	8,9	91,1	0,100
17 lat	2	0÷7,5 cm	-*	-*	-*
	2	7,5÷25 cm	-*	-*	-*
Gleba glejowa	1	0÷7,5 cm			
Gleysols	1	7,5÷25 cm	11,0	89,0	0,124
30 lat	2a	0÷7,5 cm	8,6	91,4	0,094
	2a	7,5÷25 cm	-*	-*	-*
Gleba płowa	1	0÷7,5 cm	21,5	78,5	0,274
Luvisols	1	7,5÷25 cm	13,8	86,2	0,160
32 lata	2	0÷7,5 cm	15,0	85,0	0,176
	2	7,5÷25 cm	18,8	81,2	0,232
Gleba glejowa	1	0÷7,5 cm	10,4	89,6	0,116
Gleysols	1	7,5÷25 cm	13,5	86,5	0,156
32 lata	2	0÷7,5 cm	11,8	88,2	0,134
	2	7,5÷25 cm	13,0	87,0	0,149
Gleba płowa	1	0÷7,5 cm	9,9	90,1	0,110
Luvisols	1	7,5÷25 cm	15,3	84,7	0,181
45 lat	2	0÷7,5 cm	7,6	92,4	0,082
	2	7,5÷25 cm	11,0	89,0	0,124
Gleba rdzawa	1	0÷7,5 cm	17,4	82,6	0,211
Arenosols	1	7,5÷25 cm	9,4	90,6	0,104
57 lat	2	0÷7,5 cm	8,4	91,6	0,092
	2	7,5÷25 cm	6,3	93,7	0,07

\* - brak rozdziału pików

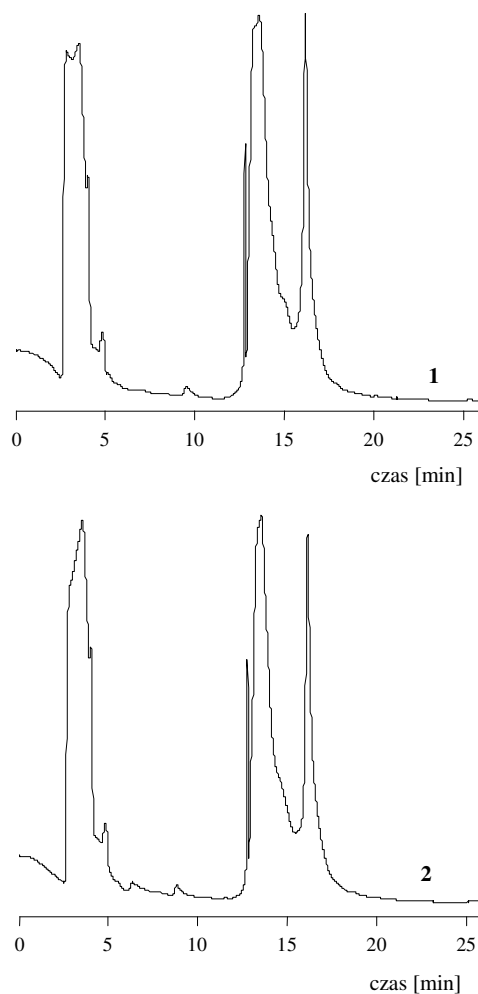
\* - no resolution of peak

### Właściwości hydrofobowo-hydrofilowe molekuł kwasów huminowych

W molekułach analizowanych kwasów huminowych wyodrębniono frakcje hydrofilowe (HIL) i hydrofobowe (HOB-1 i HOB-2). Piki mieszczące się na chromatogramach (rys. 2) w zakresie od 2,5 do 5,5 min odpowiadają frakcjom hydrofilowym, a piki występujące w przedziale 12,5÷18,5 min odpowiadają frakcjom hydrofobowym (HOB) [7, 11, 12]. Ze względu na słaby rozdzielanie pików odpowiadających frakcjom hydrofilowym potraktowano je jako jedną frakcję hydrofilową - HIL. W przedziale 12,5÷18,5 min wyodrębniono 2 zakresy: jeden w przedziale 12,5÷15,5 min określono jako HOB-1 i drugi w zakresie 15,5÷18,5 min oznaczono jako HOB-2.

Udział frakcji hydrofilowych w analizowanych kwasach huminowych wahał się w granicy od 38,00 do 48,97% (tab. 2), a więc badane KH cechowały się przewagą frakcji hydrofobowych nad hydrofilowymi. KH warstwy powierzchniowej gleb pod plantacjami topolowymi charakteryzowały się na ogół większym udziałem frakcji hydrofilowych i mniejszym hydrofobowych w porównaniu z KH warstwy powierzchniowej gleb

uprawnych. Wyjątek stanowiły kwasy huminowe plantacji najstarszej oraz plantacji 30-letniej, dla której odnośnikiem była łąka, gdzie zaobserwowano zależność odwrotną. W większości wariantów KH wyizolowane z próbek gleb pobranych z warstwy 7,5÷25 cm w porównaniu z KH warstwy powierzchniowej miały mniej frakcji o właściwościach hydrofilowych i więcej o hydrofobowych.



Rys. 2. Przykładowe chromatogramy RP-HPLC kwasów huminowych (1 - gleba płowa - wiek topoli 32 lata; 2 - gleba płowa - uprawna)

Fig. 2. Selected chromatogram RP-HPLC of humic acids (1 - Luvisols - years of poplar plantation - 32; 2 - Luvisols - arable soil)

Konsekwencją zmian udziału poszczególnych frakcji były obliczone wartości stosunku HIL/HOB (tab. 2). I tak kwasy huminowe warstw głębszych charakteryzowały się

mniejszymi wartościami HIL/HOB w porównaniu z KH warstw powierzchniowych. Odwrotną zależność zanotowano dla plantacji najstarszej i najmłodszej. Może to świadczyć o nasilonej migracji frakcji hydrofilowej - jako dobrze rozpuszczalnej - w głąb profilu glebowego, co może być związane również z właściwościami fizykochemicznymi badanych gleb. Natomiast KH warstwy powierzchniowej gleb pod plantacjami topolowymi cechowały się większymi wartościami parametru HIL/HOB w porównaniu z KH gleb uprawnych. Wyjątkiem były KH plantacji najstarszej oraz KH gleby łąkowej. Należy również podkreślić, że różnice, jakie otrzymano dla KH gleby pod plantacjami topolowymi między warstwą powierzchniową i warstwą 7,5÷25 cm, były większe niż między KH poszczególnych warstw w glebach uprawnych. Jest to prawdopodobnie wynikiem zabiegów agrotechnicznych - głównie orki - stosowanych na polach uprawnych.

Tabela 2

Udział frakcji hydrofilowych i hydrofobowych w molekułach kwasów huminowych

Table 2

Share of hydrophilic and hydrophobic fractions in molecules of humic acids

Gleba (Soil)		Głębokość (Depth)	HIL	HOB-1	HOB-2	ΣHOB	HIL/HOB
Gleba płowa Luvisols	1	0÷7,5 cm	44,34	25,96	29,70	55,66	0,798
	1	7,5÷25 cm	47,34	21,52	31,14	52,66	0,902
7 lat	2	0÷7,5 cm	40,14	40,71	19,15	59,86	0,673
	2	7,5÷25 cm	38,79	44,02	17,19	61,21	0,634
Gleba glejowa Gleysols	1	0÷7,5 cm	43,31	24,16	32,53	56,69	0,765
	1	7,5÷25 cm	41,55	43,89	14,56	58,45	0,711
17 lat	2	0÷7,5 cm	39,01	46,73	14,26	60,99	0,640
	2	7,5÷25 cm	39,41	47,04	13,56	60,59	0,652
Gleba glejowa Gleysols	1	0÷7,5 cm	44,23	32,00	23,76	55,77	0,800
	1	7,5÷25 cm	40,44	36,80	22,76	59,66	0,677
30 lat	2a	0÷7,5 cm	47,68	25,24	27,08	52,32	0,915
	2a	7,5÷25 cm	44,74	43,09	12,16	55,26	0,812
Gleba płowa Luvisols	1	0÷7,5 cm	44,11	21,85	34,04	55,89	0,789
	1	7,5÷25 cm	38,02	43,81	18,17	61,98	0,614
32 lata	2	0÷7,5 cm	39,88	40,84	19,28	60,12	0,663
	2	7,5÷25 cm	38,00	43,91	18,09	62,00	0,613
Gleba glejowa Gleysols	1	0÷7,5 cm	48,97	22,05	28,98	51,03	0,964
	1	7,5÷25 cm	43,88	40,18	15,94	56,12	0,783
32 lata	2	0÷7,5 cm	44,10	39,24	16,66	55,90	0,789
	2	7,5÷25 cm	43,48	41,32	15,19	56,52	0,770
Gleba płowa Luvisols	1	0÷7,5 cm	43,70	38,77	17,53	56,30	0,777
	1	7,5÷25 cm	42,13	43,03	14,85	57,87	0,728
45 lat	2	0÷7,5 cm	41,03	42,31	16,67	58,97	0,696
	2	7,5÷25 cm	40,94	41,08	17,98	59,06	0,696
Gleba rdzawa Arenosols	1	0÷7,5 cm	41,72	42,44	15,84	58,28	0,716
	1	7,5÷25 cm	44,96	40,55	14,48	55,04	0,818
57 lat	2	0÷7,5 cm	44,70	30,71	24,59	55,30	0,812
	2	7,5÷25 cm	41,79	42,20	16,01	58,21	0,718

1 - plantacja topoli (poplar plantation) , 2 - gleba uprawna (arable soil), 2a - gleba łąkowa (meadow soil)

Otrzymane wartości udziału frakcji hydrofilowych i hydrofobowych potwierdziły wcześniejsze spostrzeżenia, że właściwości kwasów huminowych są cechą

charakterystyczną dla danego typu gleby, ale mogą być modyfikowane sposobem zagospodarowania gleb.

### Wnioski

1. Kwasy huminowe niezależnie od sposobu zagospodarowania cechują się większym udziałem frakcji hydrofobowych niż hydrofilowych. Kwasy huminowe pod plantacjami topolowymi cechowały się większymi wartościami stosunku HIL/HOB w porównaniu z KH gleb uprawnych i gleby łąkowej. KH warstwy powierzchniowej, niezależnie od sposobu zagospodarowania, cechowały się większymi wartościami HIL/HOB w porównaniu z KH warstwy głębszej.
2. Udział powierzchni pików w widmach HPSEC kwasów huminowych związanego z obecnością cząstek o większych rozmiarach wahał się w przedziale od 0 do 26,2%, w związku z tym dominujący okazał się pik II, o dłuższym czasie retencji, charakterystyczny dla cząstek o mniejszych rozmiarach.

### Literatura

- [1] Aleksandrowa L.N.: *Organiczeskoje wieszczestwa poczwy i processy jego transformacji*. Nauka, Leningrad 1980.
- [2] Dziadowiec H.: *Ecological role of soil organic matter (in Polish)*. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln., 1993, **411**, 269-281.
- [3] Gonet S.S.: *Próchnica, substancje humusowe, węgiel organiczny - definicje, komentarze i metody oznaczania*. [w:] Substancje humusowe w glebach i nawozach. Dębska B. i Gonet S.S. (red.). PTSH, Wrocław 2003, 21-29.
- [4] Gonet S.S.: *Habitat and anthropogenic factors determining status of soil organic matter (in Polish)*. Humic Subst. Environ., 1997, **1**, 17-24.
- [5] Howard P.J.A., Howard D.M. i Lowe L.E.: *Effects of tree species and soil physico-chemical conditions on the nature of soil organic matter*. Soil Biol. Biochem., 1998, **30**(3), 285-297.
- [6] Dębska B., Drąg M. i Banach-Szott M.: *Molecular size distribution and hydrophilic and hydrophobic properties of humic acids isolated from forest soil*. Soil Water Res., 2007, **2**(2) 45-53.
- [7] Dębska B.: *Właściwości substancji humusowych gleby nawożonej gnojowicą*. Rozprawy 110, Wyd. Uczeln. Akad. Techn.-Roln., Olsztyn 2004.
- [8] Banach-Szott M. i Dębska B.: *Chromatographic separation of humic acids of a forest soil*. [w:] Humic Substances Linking Structure to Functions. Frimmel F.H. i Abbt-Braun G. (red.). TH, Karlsruhe 2006, 225-228.
- [9] Nissinen T.K., Miettinen I.T., Martikainen P.J. i Vartiainen T.: *Molecular size distribution of natural organic matter in raw and drinking waters*. Chemosphere, 2001, **45**, 865-873.
- [10] Vartiainen T., Liimatainen A. i Kauranen P.: *The use of TSK size exclusion columns in determination of the quality and quantity of humus in raw waters and drinking waters*. Sci. Total Environ., 1987, **62**, 75-84.
- [11] Woelki G., Friedrich S., Hanschmann G. i Salzer R.: *HPLC fractionation and structural dynamics of humic acids*. Fresenius J. Anal. Chem., 1997, **357**, 548-552.
- [12] Preuße G., Friedrich S. i Salzer R.: *Retention behavior of humic substances in reversed phase HPLC*. Fresenius J. Anal. Chem., 2000, **368**, 268-273.

### POLYDISPERSITY AND THE HYDROPHILIC AND HYDROPHOBIC PROPERTIES OF HUMIC ACIDS OF SOILS UNDER DIFFERENT USE

**Abstract:** The aim of the present paper was to determine the degree of polydispersity and the hydrophilic and hydrophobic properties of humic acids of soils under poplar plantations and soils under agricultural use. The research involved soil sampled in the central and western part of Poland (Luvisols, Gleysols, Arenosols) from poplar plantations of different age (7, 17, 30, 32, 45 and 57 year-old) established on post-arable land and soil

sampled from arable land and meadow soil. The soils were sampled at the sampling depth of 0÷7.5 and 7.5÷25 cm. From the soil samples there were isolated humic acids (HAs) with the commonly applied method recommended by IHSS. It was shown that humic acids, irrespective of the soil use, demonstrate a higher share of hydrophobic fractions than the hydrophilic ones. Humic acids under poplar plantations revealed higher values of the HIL/HOB ratio as compared with HAs of arable soils and meadow soil. HAs of the surface layer, irrespective of the use, showed higher HIL/HOB values as compared with HAs of the deeper layer. The share of the peak area in HPSEC spectra of humic acids connected with the presence of molecules larger in size ranged from 0 to 26.2%, and thus the second peak appeared to be dominant, of a longer retention time, characteristic for molecules of smaller in size.

**Keywords:** poplar plantations, humic acids, HPLC, HPSEC

Jolanta KOWALSKA<sup>1</sup> i Dariusz DROŻDŻYŃSKI<sup>2</sup>

## SPINOSAD JAKO INSEKTYCYD W ROLNICTWIE EKOLOGICZNYM - MOŻLIWOŚCI STOSOWANIA I MONITORING POZOSTAŁOŚCI

### SPINOSAD AS INSECTICIDE IN ORGANIC FARMING - POSSIBILITIES OF USING AND MONITORING OF RESIDUES

**Abstrakt:** System rolnictwa ekologicznego wymaga stosowania ściśle określonych zasad produkcji roślinnej i zwierzęcej. Zostały one zawarte w unijnych i krajowych aktach prawnych. Spinosad nie znalazł się w Załączniku IIB Rozporządzenia (EWG) nr 2092/91 z dnia 24 czerwca 1991, w którym ujęto dozwolone substancje do ochrony upraw ekologicznych. W 2008 roku na mocy Rozporządzenia (EU) nr 404/2008 spinosad został wpisany do wspomnianego Załącznika IIB. Dotychczas w Polsce spinosad był stosowany głównie do zwalczania szkodników w szklarniowych uprawach roślin ozdobnych oraz wybranych szkodników w uprawach sadowniczych i warzywniczych. W krajach europejskich jego zastosowanie jest znacznie szersze. W artykule zamieszczono dane dotyczące możliwości stosowania spinosadu, który jest stosunkowo bezpieczny (z wyjątkiem pszczoł i trzmieli) dla owadów pożytecznych. Charakteryzuje się szerokim zakresem możliwości stosowania, wykazuje jedynie ograniczoną skuteczność w stosunku do niektórych gatunków chrząszczy, szkodliwych owadów ssących, siatkoskrzydłych oraz roztoczy. Uważa się, że spinosad jest produktem ulegającym szybkiej degradacji pod wpływem promieniowania słonecznego, jednak w najnowszej literaturze pojawiły się doniesienia o wykryciu w produktach żywnościowych jego pozostałości. W celu monitorowania jego pozostałości był on (suma spinosynu A i spinosynu D) ekstrahowany z próbek gleb mieszaniną acetonitylu i wody oraz oczyszczany z wykorzystaniem ekstrakcji ciecz-ciecz na kolumnkach Chem-Elut. Natomiast z materiału roślinnego ekstrakcję spinosadu przeprowadzono metodą QuEChERS. Następnie badane związki oznaczano metodą ultrasprawną chromatografię cieczową z detekcją na tandemowym detektorze mas (RP-UPLC-MS/MS). Odzyski z próbek wzbogaconych dodatkiem standardu analitycznego spinosadu (średnia z sumy spinosynu A i spinosynu D) na poziomie 0,01 mg kg<sup>-1</sup> wyniosły 93,2 i 99,8% odpowiednio dla gleby i materiału roślinnego (pomidory). Dolna granica oznaczalności dla spinosynu A i spinosynu D została ustalona na poziomie 0,01 mg kg<sup>-1</sup> dla obu typów materiałów.

**Słowa kluczowe:** spinosad, rolnictwo ekologiczne, zwalczanie szkodników, monitoring pozostałości

Rolnictwo ekologiczne jest promowane w różnorodny sposób, również poprzez wspieranie finansowe. Znalazło to swoje odbicie w Programach Rozwoju Obszarów Wiejskich przygotowanych na lata 2004-2006 oraz 2007-2013. Poprzez realizację programu rolnośrodowiskowego dotyczącego pakietu „Rolnictwo ekologiczne” polscy rolnicy mogą otrzymać pieniądze unijne. Dotacja taka jest przygotowana dla tych producentów rolnych, którzy, produkując, nie wpływają ujemnie na stan środowiska przyrodniczego. Przystąpienie do ekologicznego systemu produkcji rolniczej zobowiązuje producentów do przestrzegania zasad, które są zawarte w Rozporządzeniu EWG nr 2092/91 w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych. Krajowe ustawodawstwo również odwołuje się do tego aktu. W 2009 roku weszły znowelizowane akty prawne uchylające wspomniane Rozporządzenie (EWG) nr 2092/91 (obowiązuje Rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r.) oraz wkrótce zaczną

<sup>1</sup> Zakład Metod Biologicznych i Kwarantanny

<sup>2</sup> Zakład Badania Pozostałości Środków Ochrony Roślin

Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy, ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań, tel. 061 864 90 77, email: J.Kowalska@ior.poznan.pl

obowiązywać kompensacyjna polska Ustawa o rolnictwie ekologicznym. Rozporządzenie (WE) nr 834/2007 zawiera m.in. zasady ekologicznej produkcji roślinnej, zwierzęcej, przetwórstwa produktów ekologicznych oraz pozyskiwania surowców naturalnych ze stanowisk dziko rosnących. Przepisy wykonawcze do tegoż Rozporządzenia zawarto w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 889/2008. Zawiera ono trzynaście załączników. W drugim wymienione są dozwolone do produkcji pestycydy. Jest to lista, która również podlega pewnym zmianom, odzwierciedlającym aktualny stan badań. W 2008 roku został na tę listę wpisany spinosad, który dotychczas był jedynie rekomendowany przez IFOAM (Międzynarodowa Federacja Rolnictwa Ekologicznego). Umieszczenie spinosadu w Zał. IIB Rozporządzenia (EWG) nr 2092/91 stwarza znacznie większe możliwości ochrony upraw ekologicznych, gdyż spinosad charakteryzuje się szerokim spektrum podatnych na niego owadów.

### **Charakterystyka chemiczna i sposób działania spinosadu**

Spinosad jest produktem procesu fermentacji bakteryjnej mikroorganizmów *Saccharopolyspora spinosa* (*Actinomycetes*) należących do promieniowców, których budowa jest czymś pośrednim pomiędzy bakteriami i grzybami. Ze względu na chemiczną budowę spinosadu jest on zaliczany do makrocyklicznych laktonów, A:D 65-69:35-5, jako II-rzędowy metabolit grzyba [1].

W skład spinosadu wchodzi dwa metabolity-makrocykliczne laktony: spinosyn A i spinosyn D o wzorach sumarycznych  $C_{41}H_{65}NO_{10}$  +  $C_{42}H_{67}NO_{10}$  [2].

Spinosad wykazuje działanie węgłne na roślinach, jako substancja owadobójcza działa kontaktowo i przede wszystkim żołądkowo. Ze względu na specyfikę działania w organizmie owada zaliczany jest do insektycydów blokujących kanały chlorkowe związane z receptorami kwasu gamaaminomasłowego GABA - fenylopirazole. GABA występuje w układzie nerwowym owada jako mediator hamujący rozprzestrzenianie się bodźca w neuronie odbiorczym. Insektocydy, ingerując w wiązania GABA do synaptycznego receptora, zakłócają tym samym proces przenikanie jonów chloru. Wynikiem tego jest hamowanie potencjałów postsynaptycznych, a końcowym efektem paraliż szkodnika [3].

### **Charakterystyka biologiczna spinosadu**

Spinosad jest stosowany w ochronie upraw od 1990 roku. Ponad 200 różnych gatunków roślin uprawnych jest chronionych tą substancją. Z powodzeniem jest wykorzystywany do zwalczania szkodników z rzędu Lepidoptera (motyle), szczególnie gąsienic *Heliothis virescens* (szkodnik tytoniu), *Helicoverpa zea* (szkodnik bawełny), *H. armigera*, z rodziny sówkowatych (*Spodoptera* spp.) i zwojkowatych (*Tortricidae* spp., np. owocówka jabłkowiec, owocówka śliwkowiec) [4-6]. Inne badania potwierdzają jego skuteczność również w stosunku do motyli [7] oraz chrząszczy [8]. Z sukcesem zwalczą muchy (*Musca domestica*) [9], szarańczaki (*Locusta* spp.) [10], pchełki (*Phyllotreta* spp.) [11], szkodniki magazynowe [12] oraz szkodniki zbóż (*Oulema* spp.).

Niektóre gatunki owadów wykazują zróżnicowaną wrażliwość na spinosad, np. pluskwiaki i chrząszcze roślinożerne. Możliwość ich zwalczania istnieje jedynie w czasie ich wczesnych stadiów larwalnych, kiedy to larwy konsumują duże ilości pokarmu



roślinnego. Spinosad wykazuje bardzo niewielki efekt dla roztoczy oraz szkodników o ssącym aparacie gębowym [13-15].

Zaletą tej substancji jest to, że prawdopodobieństwo nabycia przez owady odporności na te insektycydy jest niewielkie. Na przykład, w przypadku stonki ziemniaczanej i spinosadu wykazano, że mechanizmy odpowiadające u niej za nabycie odporności są inne w przypadku spinosadu niż w przypadku insektycydów zawierających imidachloprid czy innych insektycydów z grupy neonicotynoidowych [16]. Stonka ziemniaczana jest podmiotem badań dotyczących wykorzystania spinosadu w rolnictwie ekologicznym, gdzie jest ekonomicznie ważnym szkodnikiem. Uzyskane rezultaty są zadowalające [17-20].

### Trwałość spinosadu w środowisku

Spinosad jest szybko degradowany poprzez działanie promieni słonecznych. Okres półtrwania spinosynu A wynosi od 1,6 do 16 dni w zależności od natężenia światła słonecznego. W sytuacji całkowitego braku nasłonecznienia okres półtrwania spinosynu A i D może wynosić co najmniej 200 dni. Po zastosowaniu spinosadu do wody zaobserwowano niewielki efekt hydrolizy i możliwość przetrwania tej substancji, natomiast po zastosowaniu spinosadu do wody poddawanej nasłonecznieniu występuje fotodegradacja. Na temat badań pozostałości tych substancji w jadalnych częściach roślin i glebie oraz dynamiki ich zanikania istnieje skąpa wiedza, dopiero od niedawna zajęto się tym zagadnieniem, gdyż przeważała opinia, że jest to substancja szybko degradowalna i tym samym niemożliwa do wykrycia. W najnowszej literaturze pojawiły się doniesienia o wykryciu w produktach żywnościowych jego pozostałości [21].

Badania pozostałości spinosynu A i spinosynu D, podstawowych składników spinosadu, przeprowadzono dwiema metodami. W badaniach gleby zastosowano ekstrakcję acetonitrylem z wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej, a następnie oczyszczania na kolumnkach ChemElut [22], natomiast w przypadku materiału roślinnego zastosowano metodę QuEChERS [23]. W przypadku matrycy roślinnej metodę w pełni zwalidowano dla pomidorów, truskawek, sałaty i pieczarek. Pozostałości spinosynu A i D oznaczano metodą ultrasprawną chromatografię cieczową z detekcją za pomocą tandemowego detektora masowego. Średnie odzyski dla gleby wzbogaconej standardem spinosadu wyniosły 93,2% z odchyleniem standardowym 7,8%, natomiast dla materiału roślinnego od 98,2% do 103,6% wraz z odchyleniem od 4,1% do 12,4% w zależności od badanej matrycy. Dolna granica oznaczalności dla spinosynu A i D została ustalona na poziomie 0,01 mg/kg dla wszystkich rodzajów materiałów.

### Podziękowanie

Praca naukowa finansowana ze środków państwowych na naukę w latach 2007-2010 jako projekt badawczy Nr NN 310 4358 33.

### Literatura

- [1] Mertz F.P i Yao R.C.: *Saccharopoly spora spinosa sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still*. Int. J. System. Bacteriol., 1990, **40**, 34-39.
- [2] Anonymus: Spinosad Technical Bulletin. Dow AgroSciences. 1997, 16 pp.
- [3] Salgado V.L.: *Studies on the mode of action of spinosad: insect symptoms and physiological correlates*. Pesticide Biochem. Physiol., 1998, **60**, 91-102.

- [4] Anastas P., Kirchoff M. i Williamson T.: *Spinosad - a new natural product for insect control*. Green Chemistry August, 1999, <http://www.rsc.org.greenchem>
- [5] Pluciennik Z. i Olszak R.W.: *Spinosad w zwalczaniu niektórych szkodników w sadach*. Progr. Plant Protect./Post. Ochr. Rośl., 2005, **45**, 1004-1008.
- [6] Thompson G. i Hutchins S.: *Spinosad - a new class of fermentation derived insect control agents*. Pesticide Outlook, 1999, **10**(12), 78-81.
- [7] Hines R.L. i Hutchison W.D.: *Evaluation of action thresholds and spinosad for lepidopteran pest management in Minnesota cabbage*. J. Econom. Entomol., 2001, **94**(1), 190-196.
- [8] Galvan T.L., Koch R.L. i Hutchison W.D.: *Toxicity of indoxacarb and spinosad to the multicolored Asian lady beetle, Harmonia axyridis, via three routes of exposure*. Pest. Manage. Sci., 2006, **62**(9), 797-804.
- [9] Scott J.G.: *Toxicity of spinosad to susceptible and resistant strains of house flies, Musca domestica*. Pesticide Sci., 1998, **54**, 131-133.
- [10] Amarasekare K.G. i Edelson J. V.: *Effect of temperature on efficacy of insecticides to differential grasshopper (Orthoptera: Acrididae)*. J. Econom. Entomol., 2004, **97**, 1595-1602.
- [11] Elliott R., Benjamin M. i Gillott C.: *Laboratory studies of the toxicity of spinosad and deltamethrin to Phyllotreta cruciferae (Coleoptera: Chrysomelidae)*. Canad. Entomol. (Ottawa), 2007, **139**(4), 534.
- [12] Fang L. i Subramanyam B.: *Activity of spinosad against adults of Rhyzopertha dominica (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) is not affected by wheat temperature and moisture*. J. Kansas Entomol. Soc., 2003, **76**, 529-532.
- [13] Thompson G.D., Dutton R. i Sparks T.C.: *Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme*. Pest Manage. Sci., 2000, **56**, 696-702.
- [14] Cowles R.S. i in.: *Inert formulation ingredients with activity: toxicity of trisiloxane surfactant solutions to twospotted mites*. J. Econ. Entomol., 2000, **93**(2), 180-188.
- [15] Tjosvold S.A. i Chaney W.E.: *Evaluation of reduced risk and other biorational miticides on the control of spider mites (Tetranychus urticae)*. Acta Horticult., 2001, **547**, 93-96.
- [16] Mota-Sanchez D., Hollingworth R.M., Grafius E.J. i Moyer D.D.: *Resistance and cross-resistance to neonicotinoid insecticides and spinosad in the Colorado potato beetles, Leptinotarsa decemlineata (Say)*. Pest. Manage. Sci., 2006, **62**(1), 30-37.
- [17] Pawińska M.: *Skuteczność insektycydów nowej generacji w zwalczaniu stonki ziemniaczanej Leptinotarsa decemlineata (Say)*. Progr. Plant Protect./Post. Ochr. Rośl., 2007, **47**(1), 340-351.
- [18] Kowalska J.: *Laboratory studies of the activity of spinosad against Leptinotarsa decemlineata (Say) depending on different temperature*. ISOFAR/IFOAM/Organic World Congr. Proceed., Modena 18-20 June 2008, vol. (1), organic crop production: 532-535.
- [19] Kühne S., Kowalska J., Priegnitz U. i Moll E.: *The effect of spinosad on the control of Colorado potato beetle (Leptinotarsa decemlineata Say) in organic farming*. Mitteilungen des Julius Kühn-Institutes. **56**. Deutsche Pflanzenschutztagung, 22-25.09.2008, Kiel, Niemcy.
- [20] Kühne S., Priegnitz U., Ellmer F., Moll E. i Kowalska J.: *Feldversuche zur Wirkung von Spinosad-, Neem- und B.t.t.-Präparaten auf die Regulierung des Kartoffelkäfers (Leptinotarsa decemlineata Say) - 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau*. [http://orgprints.org/view/projects/int\\_conf\\_2009\\_wita.html](http://orgprints.org/view/projects/int_conf_2009_wita.html)
- [21] Thompson D.G., Harris B.J., Buscarini T.M. i Chartrand D.T.: *Fate of spinosad in litter and soils of a white spruce plantation in central Ontario*. Pest. Manage. Sci., 2002, **58**(4), 397-404.
- [22] Drożdżyński D. i Folkman W.: *Determination of metamitron residues in sugar beet plants and soil applying solid-supported liquid-liquid extraction followed by gradient RP-HPLC*. Chem. Anal. (Warsaw), 2006, **51**, 439-446.
- [23] Anastassiades M., Lehota S.J., Stajnbaher D. i Schenck F.J.: *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce*. J. Associat. Anal. Community Int., 2003, **86**, 412-431.

## SPINOSAD AS INSECTICIDE IN ORGANIC FARMING - POSSIBILITIES OF USING AND MONITORING OF RESIDUES

**Abstract:** The organic farming requires of strictly defined plant and animal production's rules. All of them are included in both the Polish and European legal acts and in the private standards of organic associations. Spinosad was not included in the Annex IIB of Regulation EWG No. 2092/91, where are listed all substances permitted to use in protection of organic crops. In 2008 year spinosad was added to the mentioned Annex. In Poland spinosad

is used to control only of selected pests in orchards, vegetables and ornamental plants. In the European countries this substance is applied against many others pests. Efficacy of spinosad is different and depends on mode of application and species of pest. In the article are presented data about spectrum of action of spinosad, which is relatively safe for beneficial organisms with exceptions of bees. Spinosad is very promising insecticide against injuries insects, the limited efficacy was observed for some beetles, the sucking insects, the lacewings and the mites, only. This product can be easy degraded by sunlight, but in the newest literature has appeared information on detection of residues of spinosad in food. In order of monitoring of spinosad it was (sum of spinosyn A and spinosyn D) extracted from soil samples using acetonitrile - water mixture and cleaning by solid supported liquid-liquid extraction (SLE, Chem-Elut) and from plant material using QuEChERS method followed by reverse phase ultra performance liquid chromatography analysis with quadrupole mass detection (RP-UPLC-MS/MS). Recoveries for the samples spiked with spinosad at the level of 0.01 mg/kg averaged 93.2 and 99.8% for soil and plant material, respectively. The limit of quantification for spinosyn A and spinosyn D were 0.01 mg/kg for both types of materials.

**Keywords:** spinosad, organic farming, control of pests, residues monitoring



Anna KRZEPILKO<sup>1</sup> i Agata ŚWIĘCIŁO<sup>1</sup>

## CZY ANTYOKSYDANTY PRZECIWDZIAŁAJĄ SKUTKOM TOKSYCZNEGO ODDZIAŁYWANIA PYRETHROIDÓW NA KOMÓRKI DROŻDŻY *Saccharomyces cerevisiae*?

### DO ANTIOXIDANTS COUNTERACT THE TOXIC EFFECTS OF PYRETHROIDS ON *Saccharomyces cerevisiae* YEAST?

**Abstrakt:** Pyretroidy są estrami alkoholi pierwszo- lub drugorzędowych zawierających przynajmniej jedno wiązanie podwójne i kwasu chryzantemowego lub halogenowych analogów tego kwasu. Związki te znalazły zastosowanie jako insektycydy. Mechanizm ich toksycznego działania na owady polega na hamowaniu aktywności kanałów jonowych w komórkach nerwowych. Według danych literaturowych, te pestycydy mogą wywoływać u różnych organizmów szereg niespecyficznych reakcji, których wspólnym mechanizmem może być generowanie reaktywnych form tlenu. Celem prezentowanej pracy było zbadanie, czy dodatek antyoksydantów do pożywki uchroni komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przed zabiciem powodowanym inkubacją z pyretroidami. Komórki drożdży inkubowano przez 2 h z wybranymi pyretroidami, a następnie wysiewano na pożywkę stałą zawierającą różne antyoksydanty. Porównywano przeżywalność komórek drożdży na pożywkach kontrolnych i wzbogaconych o antyoksydanty. W przypadku komórek drożdży nie stwierdzono ochronnej roli zastosowanych antyoksydantów przed toksycznością pyretroidów.

**Słowa kluczowe:** pyretroidy, antyoksydanty, drożdże

Pyretroidy są estrami alkoholi pierwszo- lub drugorzędowych zawierających przynajmniej jedno wiązanie podwójne i kwasu chryzantemowego [kwasu 3-(2,2-dimetylowinylo)-2,2-dimetylocyklopropanokarboksyłowego] lub halogenowych analogów tego kwasu [1]. W wielu pracach autorzy podkreślają ostrą toksyczność pyretroidów dla owadów, ryb i innych wodnych organizmów [2-4]. Związki te powodują zahamowanie funkcji kanałów przewodnictwa jonowego (kanały sodowe) w membranach komórek nerwowych owadów, co w konsekwencji prowadzi do śmierci owada [5]. Pyretroidy tak jak i inne ksenobiotyki mogą wpływać na funkcjonowanie ich komórek. Według danych literaturowych, wspólnym mechanizmem tych niespecyficznych reakcji u różnych organizmów na pyretroidy może być generowanie wolnych rodników [6]. W wyniku fizjologicznych procesów związanych z metabolizmem tlenu w komórkach powstają reaktywne formy tlenu. Równowaga pomiędzy wytwarzaniem i usuwaniem reaktywnych form tlenu jest utrzymywana dzięki enzymom antyoksydacyjnym i antyoksydantom. Zaburzenie tej homeostazy przejawia się wzrastającym stężeniem wolnych rodników i prowadzi do stresu oksydacyjnego [7]. Za generowanie wolnych rodników odpowiada wiele różnych czynników środowiskowych, między innymi pestycydy.

W komórkach wszystkich organizmów występuje znacznie zróżnicowana pod względem budowy chemicznej grupa związków pełniących funkcje antyoksydacyjne. Zadaniem tych molekuł jest reagowanie z wolnymi rodnikami, hamowanie reakcji wolnorodnikowych na wczesnych etapach ich propagacji. Wolne rodniki mogą niespecyficznie reagować z antyoksydantami, takimi jak: glutation, cysteina, witaminy A,

<sup>1</sup> Wydział Nauk Rolniczych w Zamościu, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Szczepiezska 102, 22-400 Zamość, tel. 084 677 27 24, email: akrzepilko@wnr.edu.pl

C i E, kwas moczowy, tauryna, metalotioneiny, polifenole roślinne. Komórki drożdży nie są zdolne do syntezy tokoferoli i kwasu askorbinowego, jednak łatwo pobierają z pożywki te składniki i wbudowują w struktury komórkowe. Drożdże *S. cerevisiae* wytwarzają kwas erytroaskorbinowy, jednak jego stężenie jest znacznie mniejsze niż stężenie kwasu askorbinowego w komórkach innych eukariotycznych organizmów [8].

Celem prezentowanej pracy było zbadanie, czy dodatek antyoksydantów do pożywki uchroni komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* przed zabiciem powodowanym inkubacją z pyretroidami. Zastosowano antyoksydanty działające w obrębie środowiska hydrofilowego i hydrofobowego organelli komórkowych, takie jak kwas askorbinowy i alfa-tokoferol, a także ich pochodne: kwas palmitylo-6-askorbinowego (działa w obrębie środowiska błon komórkowych) i kwas bursztynilo-alfa-tokoferolu (działa też w obrębie środowiska hydrofilowego komórki).

### **Materiał i metody**

Szczep drożdży - SP-4 Mat  $\alpha$  leu1 arg4 [9].

#### *Warunki hodowli drożdży*

Drożdże hodowano w pożywce płynnej YPG, w warunkach standardowych do fazy późnologicarnej. Komórki drożdży inkubowano przez dwie godziny z następującymi pyretroidami: cypermetryna, fenwalerat, tetrametryna, permetryna. Po inkubacji z pyretroidami zawiesinę komórek drożdży wysiano na szalki z pożywką stałą YPG + 2% agar z dodatkiem antyoksydantów w stężeniach, które nie zmniejszają przeżywalności komórek drożdży.

Roztwory antyoksydantów wcierano w zestaloną pożywkę bezpośrednio przed wysiewem. Szalki po wysiewie inkubowano dwie doby w temperaturze 28°C, a następnie policzono liczbę kolonii. Przeżywalności komórek drożdży określono w procentach. Za 100% przyjęto liczbę kolonii uzyskaną w próbie kontrolnej.

### **Wyniki i ich omówienie**

Pierwsza część doświadczenia miała na celu ustalenie wpływu wybranych antyoksydantów na przeżywalność komórek drożdży. Ustalono stężenia, które nie powodują obniżenia przeżywalności komórek drożdży, były to: 0,015 mM dla alfa-tokoferolu, 0,006 mM dla bursztynilo-alfa-tokoferolu, 0,016 mM dla palmitynianu-6-askorbylu i 40 mM dla kwasu askorbinowego. Drożdże są zdolne do wzrostu w obecności dużych dawek witaminy C. Następnie zbadano wpływ pyretroidów na przeżywalność komórek drożdży. Po zastosowaniu dawki 50  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^3$  stwierdzono, że najbardziej toksyczna jest cypermetryna, następnie tetrametryna i permetryna, natomiast fenwalerat nie zmniejszał przeżywalności komórek drożdży (tab. 1). Większa dawka pyretroidów 100  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^3$  była bardziej toksyczna, silne zmniejszenie przeżywalności stwierdzono dla permetryny i fenwaleratu. Chcąc sprawdzić, czy dodatek antyoksydantów chroni przed toksycznym działaniem pyretroidów, komórki drożdży inkubowano z: cypermetryną, fenwaleratem, tetrametryną, permetryną, a następnie wysiano je na podłoża zawierające antyoksydanty. Nie stwierdzono jednak znaczącego wpływu antyoksydantów na przeżywalność komórek drożdży (tab. 1). Jedynie przy mniejszej

zastosowanej dawce cypermetryny, tetrametryny i permetryny stwierdzono niewielki wzrost przeżywalności w próbie z alfa-tokoferolem. Po inkubacji z 50  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^3$  cypermetryną, a następnie wysianiu komórek na pożywkę wzbogaconą o alfa-tokoferol wzrost przeżywalności wynosił około 16%, dla tetrametryny 13% i 10% dla permetryny.

Tabela 1

Przeżywalność [%] komórek drożdży w fazie późnologarytmicznej szczepu dzikiego SP4 w obecności wybranych antyoksydantów po wcześniejszej inkubacji z pyretroidem

Table 1

Survival rate [%] of wild type SP4 (*wt*) yeast cells in the late logarithmic phase of growth in the presence of selected antioxidants after previous incubation with pyrethroid

Rodzaj i stężenie końcowe antyoksydantów [mM]	Rodzaj i stężenie końcowe pyretroidów [ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^3$ ]							
	cypermetryna		fenwalerat		tetrametryna		permetryna	
	50	100	50	100	50	100	50	100
kontrola przeżywalności po inkubacji z pyretroidem	78,5	47,7	100	25,3	76,2	41,3	87,4	25,2
alfa-tokoferol 0,015	95,2	37,8	103,2	13,25	69,5	51,3	83,8	32,9
kwas bursztynowy-alfa-tokoferolu 0,006	84,7	23,9	102,7	10,95	89,7	34,9	79,9	30,2
kwas palmitylo-6-askorbinowy 0,016	78,3	33,1	119	24,1	77,9	37,7	72,7	22,6
kwas askorbinowy 40	85,2	36,4	97,1	29,6	75,2	40,8	86,4	23,9

### Podsumowanie i wnioski

1. Pyretroidy powodują obniżenie przeżywalności komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Dodatek antyoksydantów nie wpływa znacząco na przeżywalność komórek drożdży wcześniej inkubowanych z pyretroidem.

### Podziękowanie

Praca finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2005-2008 jako projekt badawczy Nr 2 P06T 09128.

### Literatura

- [1] Różański L.: Vademecum pestycydów. Wyd. Agra-Enviro Lab., Poznań 1996, 1-72.
- [2] Krzepińko A.: Post. Nauk Rol., 2002, **1**, 69-76.
- [3] Lutnicka H.: Rozpr. nauk., AR w Lublinie, 2001, 252, (104).
- [4] Gabbianelli R., Falcioni G., Nasuti C. i Cantalamessa F.: Toxicology, 2002, **175**, 91-101.
- [5] Scharf M., Neal J. i Bennet G.: Pest. Biochem. Phys., 1998, **59**, 67-79.
- [6] Giray B., Gurbay A. i Hincal F.: Toxicol. Lett., 2001, **118**(3), 139-146.
- [7] Sies H.: Trans. Philosoph., Soc., (London), Biol. Sci., 1985, **17**(311), 617-631.
- [8] Huh W., Lee B., Kim S., Kim Y., Rhie G., Baek Y., Hwang C., Lee J. i Kang S.: Mol. Microbiol., 1998, **30**, 895-903.
- [9] Biliński T., Krawiec Z., Liczmański A. i Litwińska J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 1985, **130**(2), 533-539.

## DO ANTIOXIDANTS COUNTERACT THE TOXIC EFFECTS OF PYRETHROIDS ON *Saccharomyces cerevisiae* YEAST?

**Abstract:** Pyrethroids are synthetic esters of primary or secondary alcohols containing at least one double bond and chrysanthemic acid [2,2-dimethyl-3-(2-methylpropenyl)-cyclopropanecarboxylic acid] or halogen analogues of this acid. These compounds have been used as insecticides. Their mechanism of toxic action on insects consists in inhibiting the activity of ion channels in nerve cells. According to data from the literature, generation of reactive forms of oxygen may be the mechanism of numerous non-specific reactions induced by these pesticides in various organisms. The aim of this study was to determine whether supplementing media with antioxidants protects *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells from loss of viability caused by incubation with pyrethroids. The yeast cells were incubated for 2 h with selected pyrethroids and then plated on solid medium containing various antioxidants. The survival rates of yeast cells grown on control media and enriched media were compared. The antioxidants applied were not found to protect the yeast cells from the toxicity of the pyrethroids.

**Keywords:** pyrethroids, yeast, antioxidants



Andrzej MAKOWSKI<sup>1</sup>, Andrzej SOBCZAK<sup>1</sup>, Danuta WCISŁO<sup>1</sup>, Ewa ADAMEK<sup>1</sup>  
Wojciech BARAN<sup>1</sup> i Witold NOCON<sup>2</sup>

## FOTOKATALITYCZNA DEGRADACJA AMPICYLINY W ROZTWORACH WODNYCH

### PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF AMPICILLIN IN WATER SOLUTIONS

**Abstrakt:** Metody zaawansowanego utleniania, polegające na generowaniu reaktywnych rodników hydroksylowych, są stosowane do usuwania antybiotyków z roztworów wodnych. Mogą być też stosowane do degradacji antybiotyków do związków przejściowych, które następnie ulegają łatwiej biodegradacji. Roztwory antybiotyków naświetlano promieniowaniem UV  $\lambda = 366$  nm w obecności fotokatalizatora P 25 Degussa. Zawartość ampicyliny i jej produktów przejściowych w trakcie fotodegradacji badano metodą HPLC. Stałe szybkości rozkładu ampicyliny wyznaczano z zależności  $\log C/C_0$  od czasu trwania procesu. Dodatek jonów żelaza do roztworu ampicyliny powoduje nieznaczny spadek szybkości jej degradacji. Wpływ jonów miedzi zależy od stosunku molowego metalu do antybiotyku. Wpływ jonów wapnia na szybkość rozpadu ampicyliny jest niewielki, natomiast w przypadku jonów magnezu i jonów kobaltu powoduje spadek szybkości degradacji ampicyliny. Na powierzchni katalizatora P 25 adsorbuje się ampicylina; proces ulega zmianie w obecności jonów metali i jonów fosforanowych.

**Słowa kluczowe:** ampicylina, fotokatalityczna degradacja

W ostatnich latach poświęca się wiele uwagi mikrozanieczyszczeniom środowiska, tj. lekom i ich metabolitom [1, 2]. Obecna tendencja do syntetyzowania odpornych na mechanizmy biotransformacyjne leków prowadzi do powstawania trwałych i odpornych na chemiczną i biologiczną degradację substancji, a w konsekwencji zwiększa zawartość leków w ściekach i wodach powierzchniowych. Antybiotyki  $\beta$ -laktamowe, takie jak naturalne penicyliny, m.in. półsyntetyczna ampicylina, są wydalane w niezmienionej postaci w 60÷90% [3]. W ten sposób przedostają się do ścieków lub ewentualnie do wody pitnej, jeżeli nie ulegną eliminacji podczas ich oczyszczania. Jest to zagrożenie dla ludzkiego zdrowia, gdyż obecność antybiotyków w środowisku powoduje powstawanie lekooporności wielu szczepów bakterii [4].

Jedną z metod usuwania antybiotyków z roztworów wodnych jest metoda fotokatalityczna. Polega ona na utlenianiu zanieczyszczeń poprzez naświetlanie roztworów antybiotyków z zawiesiną fotokatalizatora niskoenergetycznym promieniowaniem UV [5-8].

Celem przedstawionej pracy było zbadanie kinetyki fotokatalitycznej degradacji ampicyliny i wpływu jonów metali  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i jonów fosforanowych oraz pH środowiska na jej przebieg.

### Część doświadczalna

Naświetlano roztwory wodne ampicyliny ( $C_{16}H_{19}N_3O_4S$  cz.d.a. Sigma-Aldrich) oraz ampicyliny z zawiesiną  $TiO_2$  (P 25 firmy Degussa, rozmiar cząstek 21 nm,

<sup>1</sup> Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, email: pulp@interia.pl

<sup>2</sup> Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN, ul. M. Skłodowskiej-Curie 34, 41-819 Zabrze

powierzchnia właściwa  $50 \text{ m}^2/\text{g}$ ), oraz roztwory antybiotyków z jonami metali w obecności fotokatalizatora. Do przygotowania roztworów antybiotyku z jonami metali o odpowiednim stosunku molowym używano roztworów chlorków metali cz.d.a. Do przygotowania roztworów z jonami fosforanowymi używano wodorofosforanu(V) amonu cz.d.a. POCh. Badane roztwory antybiotyku z jonami metali i z jonami fosforanowymi opisano w tabeli 1. Proces prowadzono w krystalizatorach z ciągłym mieszaniem za pomocą mieszadeł magnetycznych i z dostępem powietrza atmosferycznego. Stosowano 4 lampy Philips TL-40 W/05 o natężeniu promieniowania  $2,9 \text{ mW cm}^{-2}$  i maksimum emisji przy długości fali  $\lambda = 366 \text{ nm}$ . W naświetlanych roztworach po odwirowaniu badano zmiany stężenia ampicyliny metodą HPLC. Stosowano detektor UV-VIS f-my Merck-Hitachi o długości fali  $\lambda = 220 \text{ nm}$  i kolumnę BDS Hypersil C18 o uziarnieniu  $5 \mu\text{m}$ , długości  $150 \text{ mm}$  i średnicy  $2,1 \text{ mm}$ . Jako fazę ruchomą stosowano roztwór buforu mrówczanowego i acetonitrylu o stosunku objętościowym 1:1. Następnie wyznaczano zależność  $\log C/C_0$  od czasu trwania procesu fotokatalitycznego i obliczano stałe szybkości fotokatalitycznej degradacji ampicyliny. Oceniając wpływ pH na stałe szybkości degradacji antybiotyku, badano jego roztwory o pH ustalonym odpowiednio poprzez dodatek  $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$  lub  $0,1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaOH}$ .

Roztwory ampicyliny o stężeniu  $0,1 \text{ mmol/dm}^3$  z jonami metali i jonami fosforanowymi

Tabela 1

Solutions of ampicillin ( $0.1 \text{ mmol/dm}^3$ ) with metal and phosphate ions

Table 1

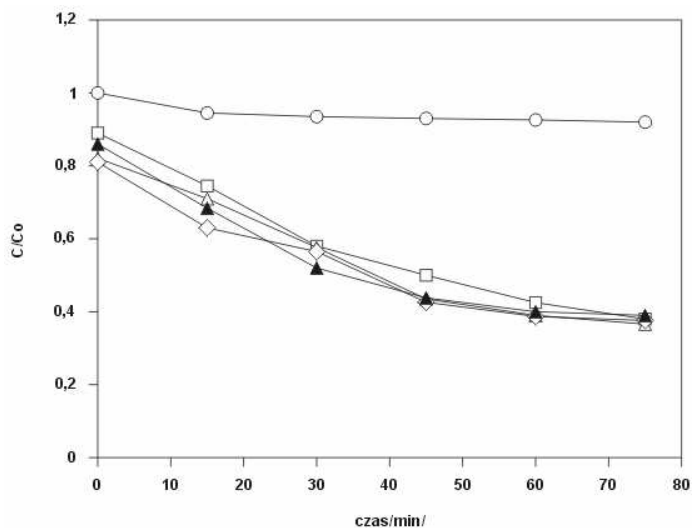
Jony	Stosunek molowy antybiotyk : jony metalu
$\text{Fe}^{3+}$	1; 3; 5; 10
$\text{Cu}^{2+}$	1; 5
$\text{Ca}^{2+}$	5; 10
$\text{Mg}^{2+}$	5; 10
$\text{Co}^{2+}$	10
$\text{HPO}_4^{2-}$	1; 5

## Wyniki i ich omówienie

Zależność  $C/C_0$  ampicyliny od czasu trwania procesu fotolitycznego dla roztworu ampicyliny i procesu fotokatalitycznego dla roztworu tego antybiotyku i jego roztworów z jonami żelaza o różnym stosunku molowym antybiotyk : metal zamieszczono na rysunku 1. Jak wynika z tego rysunku i danych z tabeli 2, dodatek jonów żelaza powoduje zmniejszenie szybkości fotokatalitycznego rozpadu ampicyliny. Szybkość procesu fotolitycznego jest wielokrotnie mniejsza niż procesu fotokatalitycznego.

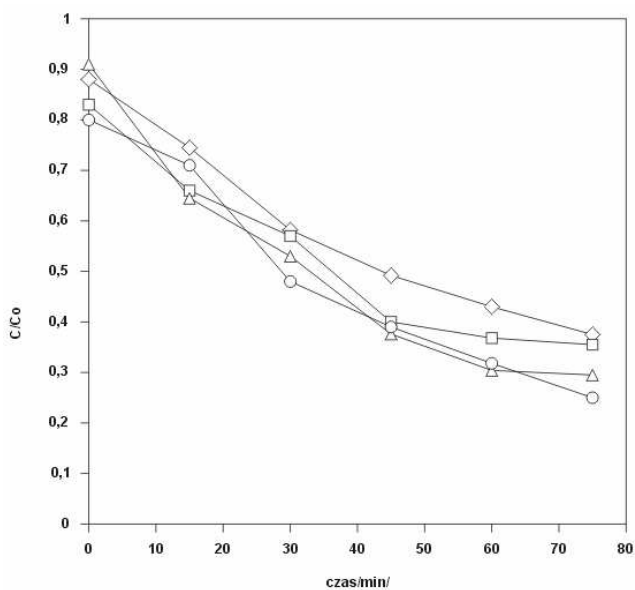
Na rysunku 2 zamieszczono zależność  $C/C_0$  ampicyliny w roztworze tego antybiotyku i jej roztworach z jonami  $\text{Ca}^{2+}$  i jonami fosforanowymi od czasu trwania procesu fotokatalitycznego. Jak wynika z danych w tabeli 2, jony wapnia nieznacznie wpływają na szybkość procesu, a jony fosforanowe przyspieszają proces degradacji ampicyliny.

Z rysunku 3 i danych z tabeli 2 wynika, że jony magnezu wpływają na szybkość degradacji ampicyliny wraz ze wzrostem ich stężenia w roztworze.



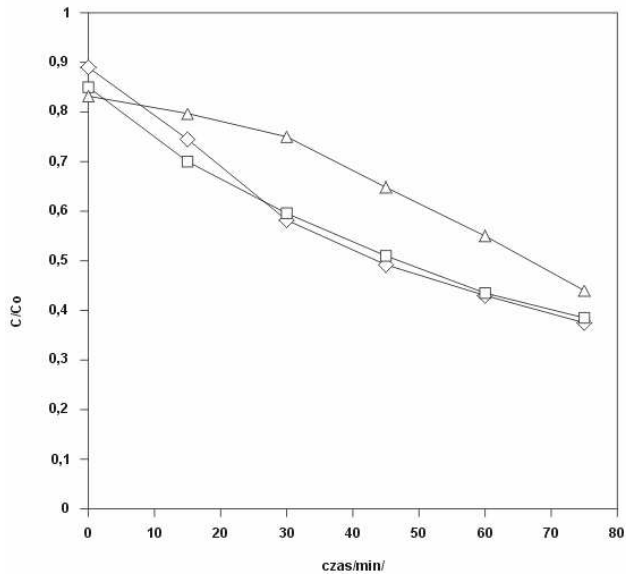
Rys. 1. Zależność  $C/C_0$  dla ampicyliny: o bez  $TiO_2$ , □ z  $TiO_2$ , △  $Fe^{3+}$ : ampicylina = 1:1, ◇  $Fe^{3+}$ : ampicylina = 5:1, ▲  $Fe^{3+}$ : ampicylina = 10:1 od czasu degradacji

Fig. 1. Relationship of  $C/C_0$  for ampicillin: o without  $TiO_2$ , □ with  $TiO_2$ , △  $Fe^{3+}$ : ampicillin = 1:1, ◇  $Fe^{3+}$ : ampicillin = 5:1, ▲  $Fe^{3+}$ : ampicillin = 10:1 vs degradation time



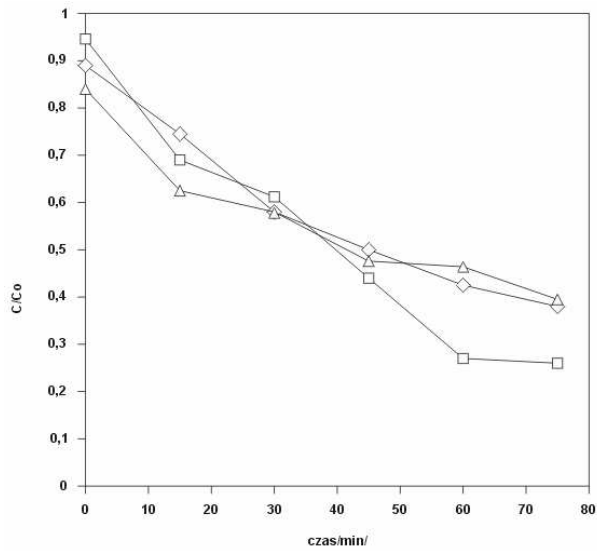
Rys. 2. Zależność  $C/C_0$  dla ampicyliny: ◇ z  $TiO_2$ , □  $Ca^{2+}$ : ampicylina = 10:1, △  $Co^{2+}$ : ampicylina = 10:1, o  $HPO_4^{2-}$ : ampicylina = 10:1 od czasu degradacji

Fig. 2. Relationship of  $C/C_0$  for ampicillin ◇ z  $TiO_2$ , □  $Ca^{2+}$ : ampicillin = 10:1, △  $Co^{2+}$ : ampicillin = 10:1, o  $HPO_4^{2-}$ : ampicillin = 10:1 vs degradation time



Rys. 3. Zależność  $C/C_0$  dla ampicyliny:  $\diamond$  z  $TiO_2$ ,  $\square$   $Mg^{2+}$ : ampicylina = 5:1,  $\triangle$   $Mg^{2+}$ : ampicylina = 10:1 od czasu degradacji

Fig. 3. Relationship of  $C/C_0$  for ampicillin:  $\diamond$  z  $TiO_2$ ,  $\square$   $Mg^{2+}$ : ampicillin = 5:1,  $\triangle$   $Mg^{2+}$ : ampicillin = 10:1 vs degradation time



Rys. 4. Zależność  $C/C_0$  dla ampicyliny:  $\diamond$  z  $TiO_2$ ,  $\square$   $Cu^{2+}$ : ampicylina = 1:1,  $\triangle$   $Cu^{2+}$ : ampicylina = 5:1 od czasu degradacji

Fig. 4. Relationship of  $C/C_0$  for ampicillin:  $\diamond$  z  $TiO_2$ ,  $\square$   $Cu^{2+}$ : ampicillin = 1:1,  $\triangle$   $Cu^{2+}$ : ampicillin = 5:1 vs degradation time

Na rysunku 4 uwidoczono zależność  $C/C_0$  ampicyliny w roztworze tego antybiotyku i jej roztworach z jonami miedzi od czasu trwania procesu fotokatalitycznego. Jak wynika z tabeli 2, początkowo szybkość degradacji wzrasta, a następnie wraz ze wzrostem stężenia miedzi maleje. Wiąże się to z osadzaniem metalicznej miedzi na powierzchni fotokatalizatora w trakcie procesu fotokatalitycznego [9]. Jony kobaltu (tab. 2) powodują zmniejszenie szybkości fotokatalitycznego rozpadu ampicyliny. Wpływ pH roztworu na szybkość fotokatalitycznego rozpadu ampicyliny nie jest jednoznaczny, optymalnym odczynem roztworu wydaje się być 7,15 (tab. 3).

Tabela 2  
Stałe szybkości rozkładu fotokatalitycznego ampicylinyTable 2  
Rate constants of ampicillin photocatalytic degradation

Jony metalu	Stosunek molowy ampicylina : jony metalu	Stała szybkości [s <sup>-1</sup> ]	Czas połowicznego rozkładu [s]
-----	-----	$1,957 \cdot 10^{-4}$	3541,13
Fe <sup>3+</sup>	1	$1,964 \cdot 10^{-4}$	3536,92
''	3	$1,881 \cdot 10^{-4}$	3684,21
''	5	$1,810 \cdot 10^{-4}$	3890,12
''	10	$1,802 \cdot 10^{-4}$	3840,46
Cu <sup>2+</sup>	1	$3,071 \cdot 10^{-4}$	2256,59
''	5	$1,535 \cdot 10^{-4}$	4514,66
Ca <sup>2+</sup>	5	$2,188 \cdot 10^{-4}$	3167,28
''	10	$1,996 \cdot 10^{-4}$	3471,94
Mg <sup>2+</sup>	5	$1,497 \cdot 10^{-4}$	4629,26
''	10	$1,420 \cdot 10^{-4}$	4880,82
Co <sup>2+</sup>	10	$1,574 \cdot 10^{-4}$	4402,79
Jony fosforanowe	Stosunek molowy ampicylina : jony fosforanowe	Stała szybkości [s <sup>-1</sup> ]	Czas połowicznego rozkładu [s]
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1	$2,610 \cdot 10^{-4}$	2655,17
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	5	$2,917 \cdot 10^{-4}$	2375,73
Proces fotolityczny (naświetlanie bez TiO <sub>2</sub> )			
stała szybkości [s <sup>-1</sup> ]		czas połowicznego rozkładu [s]	
$1,535 \cdot 10^{-5}$		45146,58	

Tabela 3

Stałe szybkości rozkładu fotokatalitycznego ampicyliny w zależności od pH roztworu

Table 3

Rate constants of ampicillin photocatalytic degradation, determined for different pH values

pH	Stała szybkości [s <sup>-1</sup> ]	Czas połowicznego rozpadu [s]
4,3	$1,957 \cdot 10^{-4}$	3541,13
7,15	$2,457 \cdot 10^{-4}$	2820,51
10,25	$1,804 \cdot 10^{-4}$	3841,47

## Podsumowanie

Stwierdzono, że na proces fotokatalitycznej degradacji ampicyliny wpływają badane jony metali i jony fosforanowe. Jony żelaza, podobnie jak jony wapnia, nieznacznie wpływają na szybkość rozpadu ampicyliny, a wpływ jonów miedzi zależy od stosunku

molowego metalu do antybiotyku. Jony kobaltu i magnezu zmniejszają szybkość rozpadu antybiotyku w odróżnieniu od jonów fosforanowych.

### Literatura

- [1] Hirsch R., Ternes T., Haberer K. i Kratz L.: *Sci. Total Environ.*, 1999, **118**, 109-118.
- [2] Molinari R., Pirillo F., Loddo V. i Palmisano G.: *Catal. Today*, 2006, **118**, 205-213.
- [3] Forth W., Henschler D., Rummel W. i Starke K.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaft, Mannheim 1992.
- [4] Kummerer K.: *Chemosphere*, 2001, **45**, 957-969.
- [5] Kaniou S., Pitarakis K., Barlagianni I. i Poullos I.: *Chemosphere*, 2005, **60**, 372-380.
- [6] Bautitz I. i Nogueira T.: *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2007, **187**, 33-39.
- [7] Hermann J.M.: *Catal. Today*, 1999, **53**, 115-129.
- [8] Kummerer K.: *Pharmaceuticals in the Environment - Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer Verlag 2001.
- [9] Brezova V., Blazkova A., Borosova E., Ceppan M. i Fiala R.: *J. Mol. Catal. A: Chemical*, 1995, **98**, 109-116.

## PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF AMPICILLIN IN WATER SOLUTIONS

**Abstract:** The advanced oxidation methods are applied to remove antibiotics from water solutions. They involve generating hydroxylic radicals (OH) with high oxidation potential, which are able to mineralize organic compounds. They can be used to degrade antibiotics to transient metabolites, which are then easily biodegradable. They were irradiated with UV  $\lambda = 366$  nm in the presence of P 25 Degussa photocatalyst. The level of ampicillin and its transient products during photocatalytic degradation was tested using the HPLC method. To estimate the photocatalytic degradation rate constants of ampicillin, the relationship  $\log C/C_0$  from time of duration of photocatalytic process were defined. The addition of iron ions to the ampicillin solution slightly slows down its photocatalytic degradation. The influence of copper ions on the speed of ampicillin degradation depends on the molar ratio of metal to antibiotic. The influence of calcium ions on the speed of ampicillin breakdown is not too significant, while in the case of magnesium ions, similar to cobalt ions, the ampicillin breakdown slows down. Ampicillin is adsorbed on the surface of P 25 catalyst; the process changes in the presence of metal ions and phosphate ions. The optimum of environment during the photodegradation process is pH reaction 7.2.

**Keywords:** ampicillin, photocatalytic degradation

Andrzej MAKOWSKI<sup>1</sup>, Andrzej SOBCZAK<sup>1</sup>, Danuta WCISŁO<sup>1</sup>, Ewa ADAMEK<sup>1</sup>  
Wojciech BARAN<sup>1</sup> i Maciej KOSTECKI<sup>2</sup>

## FOTOKATALITYCZNA DEGRADACJA DOKSYCYKLINY W ROZTWORACH WODNYCH

### PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF DOXYCYCLINE IN WATER SOLUTIONS

**Abstrakt:** Wśród substancji stanowiących mikrozanieczyszczenia wód powierzchniowych, ścieków i gleby znajdują się leki i ich metabolity. Najbardziej niebezpieczne są antybiotyki, gdyż są trudno biodegradowalne i wywołują powstawanie zjawiska lekooporności wielu szczepów bakterii. Zaawansowane procesy utleniania są powszechnie akceptowanymi technologiami oczyszczania ścieków, wód gruntowych i powierzchniowych z opornych i trudno biodegradowalnych zanieczyszczeń organicznych. Polegają one na generowaniu rodników hydroksylowych ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) o wysokim potencjale utleniającym, które są zdolne zmineralizować związki organiczne. Roztwory antybiotyków naświetlano promieniowaniem UV  $\lambda = 366$  nm w obecności fotokatalizatora P 25 firmy Degussa. Zawartość doksyicykliny i jej produktów przejściowych podczas fotokatalitycznej degradacji badano metodą HPLC. Stałe szybkości fotokatalitycznego rozkładu doksyicykliny wyznaczano z zależności  $\log C/C_0$  od czasu trwania procesu. Jony żelaza i kobaltu przyspieszają proces fotokatalitycznego rozpadu doksyicykliny, natomiast jony miedzi, wapnia, magnezu i jony fosforanowe spowalniają ten proces. Na powierzchni P 25 następuje proces adsorpcji doksyicykliny, największy w przypadku obecności w roztworze jonów żelaza. Jony miedzi ulegają w trakcie procesu redukcji i miedź osadza się na powierzchni fotokatalizatora. Optymalnym odczynem podczas procesu jest pH równe 6,8; nie znaleziono jednak korelacji pomiędzy stałymi szybkości rozpadu doksyicykliny a pH roztworu.

**Słowa kluczowe:** doksyicyklina, fotokatalityczna degradacja, proces fotokatalityczny

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie występowaniem farmaceutyków w środowisku, gdyż ich szerokie zastosowanie w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt prowadzi do ich niepożądanego kumulacji. Zawartość farmaceutyków oznaczono w ściekach oczyszczalni i wodach rzek Renu, Łaby i Dunaju na poziomie kilku  $\mu\text{g}/\text{dm}^3$  [1]. Do farmaceutyków tych należą m.in.: antybiotyki [2], hormony [3], środki znieczulające, przeciwwzpalne i przeciwbólowe [4] oraz  $\beta$ -blokery, cytostatyki i środki odkażające i kontrastowe [5].

W 2000 roku w Unii Europejskiej zużyto 13 280 Mg antybiotyków, z czego 65% do leczenia ludzi. W zależności od rodzaju antybiotyku (np. doksyicyklina i ampicylina 50÷90%) jest wydalane z organizmów w niezmienionej postaci, gdyż nie są przez nie metabolizowane.

Najbardziej widocznym skutkiem obecności antybiotyków w środowisku jest rozwój oporności szczepów bakteryjnych [2]. Antybiotyki, które do tej pory ratowały życie, stają się nieskuteczne w walce z zakażeniami. Względnie mało chorobotwórcze drobnoustroje, tzw. oportunistyczne, dzięki zdobytym mechanizmom oporności stały się poważnym czynnikiem zagrażającym zdrowiu i życiu, np. enterokoki odporne na wankomycyny. Cechą wielu współczesnych patogenów bakteryjnych jest wielooporność, tzn. brak wrażliwości na co najmniej 3 różne grupy terapeutyczne. Przykładem mogą być szczepy *Streptococcus*

<sup>1</sup> Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, email: pulp@interia.pl

<sup>2</sup> Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN, ul. M. Skłodowskiej-Curie 34, 41-819 Zabrze

*pneumoniae*, najczęstszego czynnika etiologicznego zapalenia płuc, wśród których obserwuje się oporność na penicyliny, makrolidy i fluorochinolony.

Spośród wielu metod oczyszczania ścieków, wód gruntowych i powierzchniowych z trudno biodegradowalnych zanieczyszczeń organicznych, zaawansowane metody utleniania (AOP - *Advanced Oxidation Process*) są najbardziej perspektywiczne [3]. Procesy te opierają się na generowaniu rodników hydroksylowych ( $\cdot\text{OH}$ ), które mogą inicjować reakcje utleniania związków organicznych.

### Cel pracy

Celem przedstawionej pracy jest zbadanie kinetyki procesu fotokatalitycznego rozpadu doksycykliny i wpływu na ten proces jonów  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{HPO}_4^{2-}$  oraz pH roztworu wodnego antybiotyku.

### Część doświadczalna

Naświetlano roztwory wodne doksycykliny ( $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl} \cdot 0,5\text{H}_2\text{O} \cdot 0,5\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  cz.d.a. Sigma-Aldrich), doksycykliny z zawiesiną  $\text{TiO}_2$  (P 25 firmy Degussa, rozmiar cząstek 21 nm, powierzchnia właściwa  $50 \text{ m}^2/\text{g}$ ) oraz roztwory antybiotyków z jonami metali w obecności fotokatalizatora. Do przygotowania roztworów antybiotyku z jonami metali o odpowiednim stosunku molowym używano roztworów chlorków metali cz.d.a. Do przygotowania roztworów z jonami fosforanowymi używano wodorofosforanu(V) amonu cz.d.a. POCh. Badane w pracy roztwory doksycykliny z jonami metali i jonami fosforanowymi opisano w tabeli 1. Proces prowadzono w krystalizatorach z ciągłym mieszaniem i dostępem powietrza atmosferycznego. Stosowano 4 lampy Philips TL-40 W/05 o natężeniu promieniowania  $2,9 \text{ mW cm}^{-2}$  i maksimum emisji przy długości fali  $\lambda = 366 \text{ nm}$ . W naświetlanych roztworach po odwirowaniu badano zmiany stężenia doksycykliny metodą HPLC (Merck Hitachi, detektor UV-VIS o długości fali  $\lambda = 268 \text{ nm}$ ; kolumna BDS Hypersil C18 o uziarnieniu  $5 \mu\text{m}$  i długości 150 mm i średnicy 2,1 mm).

Roztwory doksycykliny ( $0,1 \text{ mmol/dm}^3$ ) z jonami metali i jonami fosforanowymi

Tabela 1

Solutions of doxycycline ( $0.1 \text{ mmol/dm}^3$ ) with metal and phosphate ions

Table 1

Jony	Stosunek molowy antybiotyk : jony metalu
$\text{Fe}^{3+}$	1; 3; 5; 10
$\text{Cu}^{2+}$	1; 5
$\text{Ca}^{2+}$	5; 10
$\text{Mg}^{2+}$	5; 10
$\text{Fe}^{2+}$	10
$\text{Co}^{2+}$	10
$\text{HPO}_4^{2-}$	1; 5

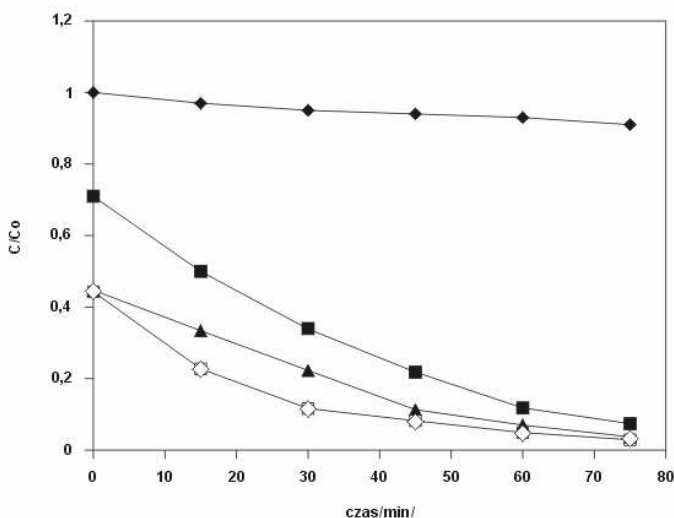
Jako fazę ruchomą stosowano roztwór buforu mrówczanowego i acetonitrylu o stosunku objętościowym 1:1. Następnie wyznaczano zależność  $\log C/C_0$  od czasu trwania procesu fotokatalitycznego i obliczano stałe szybkości fotokatalitycznej degradacji doksycykliny. Oceniając wpływ pH na stałe szybkości degradacji antybiotyku, naświetlano



jego roztwory o pH ustalonym odpowiednio poprzez dodatek  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  HCl lub  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  NaOH. Oznaczenia zawartości węgla organicznego (TOC) wykonywano przy użyciu analizatora Shimadzu 5000A.

### Wyniki i ich omówienie

Zależność stosunku stężeń  $C/C_0$  od czasu trwania procesu fotolitycznego dla roztworu doksyicyliny i procesu fotokatalitycznego dla roztworu tego antybiotyku i jego roztworów z jonami żelaza o różnym stosunku molowym antybiotyk : metal zamieszczono na rysunkach 1-6.



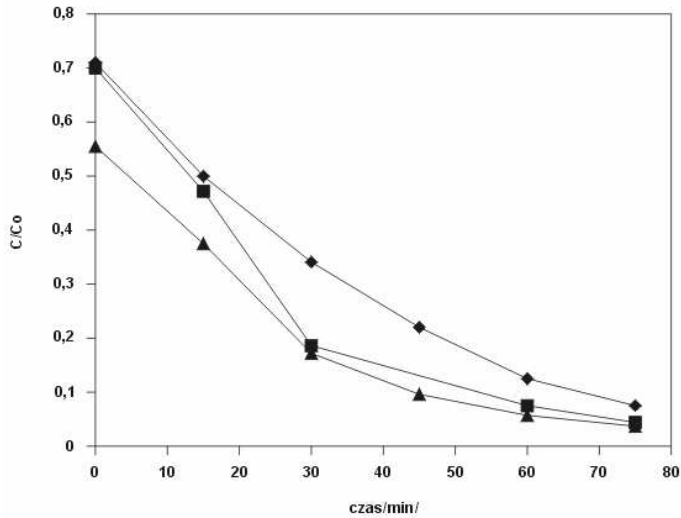
Rys. 1. Zależność  $C/C_0$  dla doksyicyliny: ◆ bez  $\text{TiO}_2$ , ■ z  $\text{TiO}_2$ , ▲  $\text{Fe}^{3+}$ : doksyicylina = 1:1, □  $\text{Fe}^{3+}$ : doksyicylina = 3:1, ◇  $\text{Fe}^{3+}$ : doksyicylina = 5:1 od czasu fotokatalitycznej degradacji

Fig. 1. Relationship of  $C/C_0$  for doxycycline: ◆ without  $\text{TiO}_2$ , ■ with  $\text{TiO}_2$ , ▲  $\text{Fe}^{3+}$ : doxycycline = 1:1, □  $\text{Fe}^{3+}$ : doxycycline = 3:1, ◇  $\text{Fe}^{3+}$ : doxycycline = 5:1 vs photocatalytic degradation time

Z przebiegu zależności na rysunku 1 i danych w tabeli 2 wynika, że proces fotolitycznego rozkładu doksyicyliny (naświetlanie roztworu tego związku promieniowaniem UV bez obecności fotokatalizatora) przebiega z dużo mniejszą szybkością niż proces fotokatalityczny. Obecność jonów żelaza w roztworze powoduje zmniejszenie wyjściowego stężenia antybiotyku, niezależnie od stosunku metal : antybiotyk, i niewielkie zmiany w szybkości fotokatalitycznego rozkładu antybiotyku, uwidocznione w tabeli 2. Obniżenie wyjściowego stężenia antybiotyku wynika z powstawania rozpuszczalnych kompleksów doksyicyliny z jonami żelaza, które są oznaczane jako oddzielny pik metodą HPLC lub z silnej adsorpcji tego kompleksu na powierzchni fotokatalizatora.

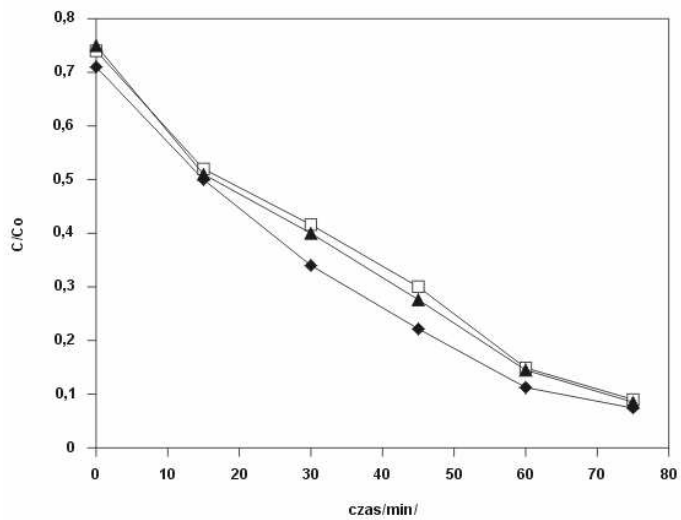
Jony żelaza  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Co}^{2+}$  powodują przyśpieszenie fotokatalitycznej degradacji antybiotyku, co przedstawiono w tabeli 2. Jony  $\text{Ca}^{2+}$  powodują nieznaczne obniżenie

szybkości fotokatalitycznej degradacji doksycykliny (tab. 2); znaczące, chociaż niewielkie obniżenie szybkości następuje w przedziale 15÷60 minut.



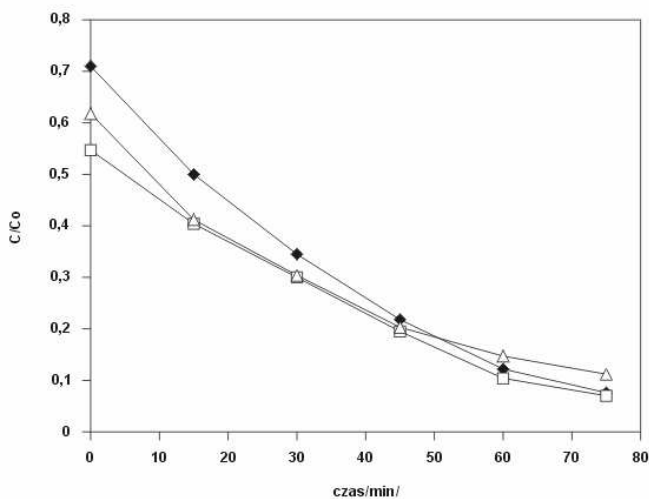
Rys. 2. Zależność  $C/C_0$  dla doksycykliny :  $\blacklozenge$  z  $\text{TiO}_2$ ,  $\blacksquare$   $\text{Co}^{2+}$  : doksycykliny = 10:1,  $\blacktriangle$   $\text{Fe}^{2+}$  : doksycykliny = 10:1 od czasu fotokatalitycznej degradacji

Fig. 2. Relationship  $C/C_0$  for doxycycline :  $\blacklozenge$  with  $\text{TiO}_2$ ,  $\blacksquare$   $\text{Co}^{2+}$  : doxycycline = 10:1,  $\blacktriangle$   $\text{Fe}^{2+}$  : doxycycline = 10:1 vs photocatalytic degradation time



Rys. 3. Zależność  $C/C_0$  dla doksycykliny:  $\blacklozenge$  z  $\text{TiO}_2$ ,  $\square$   $\text{Ca}^{2+}$  : doksycykliny = 5:1,  $\blacktriangle$   $\text{Ca}^{2+}$  : doksycykliny = 10 : 1 od czasu fotokatalitycznej degradacji

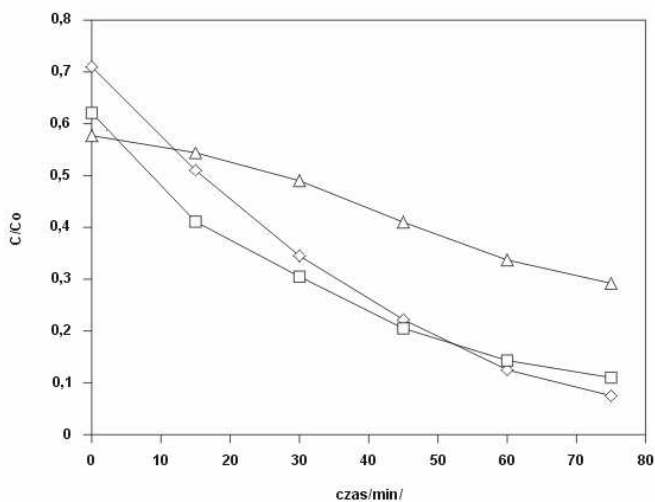
Fig. 3. Relationship  $C/C_0$  for doxycycline:  $\blacklozenge$  with  $\text{TiO}_2$ ,  $\square$   $\text{Ca}^{2+}$  : doxycycline = 5:1,  $\blacktriangle$   $\text{Ca}^{2+}$  : doxycycline = 10 : 1 vs photocatalytic degradation time



Rys. 4. Zależność  $C/C_0$  dla doksycykliny:  $\blacklozenge$  z  $\text{TiO}_2$ ,  $\square$   $\text{Mg}^{2+}$  : doksycyklina = 5:1,  $\triangle$   $\text{Mg}^{2+}$  : doksycyklina = 10 : 1 od czasu fotokatalitycznej degradacji

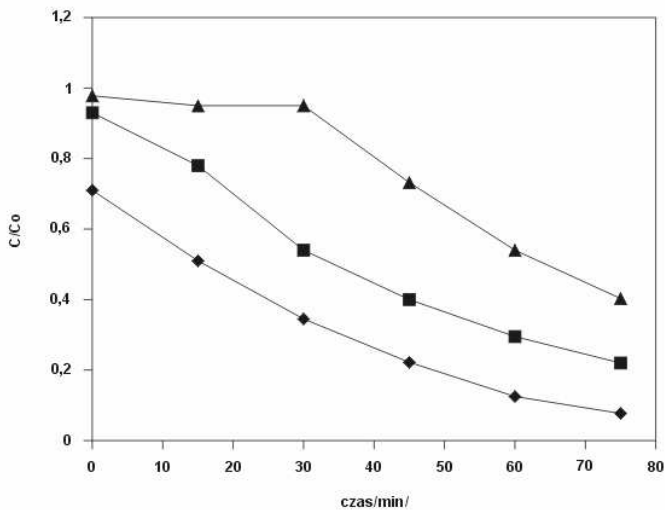
Rys. 4. Relationship  $C/C_0$  for doxycycline:  $\blacklozenge$  with  $\text{TiO}_2$ ,  $\square$   $\text{Mg}^{2+}$  : doxycycline = 5:1,  $\triangle$   $\text{Mg}^{2+}$  : doxycycline = 10 : 1 vs photocatalytic degradation time

Niewielkie obniżenie szybkości fotokatalitycznego rozkładu doksycykliny występuje również podczas naświetlania roztworów tego antybiotyku z jonami magnezu, co przedstawiono w tabeli 2.



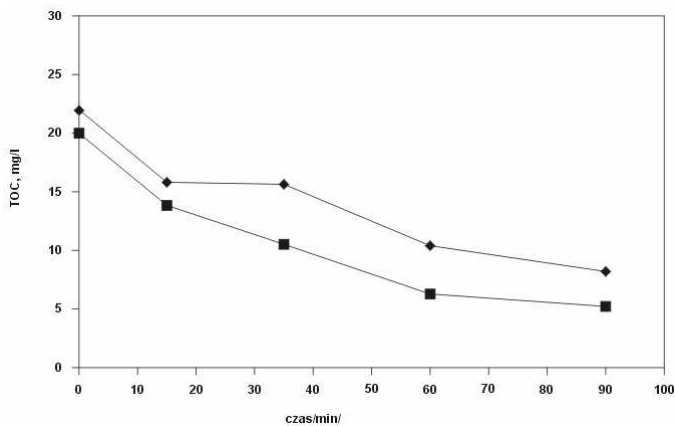
Rys. 5. Zależność  $C/C_0$  dla doksycykliny:  $\diamond$  z  $\text{TiO}_2$ ,  $\square$   $\text{Cu}^{2+}$  : doksycyklina = 1:1,  $\triangle$   $\text{Cu}^{2+}$  : doxycycline = 5:1 od czasu fotokatalitycznej degradacji

Fig. 5. Relationship  $C/C_0$  for doxycycline:  $\diamond$  with  $\text{TiO}_2$ ,  $\square$   $\text{Cu}^{2+}$  : doxycycline = 1:1,  $\triangle$   $\text{Cu}^{2+}$  : doxycycline = 5 : 1 vs photocatalytic degradation time



Rys. 6. Zależność  $C/C_0$  dla doxycykliny:  $\blacklozenge$  z  $\text{TiO}_2$ ,  $\blacksquare$   $\text{HPO}_4^{2-}$  : doxycyklina = 1:1,  $\blacktriangle$   $\text{HPO}_4^{2-}$  : doxycyklina = 5:1 od czasu fotokatalitycznej degradacji

Fig. 6. Relationship  $C/C_0$  for doxycycline  $\blacklozenge$  z  $\text{TiO}_2$ ,  $\blacksquare$   $\text{HPO}_4^{2-}$  : doxycycline = 1:1,  $\blacktriangle$   $\text{HPO}_4^{2-}$  : doxycycline = 5:1 vs photocatalytic degradation time



Rys. 7. Zależność TOC dla doxycykliny:  $\blacklozenge$  z  $\text{TiO}_2$ ,  $\blacksquare$   $\text{Fe}^{3+}$  : doxycyklina = 3:1 od czasu fotokatalitycznej degradacji

Fig. 7. Relationship TOC for doxycycline  $\blacklozenge$  z  $\text{TiO}_2$ ,  $\blacksquare$   $\text{Fe}^{3+}$  : doxycycline = 3:1 vs photocatalytic degradation time

Znaczne zmniejszenie szybkości fotokatalitycznej degradacji doxycykliny następuje podczas naświetlania roztworów z jonami  $\text{Cu}^{2+}$ , zwłaszcza w roztworze o stosunku molowym antybiotyk : jony  $\text{Cu}^{2+}$  równym 1 : 5 (tab. 2). Podczas procesu następuje redukcja jonów miedzi na powierzchni fotokatalizatora i zmniejszenie szybkości degradacji antybiotyku [6].

Tabela 2

Stałe szybkości rozkładu fotokatalitycznego doksycykliny

Table 2

Rate constants of doxycycline photocatalytic degradation

Jony metalu	Stosunek molowy doksycykliny : jony metalu	Stała szybkości [s <sup>-1</sup> ]	Czas połowicznego rozkładu [s]
-----	-----	5,028·10 <sup>-4</sup>	1378,28
Fe <sup>3+</sup>	1	5,681·10 <sup>-4</sup>	1219,86
”	3	5,873·10 <sup>-4</sup>	1179,98
”	5	5,834·10 <sup>-4</sup>	1187,86
”	10	5,489·10 <sup>-4</sup>	1262,53
Cu <sup>2+</sup>	1	3,838·10 <sup>-4</sup>	1805,63
”	5	1,612·10 <sup>-4</sup>	4299,01
Ca <sup>2+</sup>	5	4,721·10 <sup>-4</sup>	1467,91
”	10	4,798·10 <sup>-4</sup>	1444,35
Mg <sup>2+</sup>	5	4,107·10 <sup>-4</sup>	1687,36
”	10	4,683·10 <sup>-4</sup>	1479,82
Fe <sup>2+</sup>	10	6,184·10 <sup>-4</sup>	1121,36
Co <sup>2+</sup>	10	6,295·10 <sup>-4</sup>	1100,87
Jony fosforanowe	Stosunek molowy doksycykliny : jony fosforanowe	Stała szybkości [s <sup>-1</sup> ]	Czas połowicznego rozkładu [s]
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1	3,301·10 <sup>-4</sup>	2099,36
”	5	2,034·10 <sup>-4</sup>	3407,08
Proces fotolityczny (naświetlanie bez TiO <sub>2</sub> )			
Stała szybkości [s <sup>-1</sup> ]		Czas połowicznego rozkładu [s]	
5,757·10 <sup>-3</sup>		12037,52	

Jony HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> powodują spadek adsorpcji doksycykliny na powierzchni fotokatalizatora i spadek szybkości jej degradacji; szczególnie duży w przypadku roztworu o stosunku molowym antybiotyk : jony HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> równym 1:5. Ogólnie rzecz biorąc jony oddziałują na szybkość fotokatalitycznego rozkładu doksycykliny w sposób specyficzny, co uwidocznione zostało w tabeli 2. Jony metali zmieniają również szybkość procesu mineralizacji, co widać na rysunku 7, gdzie przedstawiono przebieg zmian TOC w roztworze antybiotyku i jego roztworze o stosunku molowym antybiotyk : jony Fe<sup>3+</sup> równym 3. Jony żelaza przyspieszają mineralizację doksycykliny i jej produktów przejściowych w trakcie procesu fotokatalitycznego.

Tabela 3

Stałe szybkości rozkładu fotokatalitycznego doksycykliny w zależności od pH roztworu

Table 3

Rate constants of doxycycline photocatalytic degradation, calculated for different pH values

pH	Stała szybkości [s <sup>-1</sup> ]	Czas połowicznego rozpadu [s]
2,57	5,642·10 <sup>-4</sup>	1228,29
3,65	5,028·10 <sup>-4</sup>	3541,13
6,8	6,448·10 <sup>-4</sup>	1074,75
9,27	4,069·10 <sup>-4</sup>	1703,12
12,34	2,418·10 <sup>-4</sup>	2866,00

Wpływ pH środowiska reakcji na szybkość fotokatalitycznej degradacji antybiotyku przedstawiono w tabeli 3. Nie znaleziono statystycznie istotnej korelacji pomiędzy tym parametrem a stałymi szybkości fotokatalitycznego rozkładu doxycykliny.

### Podsumowanie

Stwierdzono, że na proces fotokatalitycznej degradacji doxycykliny wpływają badane jony metali i jony fosforanowe. Jony żelaza i kobaltu przyspieszają rozpad doxycykliny, pozostałe jony metali opóźniają ten proces. Nie znaleziono korelacji pomiędzy pH roztworu a stałymi szybkości rozpadu antybiotyku.

### Literatura

- [1] Kummerer K.: *Chemosphere*, 2001, **45**, 957-969.
- [2] Hirsch R., Ternes T., Haberer K. i Kratz L.: *Sci. Total Environ.*, 1999, **118**, 109-118.
- [3] Kaniou S., Pitarakis K., Barlagianni I. i Poullos I.: *Chemosphere*, 2005, **60**, 372-380.
- [4] Bautitz I. i Nogueira T.: *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 2007, **187**, 33-39.
- [5] Kummerer K.: *Pharmaceuticals in the Environment - Sources, Fate, Effects and Risks*. Springer Verlag 2001.
- [6] Brezova V., Blazkova A., Borosova E., Ceppan M. i Fiala R.: *J. Mol. Catal. A: Chemical*, 1995, **98**, 109-116.

## PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF DOXYCYCLINE IN WATER SOLUTIONS

**Abstract:** Drugs and their metabolites are among substances which micro-pollute surface waters, sewage and soil. Antibiotics are the most hazardous, as they are hardly biodegradable and trigger the formation of drug resistance of numerous bacteria strains. The advanced oxidation processes (OP) are widely accepted techniques for removing resistant and hardly biodegradable organic pollutants from sewage, as well as ground and surface waters. They involve generating hydroxylic radicals ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) with high oxidation potential, which are able to mineralize organic compounds. This work aims at testing the photocatalytic degradation of doxycycline and the influence of metal ions  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and phosphate ions on this process, as well as at determining the optimum pH range for this process. The solutions were irradiated with UV  $\lambda = 366$  nm in the presence of P 25 Degussa photocatalyst. The content of doxycycline and its transient products during photocatalytic degradation was tested using the HPLC method. To estimate the photocatalytic degradation rate constants of doxycycline, the relationship  $\log C/C_0$  from time of duration of photocatalytic process were determined. The iron and cobalt ions accelerate the process of photocatalytic doxycycline breakdown, while the copper, calcium, magnesium and phosphate ions slow down this process. The process of doxycycline adsorption takes place in the presence of metal ions, particularly iron. The fastest mineralization of organic substances takes place in the presence of iron ions. The copper ions are reduced during the process and copper forms a deposit on the photocatalyst. The optimum pH of the solution during the photocatalytic process is 6.8. However, no correlation was found between the constants of doxycycline breakdown rate and and pH of the solution.

**Keywords:** doxycycline, photocatalytic degradation, photocatalytic process

Joanna MATUSKA<sup>1</sup>

**INWAZYJNOŚĆ I REPRODUKCJA  
NICIENI ENTOMOPATOGENNYCH *Heterorhabditis megidis*  
(POINAR, JACKSON I KLEIN 1987)  
PO KONTAKCIE Z JONAMI OŁOWIU(II)**

**INVASIVENESS AND REPRODUCTION  
OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Heterorhabditis megidis*  
(POINAR, JACKSON AND KLEIN 1987)  
AFTER ITS CONTACT WITH LEAD(II) IONS**

**Abstrakt:** Wykorzystanie nicieni owadobójczych jako biologicznego środka w zwalczaniu szkodników roślin spowodowało zwrócenie uwagi na związek między skażeniem gleb metalami ciężkimi a przeżywalnością nicieni w glebach. Toksyczne właściwości metali ciężkich, w tym ołowiu, zaburzają funkcje życiowe nicieni entomopatogennych. W przeprowadzonych testach zbadano wpływ krótkotrwałego i długotrwałego oddziaływania jonów ołowiu na inwazyjność i reprodukcję *H. megidis*. Larwy, które przeżyły kontakt z jonami ołowiu w stężeniu 500 ppm, wprowadzano do pojemników z glebą, w których znajdowały się owady testowe (*Galleria mellonella*). Kontrolę stanowiły nicienie przetrzymywane w wodzie destylowanej. Połowę martwych owadów poddawano sekcji w dwa dni od ich śmierci w celu zbadania intensywności inwazji. Drugą połowę przeznaczano na reprodukcję. Otrzymane z reprodukcji larwy nicieni wykorzystywano do kolejnych doświadczeń. Wykonano 5 pasaży. Zaobserwowano, że w miarę wydłużania czasu kontaktu nicieni z jonami ołowiu(II) obniża się inwazyjność nicieni oraz liczba migrujących z owada larw *H. megidis*.

**Słowa kluczowe:** nicienie entomopatogenne, *Heterorhabditis megidis*, *Galleria mellonella*, jony ołowiu

Nicienie owadobójcze narażone są na wpływ wielu czynników biotycznych i abiotycznych zarówno naturalnych, jak i wynikających z działalności człowieka. Czynniki te mogą działać na nicienie szkodliwie lub korzystnie. Jednym z takich czynników są metale ciężkie. W dotychczasowych badaniach stwierdzono, że jony metali ciężkich mogą w znacznym stopniu niekorzystnie wpłynąć na patogenność nicieni owadobójczych [1-9].

Przeprowadzone badania miały na celu ocenę wpływu:

- czasu kontaktu nicieni z jonami ołowiu(II) oraz
- długotrwałego pasażowania przez jednego żywiciela nicieni po przebytych kontaktach z jonami ołowiu(II) na inwazyjność i reprodukcję *H. megidis*.

### **Materiał i metody**

Materiał badań stanowiły larwy inwazyjne (IJs) *H. megidis* oraz larwy ostatniego stadium *G. mellonella* L. (163 mg). Zarówno nicienie entomopatogenne, jak i owady pochodziły z hodowli własnej Zakładu Zoologii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Larwy inwazyjne nicieni przetrzymywano przez 24 godz. (próbka B) i 5 dni (próbka C) w szalkach Petriego w roztworach wodnych azotanu ołowiu w stężeniu 500 ppm Pb(II). Larwami, które przeżyły kontakt z jonami ołowiu, zarażano owady testowe. Kontrolę

<sup>1</sup>Zakład Zoologii, Katedra Biologii Środowiska Zwierząt, Wydział Nauk o Zwierzętach, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, email: joannasggw@op.pl

(próbka A) stanowiły nicienie przetrzymywane w wodzie destylowanej. Owady zarażano indywidualnie: w jednym pojemniku z wilgotnym piaskiem umieszczano 1 owada i 500 larw inwazyjnych. Połowę martwych owadów poddawano sekcji w dwa dni od ich śmierci w celu zbadania intensywności inwazji. Drugą połowę martwych owadów przekładano na indywidualne gąbki migracyjne (zmodyfikowane pułapki do gromadzenia migrujących z ciał owadów larw inwazyjnych nicieni). Stopień migracji larw nicieni z ciała żywiciela do środowiska zewnętrznego badano codziennie aż do zakończenia migracji. Pozyskanymi larwami zarażano kolejne owady testowe w celu sprawdzenia wpływu długotrwałego pasażowania przez jednego żywiciela nicieni po przebyciu kontaktu z jonami ołowiu(II). Wykonano 5 pasaży. Określono: śmiertelność larw inwazyjnych nicieni po jedno- i pięciodniowym kontakcie z jonami ołowiu, śmiertelność owadów testowych poddanych kontaktowi z nicieniami traktowanymi jonami ołowiu, ekstensywność inwazji i intensywność inwazji oraz liczbę migrujących z owada nicieni.

Doświadczenie prowadzono w temperaturze 25°C. Jest to optymalna temperatura dla *H. megidis*, przy której obserwuje się największą inwazyjność tego gatunku [10-13].

Do porównania wyników wykorzystano analizę wariancji jednej zmiennej (UNIANOVA).

### Wyniki, ich omówienie i analiza

Przeżywalność larw nicieni po jedno- (próbka B) i pięciodniowym (próbka C) kontakcie z jonami ołowiu zależała od obecności jonów w środowisku, w którym przebywały larwy oraz od czasu kontaktu z tymi jonami. Im dłuższy był czas kontaktu nicieni z jonami ołowiu, tym śmiertelność larw była większa (tab. 1).

Inwazyjność nicieni po różnym czasie kontaktu z jonami ołowiu(II) Tabela 1

Invasiveness of nematodes after different time of their contact with lead(II) ions Table 1

	próbka A	próbka B	próbka C
Żywe larwy nicieni [%]	96	82	68
Żywe/martwe	24	4,5	2,1
Śmiertelność owadów [%]	98,5	91	70,5
Ekstensywność [%]	96,6	89,2	68
Intensywność [szt.]	67	50	32
Migracja larw z 1 mg masy ciała owada [szt.]	864	288	146

Śmiertelność owadów w kolejnych pasażach [%] Tabela 2

Insect mortality in consecutive passages [%] Table 2

	próbka A	próbka B	próbka C
pasaż 1	99	93	72
pasaż 2	100	89	71
pasaż 3	97	94	74
pasaż 4	98	90	69
pasaż 5	99	91	68
średnia z pasaży	98,5	91	70,5



Analizując śmiertelność owadów, ekstensywność i intensywność inwazji, nie zanotowano wyraźnych różnic w kolejnych pasażach w obrębie każdej z próbek. Dlatego do porównania wykorzystano średnią z pięciu pasaży, odpowiednio dla każdej z próbek (tabele 2-4).

Ekstensywność inwazji w kolejnych pasażach [%]

Tabela 3

Extensivity of invasion in consecutive passages [%]

Table 3

	próbka A	próbka B	próbka C
pasaż 1	98	92	69
pasaż 2	99	87	66
pasaż 3	95	88	67
pasaż 4	96	89	68
pasaż 5	95	90	70
średnia z pasaży	96,6	89,2	68

Intensywność inwazji w kolejnych pasażach [szt.]

Tabela 4

Intensity of invasion in consecutive passages [ind.]

Table 4

	próbka A	próbka B	próbka C
pasaż 1	68	49	33
pasaż 2	67	52	31
pasaż 3	67	48	34
pasaż 4	68	51	31
pasaż 5	66	50	32
średnia z pasaży	67,2	50	32,2

Przeprowadzona jednoczynnikowa analiza wariancji oraz test NIR dla intensywności inwazji badanych próbek (nicienie, których poprzednie pokolenie larw miało różny czas kontaktu z jonami ołowiu) wykazała duże statystycznie istotne różnice między wszystkimi próbkami (A, B, C) (tab. 5).

Analiza wariancji dla cechy „intensywność inwazji”

Tabela 5

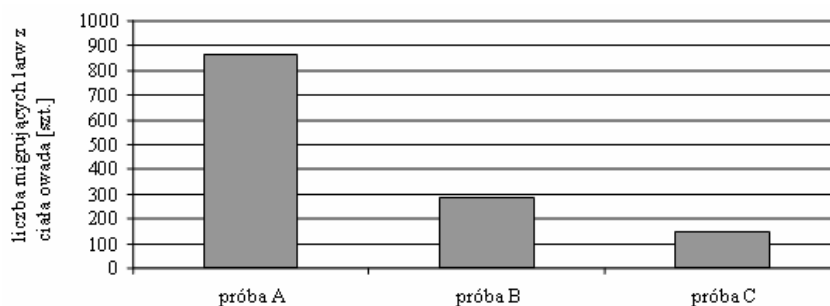
Results of ANOVA for the factor „intensity of invasion”

Table 5

Intensywność inwazji	Jednoczynnikowa ANOVA				
	Suma kwadratów	Liczba stopni swobody	Średni kwadrat	F	Istotność
Między grupami	45942,000	2	22971,000	1812,211	0,000
Wewnątrz grup	2814,000	222	12,676		
Ogółem	48756,000	224			

Zaobserwowano, że na inwazyjność nicieni niekorzystnie wpływa zarówno kontakt, jak i czas kontaktu z jonami ołowiu. Wraz z wydłużaniem czasu kontaktu larw *H. megidis* z jonami ołowiu(II) ulegała obniżeniu inwazyjność nicieni.

Brak statystycznie istotnych różnic w kolejnych pasażach w obrębie każdej próbki zanotowano także w przypadku liczby migrujących larw z owada. Wykazano, że na ten parametr również wpływają te dwa czynniki (kontakt z jonami ołowiu i czas kontaktu) (tab. 1, rys. 1).



Rys. 1. Migracja larw nicieni z 1 mg masy ciała owada [szt.]

Fig. 1. Migration of nematode larvae from 1 mg of insect's body mass [ind.]

Zauważono również, że osobniki, które jako larwy miały dłuższy (5 dni) kontakt z jonami ołowiu (próbka C), rozpoczęły migrację w 21 dniu od zarażenia w odróżnieniu od osobników, które jako larwy miały krótszy (24 h) kontakt z jonami ołowiu (próbka B) oraz nicienie z grupy kontrolnej (próbka A), które rozpoczęły migrację w 15 dniu od zarażenia owadów.

Otrzymane wyniki mogą świadczyć o tym, iż na inwazyjność i reprodukcję *H. megidis* wpływ ma nie tylko kontakt poprzedniego pokolenia larw z jonami ołowiu, ale również czas tego kontaktu.

Przeprowadzone analizy i ich wyniki znajdują odzwierciedlenie w literaturze. Prace opisujące badania nad wpływem metali ciężkich na nicienie owadobójcze wskazują głównie na niekorzystny wpływ jonów ołowiu(II) na przeżywalność i aktywność biologiczną tych zwierząt [3, 4, 14]. Udokumentowany również został negatywny wpływ metali ciężkich na reprodukcję nicieni oraz na ich zdolność do migracji z owada do środowiska zewnętrznego [2, 15].

## Podsumowanie

Jony ołowiu(II) znajdujące się w środowisku glebowym, w którym występują nicienie owadobójcze, niekorzystnie oddziałują na inwazyjność i reprodukcję tych zwierząt. W miarę wzrostu stężenia jonów ołowiu(II) oraz wydłużania czasu kontaktu z tymi jonami obniża się inwazyjność i liczba migrujących larw nicieni z ciała owada.

## Literatura

- [1] Jarmuł J.: Praca doktorska. SGGW, Warszawa 2002, 130 ss.
- [2] Jarmuł J. i Kamionek M.: Chem. Inż. Ekol., 2003, **10**(3-4), 281-284.
- [3] Jarmuł J. i Kamionek M.: Chem. Inż. Ekol., 2001, **8**(6), 601-607.
- [4] Jarmuł J. i Kamionek M.: Chem. Inż. Ekol., 2000, **7**(10), 1023-1029.
- [5] Jaworska M., Gorczyca A., Sepioł J. i Tomasik P.: Chem. Inż. Ekol., 2000, **7**(4), 313-326.
- [6] Jaworska M., Ropek D. i Gorczyca A.: Chem. Inż. Ekol., 1999, **6**(5-6), 469-475.

- [7] Jaworska M., Gorczyca A., Sepioł J. i Tomasiak P.: Water, Air, Soil Pollut., 1997, **93**(1-4), 157-166.
- [8] Pezowicz E.: Obieg pierwiastków w przyrodzie. Tom II. IOR, Warszawa 2003, 486-489.
- [9] Pezowicz E., Kamionek M. i Bednarek A.: Mat. II Konferencji Naukowej. Akad. Roln., Kraków 1997, 67-71.
- [10] Menti H., Wright D.J. i Perry R.N.: Nematology, 2000, **2**(5), 515-521.
- [11] Mason J.M. i Hominick W.M.: J. Helminth., 1995, **69**(4), 337-345.
- [12] Danilov L.G., Vasil'eva S.O. i Gogoler A.N.: Parazitologiya, 1994, **28**(6), 495-500.
- [13] Trdan S., Valič N., Urek G. i Milevoj L.: Acta Agricult. Sloven., 2005, **85**, 117-124.
- [14] Jarmuž J., Pezowicz E. i Kamionek M.: Chem. Inż. Ekol., 2005, **12**(10), 1083-1088.
- [15] Pezowicz E.: Chem. Inż. Ekol., 2004, **11**(2-3), 239-243.

**INVASIVENESS AND REPRODUCTION  
OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Heterorhabditis megidis*  
(POINAR, JACKSON AND KLEIN 1987)  
AFTER ITS CONTACT WITH LEAD(II) IONS**

**Abstract:** The use of entomopathogenic nematodes as biological means of plant pests control focussed the attention on the relationship between soil pollution by heavy metal and nematode survival. Toxic properties of heavy metals like lead disturb life functions of entomopathogenic nematodes. Short and long term effect of lead ions on the invasiveness and reproduction of *H. megidis* was studied in laboratory tests. Larvae that survived the contact with lead ions at a concentration of 500 ppm were placed in containers filled with soil with test insects. Nematodes kept in distilled water served as a control. Half of dead insects were dissected two days after their death to check the intensity of invasion. Second half of dead insects were intended for nematode reproduction. Nematode larvae obtained in that way were used for subsequent experiments. Five passages were made in total. Prolonged contact of nematodes with lead(II) ions was observed to decrease nematode invasiveness and the number of *H. megidis* larvae migrating from the host insect.

**Keywords:** entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis megidis*, *Galleria mellonella*, lead ions



Krystian T. OBOLEWSKI<sup>1</sup>, Elżbieta SKORBIŁOWICZ<sup>2</sup> i Mirosław SKORBIŁOWICZ<sup>2</sup>

## WPŁYW SKŁADU CHEMICZNEGO OSOKI ALOESOWATEJ *Stratiotes aloides* L. NA STRUKTURĘ ZASIEDLAJĄCEJ JĄ MAKROFAUNY

### INFLUENCE OF WATER SOLDIER *Stratiotes aloides* L. ON THE STRUCTURE OF INHABITING MACROFAUNA

**Abstrakt:** Badania prowadzono w sezonach wiosennym i letnim 2007 roku dla Jeziora Smołdzińskiego (odcięta zatoka jeziora Gardno) oraz otaczających go kanałach melioracyjnych. Określono strukturę fauny epifitycznej zasiedlającej osokę aloesowatą *Stratiotes aloides* L. oraz skład pierwiastkowy (Cd, Pb, Zn, Cr, Ni, Cu, Ca i Mg) tego makrofitu. Dzięki wykorzystaniu metody ordynacyjnej pCCA podjęto próbę określenia wpływu chemicznego podłoża roślinnego na zasiedlających je przedstawicieli makrofauny. Łącznie znaleziono 27 taksonów fauny epifitycznej, wśród której dominowały przedstawiciele ślimaków. Największy wpływ na epifaunę naroślinną mają ołów i miedź, redukując głównie występowanie przedstawicieli mięczaków. Również akumulacja w liściach tego makrofitu innych metali ciężkich wpływa niekorzystnie na żyjących na jej powierzchni przedstawicieli makrofauny, natomiast stężenia wapnia i magnezu wpływają bardzo korzystnie na przedstawicieli chrząszczy, chruszcików oraz mięczaków. Sam wpływ sezonowości na chemiczne oddziaływanie osoki na zasiedlającą ją zwierzęta nie został potwierdzony.

**Słowa kluczowe:** fauna naroślinna, pierwiastki, Jezioro Smołdzińskie, kanały melioracyjne

Makrofity zanurzone lub pływające po powierzchni wody stanowią ważny element ekosystemów wodnych. Rośliny wodne pływające po powierzchni bywają pośrednio lub bezpośrednio źródłem pożywienia dla znacznej liczby zwierząt wodnych [1]. Mają duże znaczenie siedliskowe: ograniczają przenikanie energii świetlnej w głąb toni wodnej oraz redukują falowanie wiatrowe i zjawisko resuspensji osadów dennych. Szczególną rolę w tym wypadku może odgrywać osoka aloesowata (*Stratiotes aloides* L.) o dużych zwartych kępach liści, mogących pokryć całe lustro wody i preferując silnie zeutrofizowane, polimiktyczne jeziora [2, 3].

W tkankach tego makrofitu mogą się gromadzić zarówno pierwiastki biogenne, jak i metale [3]. Na ilość zakumulowanych metali w osoce wpływ ma jakość warunków środowiskowych oraz typ ekosystemu wodnego. Równocześnie osoka stanowi łatwo dostępne poziome podłoże dla dużej grupy zwierząt wodnych, ogólnie nazywanych fauną epifityczną [4]. Czynniki potencjalnie wpływającymi na populację tej formacji ekologicznej są światło, temperatura, falowanie, rodzaj podłoża, skład chemiczny wody, a także wyżeranie [5]. Wpływ poszczególnych czynników został zbadany, natomiast wciąż niewiele wiadomo na temat chemicznego oddziaływania osoki na pozostające z nią w kontakcie hydrobionty. *S.aloides* została przebadana pod kątem allelopatycznego oddziaływania na inne rośliny, głównie fitoplankton [6], co potwierdziło jej wpływ na struktury innych formacji ekologicznych. Brak jest jednak do chwili obecnej informacji o oddziaływaniu chemicznym osoki na zasiedlającą ją makrofaunę, dla której stanowi ona

<sup>1</sup> Zakład Ekologii Wód, Akademia Pomorska, ul. adm. K. Arciszewskiego 22b, 76-200 Słupsk, email: obolewsk@apsl.edu.pl

<sup>2</sup> Katedra Technologii w Inżynierii i Ochronie Środowiska, Politechnika Białostocka, ul. Wiejska 45E, 15-351 Białystok

odpowiednik dna. Ze względu na dobrze poznany wpływ chemizmu osadów dennych zasiedlanych przez te same gatunki fauny co osokę, wydaje się że takie oddziaływanie jest oczywiste [7]. Szczególnie oddziaływanie metali toksycznych wchodzących w skład wydzielanych substancji może być dowodem na kształtowanie struktur fauny fitofilnej przez podłoża biotyczne [8].

Celem pracy było określenie wpływu zawartości pierwiastków (Cd, Pb, Zn, Cr, Ni, Cu, Ca i Mg) w tkankach liści na zagęszczenie przedstawicieli fauny epifitycznej zasiedlających osokę aloesowatą w Jeziorze Smołdzińskim i otaczających go rowach melioracyjnych.

### **Materiał i metody**

Jezioro Smołdzińskie powstało po odcięciu zatoki od jeziora Gardno na obszarze Słowińskiego Parku Narodowego. Jest bardzo młodym akwenem, częściowo zarośniętym helofitami, wśród których rozwija się grupa *Hydrocharitetum morsus-ranae*, reprezentowana głównie przez *S.aloides* [9]. Duża żyzność wód sprzyja rozwojowi tego hydromakrofitu, a jednocześnie pozwala tworzyć nowe miejsca jego rozwoju w połączonych z tym zbiornikiem eutroficznych kanałach melioracyjnych [10].

Pobieranie próbek pływającej *S.aloides* i zasiedlającej ją fauny epifitycznej prowadzono od kwietnia do lipca w 2007 roku. Materiał pobierano w dwóch powtórzeniach, każde z nich obejmowało 3 próbki, liczące od 12 do 14 kormusów osoki, o masie mokrej roślin wynoszącej ok. 5,0 kg - ogółem zebrano 42 okazy osoki. Badania przeprowadzono zgodnie z ogólnie przyjętą metodyką [5], w trakcie których oznaczono przedstawicieli makrofauny naroślinnej.

Pozbawione fauny liście były wysuszone w 105°C. Po wysuszeniu i homogenizacji próbki poddano mineralizacji „na mokro” w stężonym kwasie azotowym z dodatkiem 30% wody utlenionej w wysokociśnieniowym piecu mikrofalowym. Oznaczenia metali wykonano metodą płomieniowej spektrofotometrii absorpcji atomowej. Wyniki analiz roślin weryfikowano za pomocą certyfikowanego materiału odniesienia: INCT-MPH-2 i INCT-TL-1. Obliczony błąd pomiarowy nie przekraczał 5% wartości certyfikowanej. Zawartość Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn Ca i Mg podano w mg na 1 kg suchej masy (s.m.).

Zależność pomiędzy zmiennymi niezależnymi (skład chemiczny osoki) a zgrupowaniami fauny fitofilnej analizowano za pomocą kanonicznej analizy korespondencji z użyciem analizy krokowej postępującej (pCCA) z wykorzystaniem programu STATISTICA 8.0. Określono również współczynnik korelacji na poziomie  $p = 0,05$ .

### **Wyniki i ich omówienie**

Spośród analizowanych pierwiastków w Jeziorze Smołdzińskim liście osoki zawierały znaczne ilości kadmu i ołowiu, ponadto znaczne ilości niklu, miedzi, wapnia i cynku (tab. 1). W kanałach melioracyjnych ilości badanych pierwiastków w tkankach osoki różniły się w znacznym stopniu.

Fauna fitofilna zasiedlająca liście osoki aloesowatej w badanych ekosystemach wodnych Słowińskiego Parku Narodowego jest utworzona przez 27 taksonów (tab. 1). Wśród zidentyfikowanych taksonów pod względem zagęszczenia dominowały ślimaki *Planorbarius planorbarius* L. ( $D = 27\%$ ), a ze względu na biomasę *Lymnaea stagnalis* L.

(D = 40%), ponieważ oba gatunki znajdują na liściach makrofitów znaczne zasoby pokarmowe w postaci glonów perifitonowych [2, 5].

Średnia zawartość pierwiastków [mg/kg s.m.] w osoce aloesowatej *S.aloides* oraz struktura dominacji zasiedlającej ją epifauny (D%) pod względem zagęszczenia (Z) i biomasy (B) w Jeziorze Smoldzińskim i otaczających je kanałach melioracyjnych

Tabela 1

The average concentration of chemical elements (mg/kg d.m.) in water soldier *S.aloides* and density (Z) and biomass (B) domination structure (D%) of epiphytic fauna it inhabiting the Smoldzinskie Lake and surrounding melioration ditches

Table 1

Pierwiastki	Jezioro Smoldzińskie				Kanał I				Kanał II			
	wiosna		lato		wiosna		lato		wiosna		lato	
Cd	1,25	0,50	0,10	0,75	0,80	1,05						
Pb	9,5	5,0	0,5	7,5	8,0	8						
Zn	40,5	13,5	4,7	29,5	61,5	39,0						
Cr	0,45	2,00	2,15	1,95	0,50	6,50						
Ni	5,3	2,9	0,7	4,6	5,5	4,4						
Cu	3,10	2,55	0,15	2,00	3,45	2,80						
Ca	206,5	181,3	221,0	302,0	153,5	177,5						
Mg	146,0	153,0	198,0	138,0	149,5	153,0						
Taksony	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B	Z	B
1. Oligochaeta	0	0	0	0	0	0	0,5	0,2	1,8	0,1	0	0
2. <i>Erpobdella octoculata</i> (L.)	2,5	2,9	0	0	10	29,5	1,7	3,2	1,8	2,6	12,5	1,6
3. <i>Erpobdella</i> sp.	18,5	7,3	<b>30,3</b>	20,4	2,5	0,8	6,8	1,2	0	0	0	0
4. <i>Glossiphonia heteroclita</i> (L.)	1,2	3,0	5,6	1,9	1,25	1,0	8,7	1,1	1,8	0,3	6,3	1,6
5. <i>Helobdella stagnalis</i> (L.)	0	0	1,4	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0
6. <i>Asellus aquaticus</i> (L.)	1,2	0,1	13,4	2,5	0	0	10,8	0,9	<b>41,8</b>	1,7	25,0	1,4
7. <i>Caenis macrura</i> Stephens	0	0	9,2	1,9	1,25	0,2	11,1	0,6	0	0	0	0
8. <i>Colymbetes</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0,2	0	1,8	0,1	6,3	2,8
9. <i>Limnephilus</i> sp.	0	0	1,4	3,4	8,8	15,0	0,9	1,7	0	0	0	0
10. <i>Ecnomus tenellus</i> Rambur	0	0	0	0	0	0	0,5	0,0	0	0	0	0
11. <i>Nepa cinerae</i> (L.)	0	0	0	0	1,25	0,2	0,7	0,7	0	0	0	0
12. <i>Aeschna grandis</i> (L.)	0	0	0	0	0	0	0,2	2,1	9,1	<b>90,1</b>	6,3	<b>80,5</b>
13. <i>Dytiscus</i> sp.	0	0	0,7	1,1	0	0	0	0	0	0	0	0
14. <i>Notonecta</i> sp.	0	0	0,7	0,2	0	0	0,2	0,5	0	0	3,1	6,0
15. Chironomidae larvae	11,1	0,7	12,7	1,8	<b>37,5</b>	1,8	<b>52,4</b>	2,0	34,5	1,2	<b>37,5</b>	3,1
16. Lepidoptera larvae	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	0,2	0	0
17. <i>Dytiscus</i> sp.	1,2	27,2	0,7	12,9	0	0	0	0	1,8	3,7	3,1	2,8
18. <i>Planorbarius corneus</i> (L.)	1,2	5,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19. <i>P. planorbarius</i> (L.)	<b>27,2</b>	10,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20. <i>Anisus</i> sp.	1,2	0,4	1,4	0,2	8,8	0,8	0,7	0	3,6	0,2	0	0
21. <i>Viviparus viviparus</i> (L.)	0	0	0	0	0	0	0,5	<b>49,9</b>	0	0	0	0
22. <i>Viviparus contectus</i> (Millet)	0	0	0	0	1,3	6,2	0	0	0	0	0	0
23. <i>Lymnaea stagnalis</i> (L.)	23,5	<b>40,3</b>	0	0	3,8	5,2	0,9	29,2	0	0	0	0
24. <i>Lymnaea aureculata</i> (L.)	11,1	1,8	5,6	6,2	0	0	0	0	0	0	0	0
25. <i>Ancylus lacustris</i> (L.)	0	0	0	0	11,3	3,3	0,9	0,2	0	0	0	0
26. <i>Bithynia tentaculata</i> (L.)	0	0	16,9	<b>44,7</b>	11,3	<b>35,3</b>	2,1	6,5	0	0	0	0
27. <i>Sphaerium corneum</i> (L.)	0	0	0	0	1,3	0,8	0	0	0	0	0	0

Zakumulowane w tkankach osoki pierwiastki stają się elementem wydzielanych przez roślinę substancji mających bezpośredni wpływ na warunki życia fauny i flory [6]. Świadczą o tym wartości współczynnika korelacji Spearmana, wskazujące na bardzo znaczną współzależność składu osoki na strukturę fauny naroślinnej. Badane metale ciężkie wpływają negatywnie na ilość fauny, szczególnie wyraźnie jest to widoczne w przypadku ołowiu, którego duże wartości źle znoszą *Colymbetes* sp. ( $r = -0,94$ ), *Viviparus contectus* ( $r = -0,89$ ), *Ancylus lacustris* ( $r = -0,89$ ), *Sphaeriu corneum* ( $r = -0,89$ ) i *Anisus* sp. ( $r = -0,83$ ).

Ołów, mimo że w liściach osoki osiągnął wartości dużo mniejsze niż określone jako toksyczne (30 mg/kg s.m.), to i tak wpływa destrukcyjnie na przedstawicieli fauny naroślinnej [11]. Dostaje się do ciała organizmów przez skórę lub drogi oddechowe, uszkadzając układ nerwowy. Również bioakumulacja miedzi w tkankach osoki powoduje ustąpienie z podłoża *Napa cinera* ( $r = -0,95$ ), *Limnephilus* sp. ( $r = -0,94$ ), *A.lacustris* ( $r = -0,93$ ), *V.contectus* ( $r = -0,91$ ), *S.corneum* ( $r = -0,91$ ). Nikiel wpływał niekorzystnie na chruściki z rodzaju *Limnephilus* oraz przedstawicieli mięczaków: *V.viviparus*, *A.lacustris* i *S.corneum*.

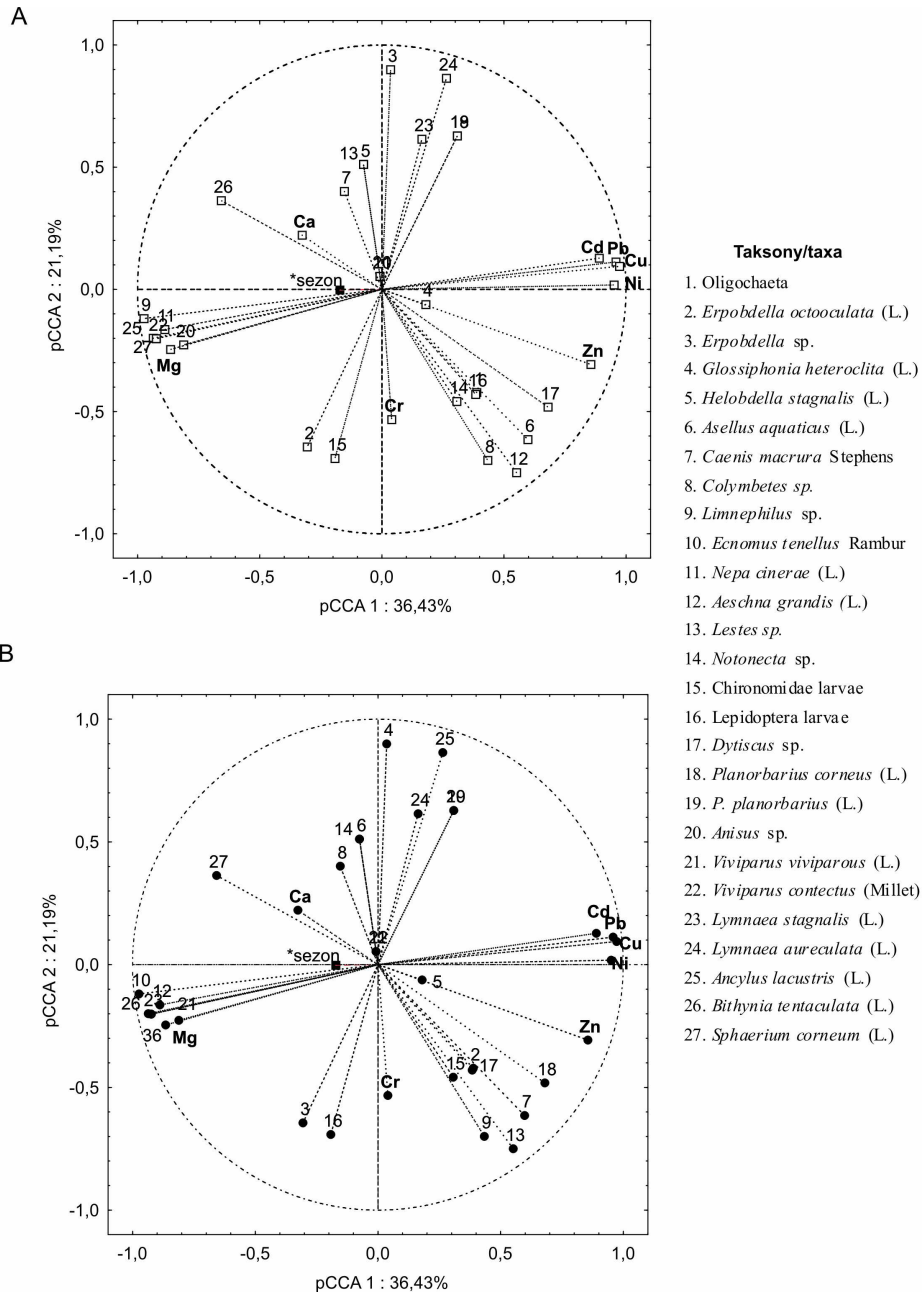
Spośród analizowanych pierwiastków niewielki wpływ na przedstawicieli fauny naroślinnej miały kadm i cynk, gdyż ich znaczna ilość w tkankach osoki nie była tolerowana jedynie przez *Limnephilus* sp. i *Bithynia tentaculata*. Kadm jest pierwiastkiem bardzo toksycznym, kumulującym się w organizmie. U zwierząt wodnych może powodować zanik mięśni, a u mięczaków odwapnienie muszli. Pierwiastek ten narusza przemiany metaboliczne np. wapnia, magnezu, miedzi [12]. Natomiast cynk wydzielany przez osokę może ograniczyć wchłanianie miedzi i żelaza oraz przyspieszyć wydalanie żelaza z organizmu zwierząt ją zasiedlających [8].

Koncentracja metali alkalicznych (Ca i Mg) okazuje się być bardzo korzystna dla przedstawicieli fauny naroślinnej. Znaczna bioakumulacja wapnia wpływa na pojawienie się bezdomkowych chruścików (*Ecnomus tenellus*,  $r = 0,89$ ) oraz dużych ślimaków *V. viviparus* ( $r = 0,89$ ), które wykorzystują go do budowy swoich muszli [5]. Magnez oddziałuje korzystnie na chrząszcze *Colymbetes* sp. ( $r = 0,94$ ) oraz mięczaki *V.contectus* ( $r = 0,96$ ), *S.corneum* ( $r = 0,96$ ), *A.lacustris* ( $r = 0,94$ ) i *Anisus* sp. ( $r = 0,91$ ).

Zależność pomiędzy zawartością pierwiastków w liściach osoki a zgrupowaniem zasiedlających makrofit przedstawicieli makrofauny analizowano za pomocą kanonicznej analizy korespondencji z użyciem analizy krokowej postępującej (pCCA). Jej wykonanie wykazało znaczny wpływ składu pierwiastkowego podłoża biotycznego na zróżnicowanie zgrupowań fauny fitofilnej, bez względu na miesiąc badań brak wpływu sezonu badawczego.

Obie osie kanoniczne zarówno pod względem zagęszczenia, jak i biomasy opisują blisko 60% wariancji (rys. 1). Duże stężenia magnezu w tkankach osoki preferowały *Limnephilus* sp., *A.lacustris*, *V.contectus*, *S.corneum*, *Anisus* sp. i *Nepa cinerae*. Jednak musiało być to skorelowane z niskimi wartościami Cd, Pb, Cu, Ni i Zn. Akumulacja w tkankach osoki chromu i cynku jest tolerowana przez *Erpobdella octooculata* i *Chironomidae larvae*, natomiast *Colymbetes* sp., *Aeschna grandis*, *Asellus aquaticus*, *Dytiscus* sp. pojawiały się na biotycznym podłożu nawet przy znacznej akumulacji, są również dosyć odporne na akumulację w podłożu Cd, Pb, Cu i Ni. Małe stężenia Cr preferują *Erpobdella* sp., *Lymnaea aureculata*, *L.stagnalis*, *Planorbarius corneus*, *Dytiscus* sp. i *Helobdella stagnalis* (rys. 1A).





Rys. 1. Oddziaływanie wybranych pierwiastków na przedstawicieli fauny naroślinnej pod względem zagęszczenia (A) i biomasy (B) z wykorzystaniem analizy pCCA

Fig. 1. The influence of selected chemical elements on the density (A) and biomass (B) of epiphytic fauna representatives in the pCCA analysis

W przypadku biomasy fauny fitofilnej duże stężenia w tkankach osoki Mg, a niewielkie Cd, Pb, Cu, Ni i Zn wpływają na masę *B.tentaculata*, *E.tenellus*, *A.grandis*, *Erpobdella* sp., *A.aquaticus*, *V.viviparous*. Duże stężenia Cr powodują wzrost biomasy pijawek z rodzaju *Erpobdella* sp. oraz larw Lepidoptera, natomiast większe stężenia Cr i Zn zwiększają masę *Limnephilus* sp., *Dytiscus* sp., *Caenis macrura*, *P.corneus*. Małe ilości Cr powodują wzrost biomasy *G.heteroclita*, *A.lacustris*, *L.aureculata*, *E.octooculata*, *Limnephilus* sp. Akumulacja metali alkalicznych (Ca i Mg) wpływa na większą biomasę *S.corneum* (rys. 1B), gdyż małże te potrzebują znacznych ilości wapnia do budowy swoich muszli, a magnez jest im niezbędny do prowadzenia procesów metabolicznych [5].

## Wnioski

1. Osoka aloesowata dzięki zakumulowanym w swoich tkankach pierwiastkom oddziałuje na zasiedlającą ją faunę naroślinną.
2. Bioakumulacja metali ciężkich powoduje małą liczebność fauny naroślinnej, natomiast pierwiastki alkaliczne sprzyjają większemu zagęszczeniu zwierząt na osoco.
3. Spośród oznaczonych pierwiastków ołów i miedź mają zdecydowanie największy wpływ na strukturę jakościowo-ilościową epifauny naroślinnej.
4. Przedstawiciele mięczaków wykazują się największą wrażliwością na bioakumulację metali ciężkich w liściach osoki.

## Podziękowanie

Badania zostały sfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego jako projekt badawczy N N305 189635.

## Literatura

- [1] Giere O.: *Meiobenthology. The microscopic fauna in aquatic sediments*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest 1993.
- [2] Tarkowska-Kukuryk M.: *Water soldier Stratiotes aloides L. (Chydrocharitaceae) as a substratum for macroinvertebrates in a shallow eutrophic lake*. Pol. J. Ecol., 2006, **54**(3), 441-451.
- [3] De Lyon M.J.H. i Roelofs J.G.M.: *Waterplanten in relatie tot waterkwaliteit en bodemgesteldheid*. Deel 1 and 2 [in Dutch]. Laboratorium voor Aquatische Oecologie, 1986, Katholieke Universiteit Nijmegen.
- [4] Obolewski K.: *Epiphytic macrofauna on water soldiers (Stratiotes aloides L.) in Stupia river oxbows*. Oceanol. Hydrobiol. Stud., 2005, **XXXIV**(2), 37-54.
- [5] Lalonde S. i Downing J. A.: *Phytofauna of eleven macrophyte bends of differing trophic status, depth and composition*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 1992, **49**, 992-1000.
- [6] Mulderij G., Mooij W.M., Smolders A.J.P. i Van Donk E.: *Allelopathic inhibition of phytoplankton by exudates from Stratiotes aloides*. Aquat. Botany, 2005, **82**, 284-296.
- [7] Brammer E.S. i Wetzel R.G.: *Uptake and released of K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> by the water soldier Stratiotes aloides L.* Aquat. Botany, 1984, **19**, 119-130.
- [8] Obolewski K.T., Skorbiłowicz E., Skorbiłowicz M. i Strzelczak A.: *Influence of heavy metals contained in reed Phragmites australis (CAV.) TRIN. EX STEUD. inhabiting the Vistula lagoon on periphyton density*. Fresenius Environ. Bull. (w druku).
- [9] Burhard L. (red.): *Ekosystemy wodne Słowińskiego Parku Narodowego*. UWM, Poznań 2004.
- [10] Podbielkowski Z. i Tomaszewicz H.: *Zarys hydrobotaniki*. WN PWN, Warszawa 1996.
- [11] Gerrish N. i Bristow J.M.: *Microinvertebrate association with aquatic macrophytes and artificial substrates*. J. Great Lakes Res. Int. Assoc. Great Lake Res., 1979, **5**, 69-72.
- [12] Samecka-Cymerman A. i Kempers A.J.: *Heavy metals in aquatic macrophytes from two small rivers polluted by urban agricultural and textile industry sewages SW Poland*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 2007, **53**, 198-206.

## INFLUENCE OF WATER SOLDIER *Stratiotes aloides* L. ON THE STRUCTURE OF INHABITING MACROFAUNA

**Abstract:** The investigation was conducted in spring and summer seasons 2007 in the Smoldzińskie Lake (the cut-off bay of the Gardno Lake) and surrounding melioration ditches. The structure of epiphytic fauna inhabiting water soldiers *Stratiotes aloides* L. and chemical composition of this macrophyte were determined. With the help of ordination technique (pCCA) we assessed the influence of chemical composition of plant substrate on macrofauna representatives. Altogether 27 taxa of epiphytic fauna were found and most of them were observed in summer, except for one of the melioration ditches. It turned out, that lead and copper had the most important influence on epiphytic fauna inhabiting water soldiers and those chemical elements limited the occurrence of mollusks. The accumulation of other heavy metals in leaves of the studied macrophyte also did not favour the presence of macrofauna representatives. In turn, the higher concentrations of calcium and magnesium were correlated with higher abundance of beetles, caddis-flies and mollusks. The influence of season on chemical interactions between water soldiers and inhabiting macrofauna was not observed.

**Keywords:** epiphytic fauna, Smoldzinskie Lake, melioration ditches



Monika SKOWROŃSKA<sup>1</sup> i Tadeusz FILIPEK<sup>1</sup>

## AKUMULACJA AZOTU I FOSFORU PRZEZ KUKURYDZĘ POD WPŁYWEM OGRANICZONEGO NAWOŻENIA POTASEM

### ACCUMULATION OF NITROGEN AND PHOSPHORUS BY MAIZE AS THE RESULT OF A REDUCTION IN THE POTASSIUM FERTILIZATION RATE

**Abstrakt:** Celem przeprowadzonego doświadczenia polowego było określenie wpływu nawożenia potasem na pobranie i rozmieszczenie makroelementów (N i P) w kukurydzy uprawianej na glebie o bardzo dużej zasobności w potas ( $>250$  mg K  $\text{kg}^{-1}$ ). Próbki roślinne pobierano 37, 48, 58, 69, 79, 89, 100, 109, 118, 132 i 140 dnia po wysiewie kukurydzy i oznaczano w nich zawartość azotu i fosforu. Dane opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ . Stwierdzono, że nawożenie nie było czynnikiem, który istotnie różnicował pobranie składników pokarmowych przez kukurydzę. Ponadto, w warunkach gleby o dużej zasobności w potas nawożenie K miało niewielki wpływ na stan odżywienia (optymalną zawartość N i P) roślin kukurydzy.

**Słowa kluczowe:** kukurydza, azot, fosfor, pobranie, nawożenie potasem

Zbilansowane nawożenie potasem - jednym z podstawowych składników pokarmowych decydujących o plonach roślin i determinujących ich jakość - powinno uwzględnić zasobność gleb w ten pierwiastek [1]. Przenawożenie potasem może prowadzić do wzrostu zawartości tego pierwiastka w glebie i jego nadmiernego pobierania, a następnie zaburzenia gospodarki składnikami pokarmowymi, m.in. azotem i fosforem. Rezygnacja z nawożenia potasem w warunkach bardzo dużej zasobności gleb w ten składnik może ograniczyć środowiskowo i ekonomicznie niepożądany strumień potasu [2, 3]. Celem podjętych badań było określenie wpływu nawożenia potasem na pobranie i rozmieszczenie azotu i fosforu w kukurydzy uprawianej na glebie o bardzo dużej zasobności w potas.

#### Materiał i metody

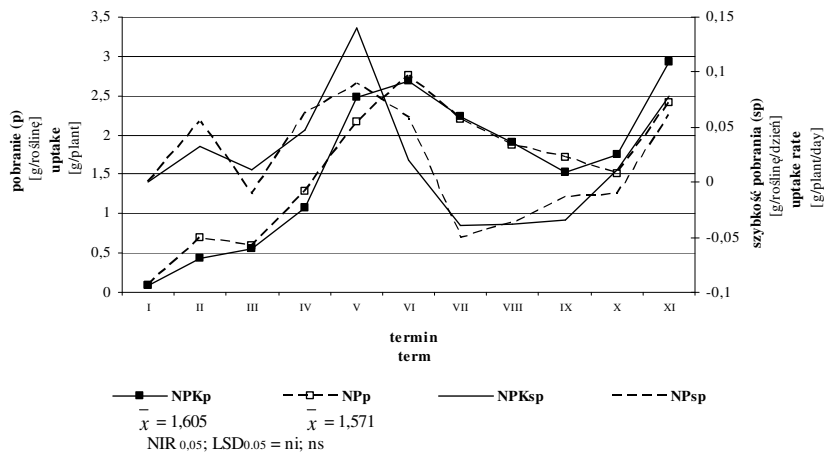
Dwuletnie badania przeprowadzono na plantacji produkcyjnej kukurydzy (odmiana *Turini*) w rejonie południowo-wschodniej Lubelszczyzny na glebach brunatnych właściwych, wytworzonych z utworów lessowych o odczynie obojętnym, średniej zasobności w przyswajalny fosfor i magnez oraz bardzo dużej w przyswajalny potas (powyżej 250 mg K  $\text{kg}^{-1}$ ). Biorąc pod uwagę zasobność gleb w przyswajalny potas, w uprawie kukurydzy zastosowano pełne nawożenie NPK i bez potasu (NP). W przeliczeniu na jeden hektar przedsięwzięcie wniesiono 140 kg fosforanu amonu (16,8 kg N i 31,9 kg P) oraz 280 kg nawozu Kemira Corn (16,8 kg N, 24,6 kg P i 65 kg K). Nawożenie pogłównne azotem w postaci saletry amonowej (81,6 kg N  $\text{ha}^{-1}$ ) zastosowano na całej plantacji w fazie 5-6 liści. Próbki roślinne pobierano po 37 (I termin), 48 (II termin), 58 (III termin), 69 (IV termin), 79 (V termin), 89 (VI termin), 100 (VII termin), 109 (VIII termin), 118 (IX termin), 132 (X termin) i 140 (XI termin) dniach od siewu roślin.

<sup>1</sup> Katedra Chemii Rolnej i Środowiskowej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, tel. 081 445 69 95, fax 081 445 66 64, email: monika.skowronska@up.lublin.pl

Zawartość azotu oznaczono metodą Kjeldahla, a fosforu metodą wanado-molibdenową po mineralizacji materiału roślinnego w stężonym kwasie siarkowym ( $H_2SO_4$ ) z dodatkiem perhydrolu ( $H_2O_2$ ). Uzyskane dane opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji z półprzedziałami ufności Tukeya przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

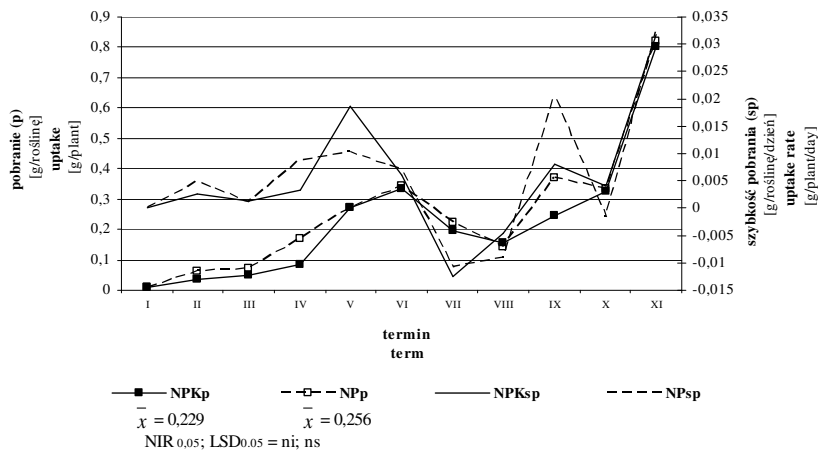
### Wyniki i ich omówienie oraz analiza

Pominięcie w dawce nawozowej potasu nie było czynnikiem istotnie wpływającym na pobranie oraz zawartość azotu i fosforu w kukurydzy (rys. rys. 1 i 2, tab. 1).



Rys. 1. Pobranie azotu przez kukurydzę w czasie wegetacji

Fig. 1. Nitrogen uptake by maize during vegetation



Rys. 2. Pobranie fosforu przez kukurydzę w czasie wegetacji

Fig. 2. Phosphorus uptake by maize during vegetation

Zawartość N, P w organach kukurydzy [g kg<sup>-1</sup>]

Tabela 1

N, P concentration in maize organs [g kg<sup>-1</sup>]

Table 1

Nawożenie Fertilization	Organ	N	P
NPK	liście - leaves	7,84	1,3
	łodygi - stalks	4,48	0,6
	ziarno - grain	15,96	5,4
	kolby - cobs	3,22	0,5
	korzenie - roots	3,92	0,4
$\bar{x}$		7,08	1,64
NP	liście - leaves	8,68	2,0
	łodygi - stalks	3,78	0,6
	ziarno - grain	14,42	6,2
	kolby - cobs	3,08	0,4
	korzenie - roots	3,92	0,4
$\bar{x}$		6,78	1,91
NIR <sub>0,05</sub> nawożenie; LSD <sub>0,05</sub> fertilization		n.i.;n.s.	n.i.;n.s.
$\bar{x}$	liście - leaves	8,26	1,63
	łodygi - stalks	4,13	0,58
	ziarno - grain	15,19	5,80
	kolby - cobs	3,15	0,45
	korzenie - roots	3,92	0,40
NIR <sub>0,05</sub> organ; LSD <sub>0,05</sub> organ		n.i.;n.s.	n.i.;n.s.

Roślina ta wykazywała się jednak zróżnicowaną szybkością akumulacji analizowanych makroelementów w okresach krytycznych. Podczas intensywnego przyrostu nowych tkanek (faza 7-9 liścia) tempo pobierania azotu było o 66,7% większe, a w fazie wiechowania o 35,7% mniejsze w warunkach gleby słabiej zaopatrzonej w potas (rys. 1).

Fosfor był najszybciej akumulowany przez kukurydzę w okresie reprodukcji (wiechowanie, nalewanie ziarna); przy czym nawożenie potasem intensyfikowało nieznacznie ten proces w pierwszym przypadku (wiechowanie), a spowalniało w drugim (nalewanie ziarna) (rys. 2). W doświadczeniu Niu i współaut. [4] ilość azotu i fosforu transportowana w soku ksylemu i floemu nie zmieniła się pod wpływem lepszego zaopatrzenia roślin w potas. Według niektórych autorów [3, 5], zwiększanie poziomu przyswajalnego potasu w glebie powyżej 150 mg kg<sup>-1</sup> nie oddziałuje na akumulację azotu i fosforu przez kukurydzę.

Kierunek przemieszczania się pobranych składników do różnych części roślin był uzależniony od intensywności metabolizmu, stąd też największe ilości azotu i fosforu zostały stwierdzone w liściach i ziarnie (tab. 1). Niezależnie od zastosowanego nawożenia obserwowano większą efektywność translokacji P (współczynnik zbioru 0,80÷0,81) aniżeli N (współczynnik zbioru 0,64÷0,65) [6]. Lepsze zaopatrzenie kukurydzy w potas zwiększyło nieznacznie ilość azotu, a zmniejszyło poziom P nagromadzonego w ziarnie (tab. 1), jednak z punktu widzenia stanu odżywienia roślin, zawartości analizowanych makroskładników były optymalne [2]. Nawożenie potasem, poprzez wpływ na wzrost stężenia jonów H<sup>+</sup> (ujawnienie wymiennej i fizjologicznej kwasowości), mogło w sposób pośredni wpłynąć na zmiany w biodostępności składników pokarmowych. [7]. Kationy

wodorowe, oddziałując na siatkę krystaliczną minerałów ilastych, zwiększając mobilność niewymiennie związanych jonów  $\text{NH}_4^+$ , ale ograniczając aktywność fosforanów, nasilając ich sorpcję specyficzną i niespecyficzną [5, 8]. Poza tym, potas korzystnie wpływa na absorpcję, szybkość translokacji i redukcję azotanów w roślinach [9, 10].

### Wnioski

1. W warunkach gleby o dużej zasobności w potas nawożenie K miało niewielki wpływ na pobranie i zawartość azotu oraz fosforu w kukurydzy.
2. Kukurydza, niezależnie od zastosowanego nawożenia, najszybciej akumulowała azot oraz fosfor w okresach, gdy jej procesy metaboliczne przebiegały najintensywniej, tj.: podczas rozwoju liści (N), wiechowania (N, P) i nalewania ziarna (P).
3. Niezależnie od zastosowanego nawożenia potasem, reutilizacja N i P z organów wegetatywnych kukurydzy (głównie liści) stanowiła ważne źródło tych makroelementów w częściach generatywnych (w ziarnie).

### Literatura

- [1] Jordan-Meille L. i Pellerin S.: *Shoot and root growth of hydroponic maize (Zea mays L.) as influenced by K deficiency*. Plant Soil, 2008, **304**, 157-168.
- [2] Murillo J.M., Moreno F., Cabrera F., Fernández-Boy E.: *Lowering the fertilization rate for corn monocropping: nutritional parameters*. J. Sci. Food Agric., 1997, **73**, 383-390.
- [3] Csathó P.: *The residual effect of K fertilization in a Hungarian corn monoculture long-term field trial, 1990-1999*. Comm. Soil Sci. Plant Analysis, 2002, **33**, 3105-3119.
- [4] Niu J., Chen F., Mi G., Li C. i Hang F.: *Transpiration, and nitrogen uptake and flow in two maize (Zea mays L.) inbred lines as affected by nitrogen supply*. Ann. Botany, 2007, **99**, 153-160.
- [5] Carter M.A. i Singh B.: *Response of maize and potassium dynamics in Vertosols following potassium fertilization*. SuperSoil, 3rd Australian and New Zealand Soils Conference, 5-9 December 2004, University of Sydney, Australia, 1-9.
- [6] Takahashi S. i Anwar M.R.: *Wheat grain yield, phosphorus uptake and soil phosphorus fraction after 23 years of annual fertilizer application to an Andosol*. Field Crops Res., 2007, **101**, 160-171.
- [7] Fageria N.K.: *Dry matter yield and shoot nutrient concentrations of upland rice, common bean, corn, and soybean grown in rotation on an Oxisol*. Comm. Soil Sci. Plant Analysis, 2004, **35**, 961-974.
- [8] Fageria N.K. i Stone L.F.: *Physical, chemical, and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability*. J. Plant Nutrit., 2006, **29**, 1327-1356.
- [9] Marschner H.: *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London 1995.
- [10] Fageria V.D.: *Nutrient interactions in crop plants*. J. Plant Nutrit., 2001, **24**, 1269-1290.

## ACCUMULATION OF NITROGEN AND PHOSPHORUS BY MAIZE AS THE RESULT OF A REDUCTION IN THE POTASSIUM FERTILIZATION RATE

**Abstract:** The field experiment was carried out to evaluate the effect of potassium fertilization rates on uptake and distribution of macroelements (N and P) in maize grown in soil with very high soil-test K levels ( $>250 \text{ mg K kg}^{-1}$ ). Plant samples were taken at 37, 48, 58, 69, 79, 89, 100, 109, 118, 132 and 140 days after maize sowing and analyzed for nitrogen and phosphorus contents. Data was subjected to analysis of variance with significant differences among means determined by LSD at  $p < 0.05$ . It was found that fertilization was not a factor that significantly differentiated nutrient uptake by maize. Additionally, under conditions of soil with a very high soil-test K level, potassium fertilization had a minimal effect on nutritional status (optimal N and P contents) of maize plants.

**Keywords:** maize, nitrogen, phosphorus, uptake, K fertilization